Успехи биологической химии, т. 59, 2019, с. 253-294

МУЛЬТИМОДАЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГЛИКИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

©2019 г. О. А. СМОЛЯНСКАЯ¹, Е. Н. ЛАЗАРЕВА^{2,3}, С. С. НАЛЕГАЕВ¹, Н. В. ПЕТРОВ¹, К. И. ЗАЙЦЕВ^{4,5,6}, П. А. ТИМОШИНА^{2,3}, Д. К. ТУЧИНА^{2,3,4}, Я. Г. ТОРОПОВА⁷, О. В. КОРНЮШИН⁷, А. Ю. БАБЕНКО⁷, Ж.-П. ГИЙЕ⁸, В. В. ТУЧИН^{1,2,3,9}

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург
 ² Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов
 ³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск
 ⁴ Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва
 ⁵ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва
 ⁶ Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, Москва
 ⁷ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург
 ⁸ IMS Laboratory, University of Bordeaux, Бордо
 ⁹ Институт проблем точной механики и управления

Российской академии наук, Саратов

I. Введение. II. Общие предпосылки развития мультимодальной оптической диагностики гликированных биологических тканей. III. Методы фазовой диагностики и мониторинга диабета. IV. Мультимодальная диагностика, основанная на нелинейных оптических явлениях. V. Видимая и ИК-спектроскопия гликированных тканей. VI. Оценка скорости кровотока и проницаемости тканей с помощью оптических просветляющих агентов в условиях развития диабета. VII. ТГц спектроскопия и имиджинг. VIII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет – это заболевание, вызванное дефицитом или сниженной эффективностью эндогенного инсулина, который вызывает дисбаланс сахара в крови [1]. Согласно данным International Diabetes

Адрес для корреспонденции: smolyanskaya@corp.ifmo.ru

Работа выполнена при государственной поддержке ведущих университетов Российской Федерации (субсидия 0808), а также за счет грантов Российского научного фонда 177530052, РФФИ 170000275 (17-00-00272, 17-00-00270\17), 170000186, 183200587, РФФИ/НЦНИ 18-51-16002 и 18-5216025, 182902060 мк, РНФ 181200328, СП-3507.2018.4 (ДКТ) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 32 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий».

Federation (IDF, https://www.idf.org/) в 2015 году число диабетических пациентов составляло 415 млн человек и по прогнозам экспертов IDF в 2040 году составит уже 642 млн человек. Сахарный диабет характеризуется высокой инвалидизацией и смертностью больных в связи с рано наступающим поражением сердечно-сосудистой системы в виде макро- и микрососудистых осложнений [2]. У больных сахарным диабетом в 2–4 раза чаще, чем в общей популяции, регистрируется ишемическая болезнь сердца, в 6–10 раз выше риск развития инфаркта миокарда, в 4–7 раз выше риск ишемического инсульта и в 3–4 раза чаще развивается недостаточность кровообращения. Кроме того, пациенты с сахарным диабетом имеют худший прогноз при цереброваскулярных заболеваниях и поражении периферических артерий.

Выраженная гетерогенность группы данных пациентов, обусловленная патогенетическими особенностями развития и прогрессирования сахарного диабета, а также наличием большого количества факторов, определяющих ответ на лечение, диктует необходимость повышения диагностического потенциала с учетом и систематизацией входных характеристик, индивидуализации процесса принятия решения о наиболее оптимальном для данного пациента способе лечения, что позволит с наиболее высокой вероятностью достичь целевых показателей с максимальным улучшением прогноза.

Измерения уровня глюкозы в плазме крови больных диабетом с использованием глюкометров являются относительно точными для своих задач и минимально инвазивными, т.к. требуется капля крови крайне малого объема. Однако эти измерения, выполняемые, как правило, по 4-6 раз в день самим пациентом, обеспечивают лишь определение текущего (мгновенного) уровня циркулирующей глюкозы. Оценки среднего уровня глюкозы на длительном интервале времени, предшествующем моменту измерения, выполняются на основе анализа гликированного (гликолизированного) гемоглобина (HbA1c). Концентрация HbA1c указывает на среднюю интенсивность воздействия стойкой гипергликемии в течение последних 2-3 месяцев, что совпадает с периодом полураспада гемоглобина (около 120 суток). Поэтому анализ гликированного гемоглобина является золотым стандартом диагностики и контроля устойчивой гипергликемии. Технически, диагностика концентрации HbA1c может осуществляться разными методами, среди которых наиболее надежным считается высокоэффективная жидкостная хроматография благодаря ее высокому разрешению и сверхчувствительности, которые позволяют идентифицировать исследуемые вещества на уровне

следовых количеств. Однако, данный метод обладает недостатками: высокой стоимостью и отсутствием возможностей применения для скрининга, необходимостью забора крови из локтевой вены. Поэтому актуальной задачей является поиск новых методов экспресс-анализа, способных обеспечить сопоставимую достоверность. Одним из направлений, в котором проводится данный поиск, является измерение оптических свойств крови и эритроцитов, которое производится такими методами как методы фазовой диагностики, включая оптическую рефрактометрию, цифровую голографическую микроскопию и дифракционную томографию; флуоресцентная спектроскопия [3]; оптическая когерентная томография (ОКТ) [4, 5]; мультимодальные подходы на основе флуоресцентной и голографической микроскопии, а также нелинейных оптических эффектов; лазерная спекл-контрастная визуализация; спектроскопия видимого, ИК и терагерцового диапазонов [6]. Современной тенденцией в развитии биомедицинской диагностики является мультимодальная диагностика (от англ. – «multimodal diagnostics»), то есть диагностика, комбинирующая различные оптические методы исследования, например, голографические и флуоресцентные. Данная диагностика будет способна обеспечить раннюю диагностику функциональных изменений до морфологических проявлений [7] на основе измерений временной динамики различных физических параметров, фазового запаздывания, пространственного распределения состояния поляризации, интенсивности флуоресценции, спектральных оценок и др. Новые методы мультимодальной диагностики также нацелены на решение важной проблемы в области исследований диабета по идентификации биомаркеров, например, базофильный инсулоцит, где традиционные неоптические методы не обладают достаточным для этих целей пространственным и временным разрешением. Учитывая уже имеющиеся обзорные работы общего характера [7, 8], мы остановимся на более детальном изучении современного состояния исследований, более близко относящихся к оптической мультимодальной диагностике гликированных тканей. Мы рассмотрим основные положительные результаты в этом направлении медицины, полученные с помощью методов фазовой диагностики, а также спектроскопии видимого, ИК- и терагерцового диапазонов, включая оценку скорости диффузии оптических просветляющих агентов в гликированных тканях.

II. ОБЩИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ РАЗВИТИЯ МУЛЬТИМОДАЛЬНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЛИКИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Термином «сахарный диабет» объединяют гетерогенную группу заболеваний, характеризующихся гипергликемией, которая сопровождается глюкозурией, полиурией, полидипсией, нарушениями липидного (гиперлипидемия, дислипидемия), белкового (диспротеинемия) и минерального (например, гипокалиемия) обменов, кроме того, провоцирует развитие осложнений.

Несмотря на наличие большого спектра препаратов различных классов для лечения сахарного диабета, показатели гипогликемического контроля достигают целевых значений менее, чем у половины пациентов [9]. Одним из путей утилизации глюкозы в условиях гипергликемии является полиоловый путь. Активация фермента альдоредуктазы приводит к превращению глюкозы в сорбитол, который, накапливаясь в клетках, приводит, прежде всего клетки эндотелия сосудов и эпителия почечных канальцев и нейроны к осмотическому стрессу [10]. Гликирование происходит в два этапа. Ранняя стадия включает присоединение сахара к первичным аминным группам с образованием основы Шиффа, которая медленно перестраивается для образования продукта Амадори или кетоамина [11]. Эти ранние продукты гликирования могут подвергаться окислению, обезвоживанию и сшиванию, что приводит к созданию чрезвычайно реакционноспособных дикарбонильных соединений. Присоединение этих соединений к остаткам лизина (Lys) и аргинина (Arg) или на N-конце представляет собой вторую стадию гликирования, в ходе которой образуются конечные продукты гликирования (Advanced Glycation End-products, AGEs) [10, 12–14].

Развитие сахарного диабета приводит к нарушению обмена углеводов, белков и липидов и сопровождается значительным увеличением содержания глюкозы, кортикостероидных гормонов и некоторых других метаболитов в крови [15]. Гликемия белка представляет собой неферментативную реакцию между карбонильными группами моносахаридов, такими как глюкоза и фруктоза, с аминогруппами белков, например, альбумином. Реакция инициирует сложный каскад модификаций белка, приводящий к потере как вторичной, так и третичной структуры [16]. Гликемия альбумина изменяет связывание лиганда и играет значительную роль при диабетических осложнениях. Гипергликемия вызывает увеличение осмолярности крови, что приводит к потере жидкости клетками (внутриклеточное обезвоживание), увеличению микроциркуляторных

нарушений крови и изменениям характера агрегации эритроцитов [17]. Спектроскопические методы исследования применяются для изучения гликирования белков тканей и клеток организмов как с естественно развивающимся [18, 19] и модельным сахарным диабетом [19, 20], а также образцов, которые были гликированы в условиях *in vitro* [21, 22]. В этой связи в настоящей статье проведен анализ оптических свойств цельной крови, плазмы крови и модельных жидкостей крови человека и животных в широком диапазоне ЭМ волн от видимого до терагерцового (части V–VII настоящей статьи). Гликированный сывороточный альбумин или гемоглобин являются маркерами для *in vitro* мониторинга уровня гликирования белков в организме. В качестве простых моделей для тестирования экспериментальных методов могут служить водные растворы глюкозы, сахарозы, галактозы и др.

Важную роль в развитии осложнений сахарного диабета играет усиление процессов перекисного окисления липидов, а также состояние антиоксидантных систем организма [23]. При этом показано, что уровень антиоксидантной защиты зависит от возраста пациентов, что затрудняет адекватную оценку эффективности выбранной стратегии лечения.

Длительность и выраженность гипергликемии, активация систем, модифицирующих метаболизм глюкозы, а также окислительный стресс играют ключевую роль в патогенезе микрососудистых осложнений сахарного диабета, таких как нейропатия, ретинопатия и нефропатия.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) в различных модификациях может быть использована для диагностики диабета благодаря возможности регистрации изменений оптических свойств исследуемых образцов крови и эритроцитов, вызванных изменением концентрации свободной глюкозы и гликированного гемоглобина [4, 24, 25]. В работах [26, 27] были продемонстрированы новые методы диагностики сахарного диабета на основе линейного эффекта оптической рефракции света в образцах крови. Как было показано позже, методы ОКТ [25, 28, 29], наравне с другими методами рефрактометрии (например, с использованием рефрактометров Номарски [27] и Аббе [21] или внутререзонаторной лазерной рефрактометрии [30, 31]) также могут применяться для диагностики сахарного диабета за счет установленной связи изменения показателя преломления образцов цельной крови с содержанием соединений гемоглобина и глюкозы. Однако, при исследовании не сильно рассеивающих сред ряду методов рефрактометрии характерна более высокая точность

измерений (вплоть до 10⁻⁸ для внутререзонаторной рефрактометрии) по сравнению с методами ОКТ (10⁻²–10⁻³) [21].

В целом рефрактометрический анализ в широком спектральном диапазоне важен для исследования оптических явлений в биологических тканях и клетках, наблюдаемых при развитии той или иной патологии, так как позволяет получить качественную и количественную информацию о строении биологических сред на молекулярном уровне [32, 33]. В случае медицинской диагностики сахарного диабета он позволяет провести селекцию гликированных форм белков от негликированных на основании их молекулярного различия [34], что показано в III части данного обзора.

При диабете происходят гемодинамические изменения, которые способствуют возникновению гипоксемии в различных органах, что приводит к ретинопатии, нефропатии, нейропатии, ишемической болезни сердца и заболеваниям периферических артерий [35-37]. При этом изменения микрогемодинамики связаны в первую очередь с эндотелиальной дисфункцией. Функции эндотелия включают в себя регулирование целостности сосуда, рост сосудов и ремоделирование, рост тканей и обмен веществ, иммунные реакции, клеточную адгезию, ангиогенез, гемостаз и проницаемость сосудов. Эндотелиальная дисфункция характеризуется такими особенностями, как снижение эндотелий-опосредованной вазорелаксации, регулирования гемодинамики, чрезмерная генерация реактивных форм кислорода, увеличение окислительного стресса, и повышенная проницаемость клеточного слоя [37]. Сильные изменения при диабете влияют на такие характеристики, как скорость кровотока, проницаемость кровеносных сосудов и др. Анализ проницаемости сосудов в условиях развития диабета может быть проведен путем оценки влияния оптических просветляющих агентов на микрогемодинамику органов здоровых лабораторных животных и животных с привитым диабетом (часть VI настоящего обзора).

Так называемая «диабетическая стопа» («синдром диабетической стопы»), является общим следствием сахарного диабета. Во многих случаях у пациентов с диабетом наблюдается сочетание микрососудистого и неврологического ухудшения, что приводит к плохому кровоснабжению тканей и потере чувствительности в ногах. Комбинация этих двух факторов вызывает дегидратацию кожи, которая, в свою очередь, становится более хрупкой [38]. В 2016 году в больнице «Hospital Angeles Leon» в Мексике [39] был предложен и апробирован на пациентах оригинальный метод диагностики «диабетической стопы» с помощью терагерцового имиджинга. Метод основан на

значительной разнице содержания воды в коже стопы пациентов с диабетом и здоровых добровольцев и будет подробнее описан в VII части настоящего обзора.

III. МЕТОДЫ ФАЗОВОЙ ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ДИАБЕТА

ОПТИЧЕСКАЯ РЕФРАКТОМЕТРИЯ

В работе [34] рефрактометрический метод был применен в широком диапазоне температур для исследования оптических свойств растворов гликированной и оксигенированной форм гемоглобина. Для приготовления растворов оксигемоглобина (HbO₂) и гликированного (HbA1c) гемоглобина были использованы лиофилизированный порошок гемоглобина человека (Sigma-Aldrich) и гемолизат гликированного гемоглобина (Sigma-Aldrich). Разбавление порошковой формы белковых молекул до концентрации 3 г/л проводилось физиологическим раствором 0,9 % NaCl. Измерение показателя преломления выполнялось на многоволновом рефрактометре Abbe DR-M2 / 1550 (Atago, Japan). Источником излучения в данной установке является лампа накаливания высокой мощности. Для селекции длин волн использовались узкополосные интерференционные фильтры со следующими средними длинами волн и полосами пропускания: (480 ± 2) , (486 ± 2) , (546 ± 2) , (589 ± 2) , (644 ± 2) , (656 ± 2) , $(680 \pm 5), (800 \pm 5), (930 \pm 6), (1100 \pm 26), (1300 \pm 25)$ M (1550 ± 25) нм. Рефрактометр обеспечивает ошибку измерений показателя преломления порядка $\pm 0,0002$.

Экспериментальные данные для показателя преломления растворов гликированного и оксигенированного гемоглобина в видимом и БИК-диапазонах при температуре 25 °C приведены в таблице 1. В начале каждого измерения была выполнена калибровка прибора с использованием известного табличного значения показателя преломления дистиллированной воды. Температура образца во время измерений поддерживалась при помощи циркуляционного термостата. Температурные зависимости показателя преломления растворов гликированного и оксигенированного гемоглобина измерялись на выборочных длинах волн 546, 589 и 644 нм при изменении температуры от 23 до 43 °C с шагом 2 °C. Показатель преломления был рассчитан как усредненный по трем измерениям для каждого раствора.

Температурные зависимости показателя преломления исследуемых растворов показаны на рис. 1.

λ, нм	$n_{\rm glyc}$	n _{oxy}
480	1,3397±0,0003	1,3393±0,0004
486	1,3392±0,0002	1,3391±0,0004
546	1,3366±0,0002	1,3361±0,0002
589	1,3350±0,0002	1,3348±0,0002
644	1,3332±0,0002	1,3331±0,0002
656	1,3330±0,0002	1,3326±0,0003
680	1,3320±0,0004	1,3318±0,0004
800	1,3303±0,0002	1,3300±0,0002
930	1,3282±0,0002	1,3283±0,0004
1100	1,3248±0,0002	1,3246±0,0003
1300	1,3197±0,0008	1,3201±0,0004
1550	1,3154±0,0003	1,3155±0,0002

Таблица 1. Значения показателя преломления растворов гликированного (n_{glyc}) и оксигенированного (n_{oxy}) гемоглобина (3 г/л) (T = 25 °C) в видимом и ближнем ИК (БИК)-спектральных диапазонах



Рис. 1. Зависимость показателя преломления растворов оксигенированного (HbO₂) и гликированного (HbA1c) при концентрации 3 г/л от температуры.

Таблица 2. Показатель преломления при T = 0°С (n_0) , температурный инкремент (dn/dT) и коэффициент корреляции R^2 при аппроксимации экспериментальных данных с помощью уравнения (3)

λ, нм	$(n_0)_{\rm glyc}$	$(dn/dT)_{glyc}$	$R^2_{\rm glyc}$	$(n_0)_{\rm oxy}$	$(dn/dT)_{oxy}$	R^2_{oxy}
546	1,3406±0,0005	-1,56±0,13	0,968	1,3396±0,0006	-1,28±0,16	0,926
589	1,3389±0,0003	-1,51±0,10	0,979	1,3379±0,0002	-1,18±0,05	0,990
644	1,3367±0,0004	-1,38±0,11	0,966	1,3362±0,0003	$-1,13\pm0,08$	0,974

Температурная зависимость показателя преломления для интервала 23–43°С была аппроксимирована линейной функцией [«OriginPro Lab»]:

$$n(T) = n_0 + T \frac{dn}{dT},\tag{1}$$

где n_0 – показатель преломления при T = 0°C; dn/dT – производная показателя преломления по температуре или температурный инкремент показателя преломления. Найденные значения n_0 и dn/dT для растворов гликированного (glyc) и оксигенированного (оху) гемоглобина приведены в таблице 2.

Полученные результаты показали увеличение модуля температурного инкремента показателя преломления для гликированной формы гемоглобина в среднем $(0,29 \pm 0,04) \times 10^{-4} \, ^{\circ}\mathrm{C}^{-1}$ для длин волн 546, 589 и 644 нм. Полная производная показателя преломления по температуре связана с влиянием теплового расширения при нагревании и температурной зависимостью молекулярной поляризуемости [27, 40, 41]. В связи с этим различия, полученные в этом исследовании для HbO, и HbA1c, можно объяснить их различными молекулярными структурами. Для молекулярных комплексов, образованных молекулами с различной поляризуемостью, справедливо правило аддитивности. В таком случае полная поляризуемость считается равной сумме поляризуемости каждой из молекул. Так как молекулярный комплекс гемоглобина с глюкозой обладает большей молекулярной поляризуемостью, то показатель преломления определяется содержанием заряженных аминокислот в молекуле. Зависимость показателя преломления сухих эритроцитов от диабетических пациентов от pH (pH = 2-13) и, следовательно, от заряда R-группы белка была показана в работе [27] при использовании поляриза-

ционно-чувствительной интерференционной микроскопии на длине волны 550 нм [27].

Теоретически использование преобразования Крамерса-Кронига (ПКК) дает возможность экстраполяции данных действительной части показателя преломления из видимой и БИК области в более широкую спектральную область, в частности терагерцовую. Для решения подобной задачи требуется знание мнимой части показателя преломления для всего исследуемого спектрального диапазона, в противном случае расчетное значение действительной части показателя преломления может сильно отличаться от измеренного. Например, в работе [33] приводятся данные для показателя преломления цельной крови и ее растворов, рассчитанные на основании измерений поглощения этих сред в БИК и среднем ИК (СИК)-диапазоне (2–15 мкм) с помощью алгоритма ПКК.

Таким образом показано, что применение рефрактометрического метода дает возможность его использования для исследования и селекции гликированных белков крови от негликированных с учетом отличий их молекулярного строения.

ЦИФРОВАЯ ГОЛОГРАФИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ И ДИФРАКЦИОННАЯ ТОМОГРАФИЯ

Смежным направлением к исследованию усредненного показателя преломления образцов крови является исследование морфологии клеток крови и пространственного распределения показателя преломления. В 2013 году группа В.П. Рябухо использовала метод дифракционной фазовой микроскопии для исследования динамики изменения морфологии эритроцитов после введения глюкозы при сахарном диабете [42]. Немного позднее, группа Гарсии Сукерии провела свое независимое исследование [43, 44], мотивацией которому послужили предыдущие более ранние работы в области измерения показателя преломления. В результате в работе были получены статистически достоверные сведения об особенностях взаимосвязи средней величины фазового запаздывания в эритроцитах от концентрации глюкозы и HbA1с в образцах крови пациентов с сахарным диабетом (рис. 2).

Однако, использованные в данных работах методы, в силу измерений двумерного интегрального фазового запаздывания не позволяют разделять вклады биохимической и морфологической составляющих. Для этих целей необходимо либо одновременное измерение в конфигурации на отражение и пропускание[45, 46], либо трехмерное измерение выполненное с помощью методов дифракционной томографии[47, 48].

Мультимодальная оптическая диагностика ...



Рис. 2. Двумерные фазовые изображения рельефа (а) эритроцитов здоровых пациентов (верхний ряд) и больных диабетом (нижний) первого типа («T1DM»), полученные с помощью дифракционной фазовой микроскопии. Результаты исследования зависимости фазового запаздывания от концентрации HbA1c (b) и глюкозы (c), содержания HbA1c от концентрации глюкозы (d) с расчетными значениями коэффициента корреляции *rho* и уровня достоверности *p*. Копирование с разрешения издательства из [44].

В 2017 году Юн Кён Парк с соавторами провели комплексное исследование показателя преломления эритроцитов в трех измерениях с помощью дифракционной томографии для одновременного изучения их морфологических, биохимических и механических свойств на индивидуальном клеточном уровне [49]. Результаты исследования показали, что наиболее значимыми и статистически достоверными отличиями свойств эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом являются изменения их механических параметров (флуктуации рельефа мембраны эритроцитов, рис. 3) по сравнению с эритроцитами контрольной группы здоровых пациентов.

О.А.Смолянская и соавт.



Рис. 3. Двумерные фазовые изображения мембран отдельных эритроцитов здоровых (а) и больных диабетом (b) пациентов с усредненными по времени картами флуктуаций их рельефа (c) и (d). Средние значения флуктуаций рельефа (e) большой выборки эритроцитов (среднее значение и стандартное отклонение отмечены горизонтальными линиями). Измеренные зависимости содержания гемоглобина в эритроците (Hb) от его объема (f), а также средней величины динамических флуктуаций мембраны эритроцитов от их сферичности (g) и концентрации гемоглобина Hb (h). Копирование с разрешения издательства из [49].

Той же научной группой ранее были исследованы особенности деформации формы эритроцитов в зависимости от времени их хранения (в интервале до 41 суток), и продемонстрирована разница скорости их деформации у здоровых и больных диабетом пациентов [50].

Таким образом, в упомянутых выше работах продемонстрированы широкие возможности диагностики и скрининга сахарного диабета на основе измерений фазового запаздывания (показателя преломления) и механических параметров эритроцитов (форма рельефа и её флуктуации во времени). Все эти параметры можно считать отдельными модальностями с точки зрения методов мультимодальной диагностики. Рассмотрим теперь на примере существующих работ в смежных областях дальнейшие возможные пути использования мультимодальных методов для совершенствования возможностей диагностики сахарного диабета.

РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ФАЗОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МУЛЬТИМОДАЛЬНЫХ ПОДХОДОВ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

Флуоресцентная микроскопия широко используется для анализа клеточных структур, например, путем идентификации отдельных клеточных компонентов и белков, а также для извлечения информации о внутриклеточных процессах [51]. Существующие подходы в использовании флуоресцентных методов для диагностики диабета, их основные преимущества и недостатки анализируются, например, в работе [52]. Методы цифровой голографической микроскопии и томографии можно рассматривать как важные инструменты, обеспечивающие мониторинг различных модальностей: фазы, поляризации, флуоресценции, спектральной информации и т.д. [8, 53-60]. Возможности цифровой голографии в области высокоточных измерений информации о фазе, в том числе с восстановлением трехмерных (3D) фазовых распределений, представлены, например, в известных работах [61, 62]. Недавно была продемонстрирована возможность использования пространственного распределения фазового запаздывания в качестве одной из модальностей при диагностике эффективности фотодинамического воздействия на клеточные структуры [60]. Использование флуоресцентной модальности в данной работе позволило сделать выводы о целостности мембраны клеток и верно интерпретировать уменьшение среднего фазового набега, наблюдаемого при некрозе живых клеток. В работе [63] был представлен метод цифровой голографии на основе интерферометра Маха-Цендера с двумя опорными пучками взаимно ортогональной поляризации с возможностью одновременного восстановления пространственных распределений состояний поляризации, интенсивности и фазового запаздывания в плоскости объекта на основе измерения одной цифровой голограммы. Восстановление состояний поляризации света с использованием метода цифровой голографии в осевой конфигурации с одним опорным пучком было также продемонстрировано в работе [64]. Расширение сферы применений цифровой голографии для записи флуоресцентных голограмм было представлено в работе [65] на основе методологии некогерентной корреляционной голографии Френеля (от англ. «FINCH«», – «Fresnel incoherent correlation holography»), которая была апробирована экспериментально для исследования нервных волокон кожи, клеток и пыльцы растений. Как показано в работе [66], методы цифровой голографии можно использовать для мгновенного одновременного восстановления не только трехмерной (3D), но и спектральной

информации о движущемся объекте, что было продемонстрировано на базе одноэкспозиционной голографии фазового сдвига с использованием специализированного массива микрополяризаторов и хроматических фильтров в плоскости регистрации. Работы, в которых голографические методы использовались для исследования и диагностики сахарного диабета были уже упомянуты ранее (например, в работах [43, 44]).

Все вышеперечисленные возможности измерения разнообразных физических величин методами цифровой голографии могут быть использованы для мультимодальной визуализации в биомедицинских исследованиях. Например, в работе [67] рассматривались возможные способы объединения голографических и флуоресцентных методов визуализации со сверхразрешением в рамках одной оптической схемы для исследования пластичности нейронов. Гибридная цифровая голографическая микроскопия, совмещенная с флуоресцентной микроскопией в единую мультимодальную систему измерения была также предложена в работе [68]. В работе были представлены результаты экспериментального исследования клеток Egera densa и продемонстрирована возможность независимой визуализации отдельно структуры ячеек и клеточных ядер за счет одновременной записи фазовых и флуоресцентных изображений. В статье [69] была предложена методика мультимодальной цифровой голографической микроскопии с возможностями одновременного получения трехмерных (3D) фазовых распределений и двумерных флуоресцентных изображений за счет интегрированных в рамках одной оптической схемы методик цифровой внеосевой голографии и эпифлуоресцентной микроскопии.

Измерение временной динамики вышеперечисленных физических параметров (фазы, поляризации, флуоресценции, спектральных оценок и т.д.) также может представлять большой интерес в определенных случаях [54]. Временное разрешение, необходимое для исследования конкретного процесса при этом определяется, очевидно, характерными скоростями его протекания и в различных оптических задачах может варьироваться от фемтосекунд до часов. Так, например, для изучения изменения морфологических изменений живых клеток в процессе их смерти или деления с помощью голографических методов достаточно иметь относительно низкое временное разрешение порядка нескольких минут [60, 70]. С другой стороны, использование тех же методов, например, для визуализации и изучения динамики изменения оптических характеристик нейронов в ответ на воздействие гипотонического

стресса требует разрешения порядка нескольких миллисекунд [71], в то время как для детектирования большей части других клеточных и микробиологических процессов требуется разрешение от наносекунд до микросекунд [72]. Измерение времени релаксации градиента показателя преломления, индуцированного нерезонансным оптическим эффектом электронного механизма нелинейности, как правило, проводится с помощью подхода накачка-зондирование с использованием лазерных импульсов с длительностью порядка нескольких десятков фемтосекунд. Во всех обозначенных случаях, несмотря на их существенные различия, измерение оптических параметров с соответствующим временным разрешением дает немало преимуществ, поскольку динамика изменения данных характеристик сама по себе может являться важным параметром, описывающим важные особенности протекания изучаемых процессов. Недавно были разработаны сверхбыстрые голографические методы визуализации и измерения нелинейного показателя преломления, а также характерного времени затухания его нелинейно-индуцированного градиента [55, 56].

Описанные выше преимущества мультимодальной диагностики были применены в работе [73] для разработки нового метода мультимодальной диагностики, нацеленного на решение важной проблемы в области исследований диабета по идентификации маркеров базофильного инсулоцита (недостатком традиционных методов является недостаточно высокое разрешение). В работе было предложено объединить оптическую когерентную микроскопию (OKM) и флуоресцентные измерения в одной оптической схеме для совершенствования возможностей скрининга клеточных образцов на начальных стадиях. В работе также были продемонстрированы измерения с временным разрешением (в интервале нескольких часов).

Мультимодальные методики, наподобие представленной в работе [73], являются, в целом, универсальным инструментарием, подходящим для использования как в исследованиях, так и для клинической диагностики.

IV. МУЛЬТИМОДАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА, ОСНОВАННАЯ НА НЕЛИНЕЙНЫХ ОПТИЧЕСКИХ ЯВЛЕНИЯХ

Известные в настоящее время мультиплексированные и мультимодальные методы визуализации, основанные на нелинейных оптических эффектах [8], позволяют проводить трехмерную клеточную визуализацию, открывая беспрецедентные возможности для обеспечения химической диагностической специфичности (способности

отделять друг от друга разные элементы, объекты и классифицировать эти объекты по группам), что во многих аспектах приближает их к универсальности методик флуоресцентной микроскопии. Однако, в общем случае при рассмотрении биомедицинской визуализации более принято классифицировать нелинейные методы визуализации в качестве дополнения к флуоресцентной микроскопии.

К основным методам нелинейной биомедицинской визуализации, наиболее распространенным в настоящее время, можно отнести методы, основанные на использовании следующих оптически нелинейных эффектов: генерация второй [74, 75, 76] и третьей [77, 78] гармоник, суммарных частот [79]; вынужденное комбинационное рассеяние [80, 81] и когерентное антистоксовое комбинационное рассеяние (Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)) [82, 83, 84].

Одной из основных задач количественного анализа изображений отдельных биологических клеток, полученных методами биомедицинской визуализации, является их автоматизированная цифровая обработка. Внедрение технических методов визуализации в реальных условиях применения во многом зависит, например, от эффективности компьютерных процедур автоматизированной сегментации полученных изображений. Цель сегментации состоит в делении целого поля зрения на отдельные области, представляющие биологически значимые объекты, например, для выделения отдельных клеток внутри ткани (или внутри колонии организмов) или для выделения органелл и внутриклеточных структур.

Таким образом, биомедицинская визуализация часто требует сложных компьютерных алгоритмов обработки данных. Флуоресцентная микроскопия позволяет выделять определенные области внутри клеток, такие как клеточная мембрана, цитоплазма или ядро, что облегчает меж- и внутриклеточную сегментацию и позволяет ограничиться минимальной цифровой обработкой. Методики мультимодальной визуализации с их широкими возможностями выделения различных внутриклеточных объектов также позволяют снизить требования к цифровой обработке изображений.

Мультимодальные методики, в целом, часто являются универсальным инструментом с широкими возможностями как в области исследований, так и применения в различных областях, поэтому разработка новых мультимодальных методов диагностики с использованием нелинейных оптических эффектов также может быть перспективным направлением совершенствования возможностей диагностики и скрининга сахарного диабета и гипергликемии [85].

V. ВИДИМАЯ И ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ ГЛИКИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ

Авторы работы [18] показали возможность использования метода абсорбционной спектроскопии для оценки количества гликированного гемоглобина в спектральном диапазоне 200–850 нм, причем получена хорошая корреляция между результатами, полученными спектроскопическим методом и стандартным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В работе [86] был предложен метод количественного анализа содержания гликированного гемоглобина в образцах гемолизата крови человека с помощью БИК-спектроскопии и последующей обработки спектров методом частных наименьших квадратов со скользящим окном (moving window partial least squares (MWPLS)), который позволяет найти оптимальные диапазоны длин волн для определения содержания гликированного и негликированного гемоглобина. Оптимальные длины волн для проведения анализа находятся в области обертонов БИК-диапазона и составляли от 1492 до 1858 нм для гликированного гемоглобина.

В работах [21, 22] исследовались оптические свойства гемоглобина и альбумина в водных растворах глюкозы с помощью рефрактометрии и спектроскопии ИК-диапазона. С увеличением концентрации глюкозы в растворе было получено увеличение показателя преломления и снижение поглощения исследуемых растворов предположительно по причине связывания белков с глюкозой, что может объясняться межмолекулярным взаимодействием в процессе гликирования белков и формированием нового молекулярного комплекса – гликированного белка, обладающего большей молекулярной массой. Авторы работы [22] пришли к выводу, что глюкоза в растворах увеличивает сродство гемоглобина к кислороду и способствует процессу окисления атома железа в гемме и переходу оксиформы гемоглобина в метаформу.

Использование спектроскопических методов видимого и ИК-диапазонов электромагнитных волн при исследовании гликированных тканей позволяет идентифицировать структурные модификации тканей и содержание в них воды [85].

VI. ОЦЕНКА СКОРОСТИ КРОВОТОКА И ПРОНИЦАЕМОСТИ ТКАНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКИХ ПРОСВЕТЛЯЮЩИХ АГЕНТОВ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ДИАБЕТА

Анализ проницаемости сосудов в условиях развития диабета может быть проведен путем оценки влияния оптических просветляющих агентов на микрогемодинамику здоровых лабораторных животных и животных с привитым диабетом. Одним из перспективных методов оценки изменений кровотока является лазерная спекл – контрастная визуализация [87–89]. Спекл – контрастная визуализация является неинвазивным бесконтактным методом, что позволяет получать и анализировать изображения капиллярного кровотока в режиме реального времени. В данном методе предполагается оценка контраста усредняемых по времени динамических спеклов в зависимости от времени усреднения спекл-модулированных изображений. Расчет пространственного контраста спекл-изображения *К* производится по единичному регистрируемому изображению спекл-поля по области, размер которой составил 5×5 или 7×7 пикселей [87]:

$$K_{\rm k} = \delta_{Ik} / \bar{I}_k = \frac{\sqrt{(1/{\rm MN})\sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N \{I_k(m,n) - \bar{I}_k\}^2}}{(1/{\rm MN})\sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I_k(m,n)},$$
 (2)

где k – количество кадров, \overline{I}_k и σ_{lk} – усредненные по анализируемому кадру интенсивность рассеянного света и среднеквадратичное значение флуктуационной составляющей яркости пикселя, M и N – количество пикселей в строке и столбце анализируемой области кадра; $I_k(m, n,)$ – яркость (m, n,) – пикселей k-кадра.

Данный метод активно используется в работах по анализу воздействий оптических просветляющих агентов на микрогемодинамику, например, Чэнг и др. использовали спекл-визуализацию для количественного анализа изменений кровотока, вызванных оптическими просветляющим агентами [90]. Дан Жу и др. применяли метод спекл-визуализации для исследования как быстрых, так и сравнительно медленных эффектов воздействия глицерина и глюкозы, смеси ПЭГ-400 и тиазона на кровеносные сосуды в разных тканях *in vivo* [91]. Мао и др. [92] изучали влияние водного 30%-раствора глицерина на кровеносные сосуды дермы кожи крысы с помощью спекл-визуализации.

Результаты исследования проницаемости сосудов при применении 100% раствора «Омнипак-300» и водного 70%-раствора «Омнипак-300», а именно анализ кровотока в сосудах поджелудочной железы

здоровой группы лабораторных животных и группы животных с привитой моделью аллоксанового диабета, представлены в работе [93]. «Омнипак-300» относится к так называемым неионным рентгеноконтрастным средствам, активным веществом которого является йогексол. Раствор содержит 647 мг йогексола, что эквивалентно 300 мг органического йода на 1 мл [94]. Растворы наносили на участок ткани местно, используя пипетку в объеме 0,5 мл.

Калибровка системы спекл-контрастной визуализации позволила количественно оценить изменения скорости кровотока. Для мониторинга микрогемодинамики был использован лабораторный образец визуализирующего устройства, который позволяет проводить регистрацию изображений одного и того же участка образца как в когерентном свете (освещение лазером), так и при некогерентном освещении без механической перенастройки. В связи с тем, что в конечном итоге объектом исследований является кровоток, для спеклвизуализации применялся одномодовый гелий-неоновый лазер ГН-5П с длиной волны 632,8 нм, для которой наблюдается существенное рассеяние зондируемого излучения эритроцитами. Спекл-модулированные изображения поверхности анализируемого участка регистрировались монохромной КМОП-камерой (Basler a602f, число пикселей в матрице 656×491, размер пикселя 9,9×9,9 мкм; 8 бит/пиксель), оснащенной микро-объективом ЛОМО с кратностью увеличения 10[×].

Статистически значимых изменений кровотока при применении водного 70%-раствора «Омнипак-300» и 100% раствора «Омнипак-300» в контрольной группе животных не наблюдается, при этом в обеих диабетических группах отчетливо видно увеличение кровотока в течение 4 мин с последующим восстановлением параметров кровотока. К 10 мин кровоток полностью восстанавливается (рис. 4). Увеличение кровотока после нанесения просветляющего агента могло быть вызвано нарушением эндотелиальной проницаемости сосудов из-за развитого диабета и повышенным уровнем глюкозы в крови. Также было установлено, что диаметр сосудов под влиянием растворов не изменился. Для животных диабетической модели эксперименты проводились через 10 дней после инъекции аллоксана.

Обнаруженное различие в поведении отклика сосудов на воздействие агентов для животных контрольной и диабетических групп можно связать с существенными различиями в проницаемости нормальных и гликированных тканей для молекул просветляющих агентов. При этом в зависимости от строения и состава ткани, а также структуры и размеров пробной молекулы просветляющего агента, проницаемость ткани при гликировании может быть различной.





Рис. 4. Скорость кровотока в поджелудочной железе крыс диабетической и контрольной групп при воздействии водного 70%-раствора «Омнипак-300» (а) и 100% раствора «Омнипак-300» (б).

Действительно, в работах [19, 20] проводились исследования проницаемости биологических тканей лабораторных животных для нетоксичных химических растворов глюкозы и глицерина при развитии аллоксанового диабета. Растворы глюкозы и глицерина используются для оптического просветления биологических тканей. так как при их воздействии на биоткани снижается рассеяние света в тканях [95]. Оценка коэффициентов диффузии химических агентов производилась из измеренных спектров коллимированного пропускания образцов кожи и миокарда лабораторных животных в видимом и ближнем ИК-диапазоне длин волн 500-900 нм. В результате проведенных экспериментальных исследований было получено снижение скорости диффузии глюкозы в коже мышей в 1,5-2,5 раза при использовании водных 30%-, 43%-, 56%-растворов глюкозы [19] и глицерина в коже и миокарде крыс в 1,2 и 1,5 раза, соответственно, при использовании водного 70%-раствора глицерина [20] при развитии аллоксанового диабета в течение 11 и 15 дней по сравнению с контрольными группами животных.

Снижение скорости диффузии глюкозы и глицерина в биологических тканях должно быть связано с гликированием, а именно, с потерей осевой упаковки фибрилл коллагена I типа по причине скручивания и искажения матрицы аддуктами гликирования [96, 97], а также с увеличением содержания воды в коже, обнаруженное у больных сахарным диабетом [98], что может быть причиной более сильного рассеяния света в диабетической коже.

В работе [99] исследовалось влияние развития аллоксанового диабета на внутренние органы лабораторных животных. На 15 день после инъекции аллоксана анализ гистологических срезов биотканей

выявил морфологические изменения в биотканях разной степени тяжести по сравнению с контрольной группой животных, в том числе некроз отдельных клеток почек, околососудистые фиброзные уплотнения, снижение размеров и количества панкреатических островков поджелудочной железы.

VII. ТГЦ СПЕКТРОСКОПИЯ И ИМИДЖИНГ

В связи с тем, что терагерцовая спектроскопия и имиджинг являются довольно новыми методами, которые разрабатываются для медицинской диагностики, то целесообразно дать описание особенностей взаимодействия терагерцового излучения с биологическими средами, содержащими молекулы воды, основные принципы генерации и детектирования терагерцового излучения и, наконец, результаты исследования гликированных модельных и живых объектов с помощью терагерцового зондирования в условиях *in vitro* и *in vivo*.

ТГЦ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ОТКЛИК ВОДЫ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД

Терагерцовое (ТГц) электромагнитное излучение имеет частоты от 0,1 до 10.0 ТГц (или длины волн – от 30 мкм до 3 мм) [100]. Частотная зависимость ТГц комплексной диэлектрической проницаемости вещества несет информацию о низкочастотных молекулярных колебаниях, межмолекулярных связях и структурных свойства вещества, что позволяет использовать ТГц излучение для решения широкого спектра фундаментальных и прикладных проблем в физике конденсированного состояния, фармацевтике и медицине [101, 102]. Энергия ТГц кванта значительно меньше по сравнению с квантами инфракрасного, оптического и ультрафиолетового излучения [101], поэтому ТГц излучение малой мощности безвредно для организма человека [103]. В свою очередь, ТГц излучение сравнительно небольшой мощности способно оказывать нетермическое воздействие на биообъекты, открывая новые перспективы в терапии воспалительных заболеваний и злокачественных новообразований [104]. Согласно санитарным нормам Federal Communications Commission (FCC), USA энергетическая освещенность поверхности организма излучением суб-ТГц диапазона (до 100 ГГц) за рабочий день не должна превышать 7,0 (мВт/см²)×ч [105]. Однако проблемы систематического исследования влияния ТГц излучения на биологические объекты различного уровня организации, оценки предельных доз ТГц воздействия на организм человека, а также создание новых методов ТГц терапии по-прежнему остаются недостаточно изученными [106].

ТГц излучение сильно поглощается полярными молекулами, в частности – водой, что ограничивает глубину проникновения излучения в биологические ткани сотнями микрометров [1] и позволяет применять ТГц спектроскопию и имиджинг для неинвазивной диагностики новообразований кожи [107, 108, 109], а также малоинвазивной и интраоперационной диагностики новообразований других локализаций [110, 111, 112]. Высокое содержание воды в подавляющем большинстве биологических тканей во многом определяет характер их диэлектрического отклика в ТГц диапазоне; а именно – частотная зависимость ТГц комплексной диэлектрической проницаемости воды и биологических тканей описывается релаксационными моделями, например, двойной моделью Дебая [113] с весьма близкими параметрами. Релаксационный диэлектрический отклик тканей характеризуется отсутствием резонансных спектральных особенностей – в спектрах присутствуют только полосы поглощения с шириной, соизмеримой со всем ТГц диапазоном. В то же время, чувствительность ТГц излучения к содержанию воды, делает ТГц спектроскопию и имиджинг привлекательными инструментами медицинской диагностики, использующими содержание воды в тканях и ее состояние в качестве информативных признаков для дифференциации.

Степень гидратации биологических веществ в водном растворе является важным фактором при анализе структуры и функции биологических молекул [105, 114]. Электрические заряды создают электрическое поле, ориентирующее дипольные молекулы воды. В 1906 году российской ученый Н.А. Морозов обосновал существование в таких комплексах двух слоев (или оболочек) гидратированной воды наряду с чистой водой [115]. Первая оболочка достаточно прочная и состоит из монослоя строго упорядоченных под действием электрического поля молекул воды, связанных с гидрофильной частью растворенного вещества с помощью водородных связей; молекулы воды в этом слое имеют медленные времена релаксации, 10-7 с. В дальнем слое сохранена тетраэдрическая структура чистой воды, в которой динамика образования и разрушения водородных связей происходит в пикосекундном временном масштабе [116]. Промежуточная зона – зона «таяния», в которой сказывается влияние обеих соседних зон; в этом слое молекулы воды слабо возмущены диполями молекул в первой оболочке; они имеют более медленные времена релаксации ~10⁻⁹-10⁻¹⁰ с. Таким образом, методы ТГц диэлектрической спектроскопии чувствительны к пикосекундной динамике среды, позволяя [117] измерять состояние воды в слое, слабо связанным с растворенными молекулами [118].

Частотная зависимость ТГц комплексной диэлектрической проницаемости воды может быть описана суперпозицией двух релаксационных слагаемых Дебая и одного осциллятора Лоренца с высоким демпингом [119]:

$$\varepsilon_{\text{water}}(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + i \cdot \omega \cdot \tau_1} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + i \cdot \omega \cdot \tau_2} + \frac{A}{\omega_0^2 - \omega^2 + i \cdot \gamma_1 \cdot \omega} + \cdots, \quad (3)$$

где ε_{∞} – диэлектрическая проницаемость на высоких, по сравнению с рабочим спектральным диапазоном, частотах; $\Delta \varepsilon_{1,2}$ – вклад 1-ого и 2-ого релаксаторов Дебая в диэлектрическую проницаемость; $\tau_{1,2}$ – время релаксации для 1-ого и 2-ого слагаемых Дебая; A, ω_0 и γ – амплитуда, собственная частота и демпинг осциллятора Лоренца [120]. Дебаевское время τ_1 = 9,60 пс описывает кооперативную реорганизацию молекул воды, связанных водородной связью [121], в то время как быстрая составляющая диэлектрического отклика с характерным временем релаксации τ_2 = 0,25 пс обычно описывает вращение или перенос молекул воды, не связанных водородной связью [121].

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ТГЦ СПЕКТРОСКОПИИ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД

ТГц импульсная спектроскопия (Terahertz Pulsed Spectroscopy – TPS) является одним из наиболее распространенных методов спектроскопических измерений в ТГц диапазоне. Он появился в результате исследований эффекта фотопереключения в полупроводнике под действием ультракоротких лазерных импульсов, проводившихся Д. Аустном в 1975 году [122], и активно развивался в последние десятилетия с прогрессом в области фемтосекундной лазерной техники и созданием новых источников и детекторов ТГц импульсов [100]. В TPS объект исследования зондируется ТГц импульсами суб-пикосекундной длительности, после чего ТГц поле E(t), прошедшее сквозь образец или отраженное от его поверхности, регистрируется с высоким временным разрешением. Для обработки сигналов E(t) применяется математический аппарат Фурье-анализа, что позволяет оценивать частотную зависимость амплитуды и фазы ТГц поля в широком спектральном диапазоне. Регистрация спектров амплитуды и фазы в результате единственного измерения делает возможным восстановление частотной зависимости ТГц комплексной диэлектрической проницаемости образца во всем рабочем спектральном диапазоне системы без применения соотношений Крамерса-Кронига [123]. Отмеченное делает TPS более привлекательным инструментом ТГц диэлектрической спектроскопии по сравнению с другими распространенными подходами, например,

ИК-Фурье спектроскопией [124] или спектроскопией на основе ламп обратной волны [125].

TPS широко применяется для измерения TГц диэлектрических откликов образцов биологического происхождения, таких как биополимеры, ДНК, кровь, мягкие ткани [107–112, 126–129]. Тем не менее чувствительности и разрешающей способности современных TPS-систем недостаточно для ультраследового анализа веществ [130], что стимулирует новые технические разработки в рассматриваемой области.

Для повышения чувствительности ТГц измерений биологических объектов и жидкостей в последнее время все больше применяют устройства на основе резонаторов [131], внутриволноводных сенсоров [132] и метаповерхностей [133]. Стоит особо отметить ТГц микрофлюидный чип для биомедицинских приложений, использующий ТГц излучатель на основе метаповерхности и нелинейного оптического кристалла (NLOC), в котором ТГц волны генерируются за счет оптического выпрямления ультракоротких лазерных импульсов [134, 130]; он позволяет проводить анализ следового количества веществ и оптических констант химических и биохимических процессов.

В последние десятилетия были предложены несколько подходов к повышению пространственного разрешения ТГц спектроскопии и визуализации. Среди них – ТГц голография [135–137] и имиджинг на основе синтеза апертуры [138], позволяющие достичь пространственного разрешения чуть меньше длины волны λ. В свою очередь методы ТГц сканирующей зондовой микроскопии обеспечивают чрезвычайно высокое пространственное разрешение – $10^{-2}...10^{-3}$ λ [139, 140], однако требуется применения мощных ТГц источников и чувствительных детекторов для регистрации ТГц поля, рассеянного на суб-волновом кантилевере. Один из наиболее перспективных подходов к получению суб-волнового пространственного разрешения в ТГц диапазоне связан с использованием эффекта локализации ТГц поля позади диэлектрических частиц, характерные размеры которых сопоставимы или больше длины волны электромагнитного излучения [141]. В таких системах суб-волновое пространственное разрешение достигается за счет эффекта формирования ТГц фотонной струи (THz Photonic Jet – TeraJet) [142], так и благодаря эффекту твердотельной иммерсии [143], причем при формировании суб-волновой каустики пучка не применяется никаких суб-волновых диафрагм и зондов, и соответственно, не наблюдается связанных с ними энергетических потерь. Принцип твердотельной иммерсии предполагает фокусировку пучка электромагнитного излучения на небольшом расстоянии ($<\lambda$)

позади среды с высоким показателем преломления п. Он позволяет в ~n раз уменьшить размер каустики пучка по сравнению с фокусировкой в свободном пространстве, в отсутствии отмеченной среды. В работе [144] принцип твердотельной иммерсии позволил обеспечить пространственное разрешение ТГц визуализации $0,35\times\lambda$; в работах [145, 146] на его основе было достигнуто разрешение $0,15\ldots0,20\times\lambda$, что позволило визуализировать существенно суб-волновые структурные особенности мягких тканей. Таким образом, значительный интерес к биомедицинским приложениям ТГц техники, а также большое количество научных групп, работающих в рассматриваемой области, не заставляет сомневаться в скором решении проблем повышения чувствительности и пространственного разрешения ТГц измерений.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРОВ САХАРОВ С ПОМОЩЬЮ ТГЦ-СПЕКТРОСКОПИИ

ТГц спектроскопия на основе эффекта полного внутреннего отражения (Attenuated Total Reflection – ATR) позволяет определить комплексный показатель преломления растворов сахаров и экспериментально характеризовать состояние их гидратации. С помощью этого метода показано, что состояние гидратации тесно связано с числом гидрофильных групп и стерической конфигурацией гидроксильных групп в молекулах сахаров [147]. Комплексный показатель преломления в ТГц диапазоне несет информацию о наличие в среде несвязанной воды с пикосекундными временами релаксации, а также о количестве объемной воды, замещенной гидратной водой с более медленными временами релаксации. Можно оценить состояние гидратации растворенных веществ, вычислив диэлектрические потери на частоте 0,5 ТГц. Указанная частота выбрана по той причине, что на 0,5 ТГц диэлектрические потери воды связаны с медленными и быстрыми временами релаксации. Формула для определения числа гидратации $(n_{\rm h})$ растворов сахаров имеет следующий вид [117]:

$$n_{\rm h} = N \frac{\varepsilon_{\rm water}(0.5 \, {\rm T}\Gamma {\rm \mu}) - \varepsilon_{\rm solution}(0.5 \, {\rm T}\Gamma {\rm \mu})}{\varepsilon_{\rm water}(0.5 \, {\rm T}\Gamma {\rm \mu}) - \varepsilon_{\rm background}(0.5 \, {\rm T}\Gamma {\rm \mu})},\tag{4}$$

где N – общее количество молекул воды на растворенную молекулу сахара, ε_{water} – диэлектрические потери дистиллированной воды, $\varepsilon_{solution}$ – диэлектрические потери раствора сахара и $\varepsilon_{background}$ – диэлектрические потери быстрой релаксации жидкой воды. При концентрации растворителя 0,292 М число гидратации моносахаров и дисахаров[117] составило: 10,5 (манноза), 11,2 (галактоза), 15,2 (глюкоза), 21,1 (мальтоза) и 21,9 (сахароза).

В работе [147] продемонстрировано, что ТГц-спектроскопия может использоваться для количественного определения «глобального» состояния гидратации растворов сахаров. Измеренное число гидратации сильно коррелирует с числом гидроксильных групп в растворе сахаров и обратно зависит от концентрации растворенного вещества из-за перекрытий гидратных оболочек и дипольных корреляционных взаимодействий растворов.

В работе [148] представлен метод измерения малого количества молекул сахара (от сотен микромолей до десятков молей) и показана возможность их селективной идентификации с помощью ТГц наноантенн, работающей в диапазоне частот 0,5–2,5 ТГц. Молекулярная концентрации сахаров менялась в интервале 0-500 мг/дл (0-27,5 ммоль/л), поскольку концентрация нормального уровня глюкозы натощак в крови человека составляет 70–100 мг/дл (3,9–5,5 ммоль/л), а для пациентов с диабетическими симптомами – 100–125 мг/дл (5,6-6,9 ммоль/л) и выше. Для обнаружения молекул D-глюкозы с разной концентрацией была применена антенна, генерирующая ТГц излучение на частоте 1,4 ТГц; для фруктозы – на частоте 1,7 ТГц. Сильно локализованное и усиленное с помощью наноантенны ТГц поле привело к значительному увеличению сечения поглощения, в результате чего молекулы D-глюкозы были хорошо различимы. Разработанная антенна работает только для определенной молекулы, которая имеет сильное поглощение на своей резонансной частоте и нечувствительна к другим молекулам.

ТГЦ СПЕКТРОСКОПИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

В работе [149] показано, что для смеси, содержащей бычий сывороточный альбумин (Bovine Serum Albumin – BSA) и фруктозу на ранней стадии инкубации, амплитуда первого дебаевского члена $\Delta \varepsilon_1$ составляет 88% по сравнению с чистой водой. Это означает, что 12% воды связались с сахаром или с белком. После 96 часов инкубации BSA с фруктозой амплитуда первого дебаевского члена $\Delta \varepsilon_1$ составляет 92% по сравнению с амплитудой для чистой воды. Во время инкубации BSA с фруктозой происходит реакция между карбонильными группами фруктозы с аминогруппами альбумина [16]. Молекулы фруктозы образуют ковалентные связи с молекулой белка. Инкубационная смесь содержит значительно меньшую часть молекул сахара, связанных с молекулами воды. Другими словами, количество свободных молекул воды увеличивается на заключительной стадии инкубации. В результате мнимая часть диэлектрической проницаемости увеличивается, а это, в свою очередь, приводит

к уменьшению пропускания ТГц излучения через инкубационную смесь через 96 часов после инкубации [149].

В работе [150] использовали ТГц-спектроскопию для мониторинга гликирования человеческого сывороточного альбумина (Human Serum Albumin – HSA) в течение 5, 7 и 11 недель. Различные типы сахара имеют различную реакционную способность, поэтому авторы выполнили гликирование HSA in vitro путем инкубации как с глюкозой, так и с фруктозой. Поскольку протонирование растворов влияет на их восприимчивость к гликированию, авторы инкубировали HSA с сахарами при двух значениях рН – 7 и 8. Показано, что поглощение ТГц излучения уменьшается со временем инкубации HSA с сахарами. Наиболее значимые различия были получены на образцах HSA, гликированных с использованием фруктозы. Гликирование инкубацией с глюкозой является более медленным процессом. При рН 7 гликирование под действием глюкозы происходит медленнее, чем при рН 8, тогда как гликирование под действием фруктозы, наоборот, несколько быстрее при рН 7, чем при рН 8. Таким образом, показано, что ТГц спектроскопия может использоваться для динамического контроля процессов гликирования; она чувствительна к типу сахара, участвующего в гликировании, и значению рН в процессе гликирования [150].

ТГЦ СПЕКТРОСКОПИЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЛЮКОЗЫ

Проводились измерения концентрации глюкозы на частотах выше 0,1 ТГц с помощью методов инфракрасной Фурье-спектроскопии (Fourier Transform Infrared spectroscopy – FTIR) и TPS, причем в исследованиях использовались модельные объекты [105]. В большинстве публикаций авторы использовали деионизированную воду, D–(+)-глюкозу и BSA для создания модельных растворов. D–(+)-глюкоза является основным сахаром в организме человека; ее часто называют просто глюкозой. Альбумин – белок плазмы крови, являющийся ее основным компонентом; он контролирует осмотическое давление и транспортирует питательные вещества.

Показано, что $\Delta \varepsilon_1$ насыщенного раствора глюкозы примерно на 50% меньше, чем у чистой воды [120]; более того, обнаружено, что в процессе гидратации единичных молекул глюкозы участвуют примерно 50 молекул воды [151, 152]; 10 молекул воды расположены в первой гидратной оболочке, остальные 40 молекул существуют как слабо гидратированная вода.

Тогіі и др. [105] исследовали зависимость коэффициента отражения глюкозы и альбумина в водных растворах, а также влияние альбумина

O.A.	Смолянская	и	соавт.
------	------------	---	--------

на изменение концентрации глюкозы в смешанном растворе от концентрации на частоте 0,06 ТГц излучения. В качестве источника ТГц излучения использовались диод Ганна (60 мВт) и туннельный диод (0,18 мВт), в качестве приемника – диод Шоттки. В результате экспериментального исследования показано, что коэффициент отражения уменьшается пропорционально концентрации глюкозы, в то время как чувствительность метода составила 0,05 мас.% глюкозы в растворе.

ТГЦ СПЕКТРОСКОПИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Спектральный коэффициент поглощения ТГц излучения в плазме крови крыс с экспериментальным диабетом и в водном растворе глюкозы значительно ниже по сравнению с коэффициентом поглощения, характерным для чистой воды и плазмы крови крыс из контрольной группы [153]. В свою очередь спектральный коэффициент поглощения ТГц излучения в водном растворе глюкозы намного меньше, чем в плазме крови крыс с диабетом. С одной стороны, это связано с тем, что молекулы воды, сильно поглощающие в ТГц области частот, заменяются в растворах и плазме менее поглощающими ТГц излучение компонентами глюкозы. С другой стороны, известно, что кровь пациентов с сахарным диабетом и диабетической нефропатией имеет гораздо более высокое содержание гликированного гемоглобина, пептидов, молекул адгезии и хемокинов, что может способствовать полному поглощению.

Сhen и др. [154] провели трехлетнее исследование крови 70 пациентов с диабетом с помощью метода TPS. Многие биохимические показатели крови, такие как триглицериды (Triglycerides – TG), эритроциты (Red Blood Cells – RBC), гемоглобин (Hemoglobin – HB), лейкоциты (White Blood Cells – WBC), белки (включая альбумин и глобулин), ионы (включая Na⁺, Ca⁺₂ и K⁺), липиды и др. влияют на спектральный коэффициент поглощения ТГц излучения крови [155]. Авторы применили метод корреляционного анализа Пирсона, с помощью которого было показано, что коэффициент поглощения крови сильно коррелирует с уровнем глюкозы. Обнаруженная линейная зависимость между концентрацией глюкозы С в крови и коэффициентом поглощения α будет выражаться как C = 0,55 + 0,99α.

ТГЦ ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ IN VIVO

В работе [156] проводились ТГц измерения уровня глюкозы в крови мышей с диабетом типа 1, причем уровень глюкозы в крови определялся на основе ТГц визуализации кожи и подлежащих тканей в области уха мышей *in vivo* с применением метода ближнепольной





Рис. 5. ТГц сканирующая ближнепольная просвечивающая микроскопия уха мыши с диабетом [156]: (a) – схема эксперимента; (b)–(e) – результаты визуализации тканей уха мыши с сосудами в возрасте 4–7 недель в процессе развития диабета типа 1, где цветовая шкала отображает коэффициент поглощения в мм⁻¹. Копирование с разрешения издательства из [156].

микроскопии, работающей в режиме на пропускание. Непрерывное ТГц излучение с частотой 0,340 ТГц (длина волны – 881,7 мкм) генерировалась диодом Ганна и детектировалось диодом Шоттки. Для доставки ТГц излучения к поверхности уха мыши использовался диэлектрический цилиндрический волновод с внутренним диаметром 9 мм, толщиной оболочки 2 мм и длиной 30 см. Изображение регистрировалось за счет растрового сканирования поверхности уха мыши детектором (см. рис. 5 (а)), при этом толщина уха мыши составляла около 0,5 мм. ТГц изображения, полученные в режиме на пропускание, продемонстрировали высокую чувствительность метода к уровню глюкозы в крови в капиллярах уха (см. рис. 5 (b)–(e)); показано, что уровень глюкозы в крови животного увеличивается с развитием диабета.

Возможно, коэффициент поглощения растет при развитии диабета за счет агрегации эритроцитов и более сильного рассеяния, поскольку способность эритроцитов к агрегации зависит от концентрации глюкозы [157, 158].

Более высокое рассеяние способствует и более высокому поглощению. В данном примере на рис 5, наблюдается повышенный уровень свободной глюкозы в крови и накопление гликированного гемоглобина за 7 недель, что и сказалось на экстинкции.

Близкорасположенные кровеносные сосуды могут быть хорошо различимы на ТГц изображениях с разрешением около 0,5 мм [159]. Численное исследование крови и окружающих тканей уха мыши *in vivo* показало небольшую разницу в показателе преломления (не более 0,3) и большую разницу в коэффициенте экстинкции (не менее 80 см⁻¹), тогда как чувствительность системы к изменению коэффициента экстинкции достигает 2 см⁻¹.

Изменения спектров отражения кожи человека и лабораторных крыс после введения в организм глюкозы (внутрибрюшинной инъекции 1 мл 40 % раствора для крыс и орально 200 мл раствора глюкозы для людей) изучались in vivo с помощью TPS в диапазоне частот 0,1-2,0 ТГц [17, 160]. Амплитуда и фаза отраженного сигнала кожи ладони человека изменяются после введения глюкозы, при этом изменения фазы более выражены. Изменения оптических свойств кожи коррелируют с изменениями уровня глюкозы в крови. Показано, что в диапазоне 0,1-0,5 ТГц наблюдаются наибольшие различия в наклонах и минимумах кривых. Авторы связали этот эффект с тем, что в этом частотном диапазоне вода отличается заметной дисперсией, а изменения содержания воды в коже приводят к очевидным изменениям спектров отражения. Содержание воды в слое эпидермиса кожи составляет всего 15 %, а содержание белка и липидов составляет 70 и 15 % соответственно [161]. Из-за этого спектр отражения кожи значительно отличается от спектра отражения воды по абсолютным значениям, но спектральная форма по-прежнему в основном определяется релаксационной динамикой молекул воды.

Структурная модификация коллагеновой матрицы и степень гидратации диабетической ткани могут быть изучены с помощью исследования скорости диффузии просветляющего агента в оптическом [19] и терагерцовом [129] диапазонах. Наблюдается более медленная диффузия оптического просветляющего агента (70% глюкозы) в образце диабетической почки по сравнению с диффузией агента в образце из контрольной группы [129]. Это связано с изменением свободной и связанной воды в диабетической ткани. В диабетической ткани почки по сравнению с недиабетической, происходит увеличение коэффициента пропускания в течение 5–19 минут лечения, что связано с затруднением диффузии в гликированных тканях по сравнению с нормальными [19].



Рис. 6. Диагностика диабетической стопы с помощью ТГц имиджинга [39]: (а) фотография экспериментальной установки; (б) ТГц изображения стоп пациентов из контрольной и диабетической групп, соответственно. Копирование с разрешения издательства из [39].

ТГЦ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ IN VIVO

В работе [39] предложен оригинальный метод оценки состояния ног пациентов с диабетом с помощью ТГц визуализации. Так как ТГц излучение чувствительно к содержанию воды в среде, то методы ТГц спектроскопии и визуализации могут стать эффективными инструментами диагностики обезвоживания кожи ног у пациентов с диабетом из-за патологии периферических сосудов. Большинство язв стопы, испытываемых пациентами с диабетом, встречаются на подошве, большем пальце ноги, плюсневой области и области пятки, поэтому требуется изображение всей подошвы ног. В рассматриваемой работе создана специальная платформа (см. рис. 6) с двумя встроенными полиэтиленовыми окнами для размещения ног пациентов. Под платформой была размещена TPS-система, которая детектировала отраженное от поверхности образца ТГц излучение и обеспечивала возможность построения изображений за счет растрового сканирования поверхности образца пучком сфокусированного ТГц излучения. Два изображения стоп добровольца из контрольной группы и пациента из диабетической группы демонстрируют значительную разницу содержания в них воды (рис. 6). Таким образом, ТГц имиджинг может быть перспективным инструментом скрининга ранних стадий развития патологий ног у пациентов с диабетом.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование спектроскопических методов в широком диапазоне электромагнитных волн от видимого до терагерцового излучения при исследовании гликированных тканей позволяет отразить структурные модификации биотканей и изменение содержания воды в тканях при диабете. Анализ применения рефрактометрического метода показал возможность его использования для исследования и селекции гликированных белков крови от негликированных с учетом отличий их молекулярного строения. В работе показана возможность проведения анализа проницаемости сосудов в условиях развития диабета путем оценки влияния оптических просветляющих агентов на микрогемодинамику здоровых лабораторных животных и животных с привитым диабетом. Снижение скорости кровотока в сосудах поджелудочной железы в группе диабетических животных при применении водного 70%-раствора глицерина может служить в дальнейшем основой для развития методов диагностики патологий, сопровождающих сахарный диабет, а также более детального изучения влияния оптических просветляющих агентов в условиях развития патологий. Следует отметить, что оптические методы, такие как классическая спектроскопия, рефрактометрия, спекл-контрастная визуализация уже хорошо себя зарекомендовали при исследовании биологических объектов, однако их потенциал далеко не исчерпан, они имеют большие перспективы в исследовании биохимических процессов в тканях и клетках, особенно при их комбинированном использовании и привлечении новых оптических методов. К таким методам относятся цифровая голографическая микроскопия и томография, с помощью которых была статистически достоверно показана возможность диагностики диабета, а также терагерцовая спектроскопия и визуализация. Дальнейшим направлением развития методов диагностики диабета и сопровождающих патологий является разработка новых подходов в мультимодальности, например, совмещение с флуоресцентными технологиями, а также методами визуализации, основанными на нелинейных оптических явлениях с использованием единого лазерного источника излучения.

ЛИТЕРАТУРА

- Zouaghi, W., Thomson, M.D., Rabia, K., Hahn, R., Blank, V., Roskos, H.G. (2013) Broadband terahertz spectroscopy: principles, fundamental research and potential for industrial applications, *Eur. J. Phys.*, **34**(6), S179.
- Calcutt, N.A., Cooper, M.E., Kern, T.S., Schmidt, A.M. (2009) Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8(5), 417.
- Vigneshwaran, N., Bijukumar, G., Karmakar, N., Anand, S., Misra, A. (2005) Autofluorescence characterization of advanced glycation end products of hemoglobin, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 61(1-2), 163–170.
- Gelikonov, V.M., Gelikonov, G.V. (2006) New approach to cross-polarized optical coherence tomography based on orthogonal arbitrarily polarized modes, *Laser Phys. Lett.*, 3(9), 445.
- Tuchin, V.V., Wang, R.K., Galanzha, E.I., Elder, J.B., Zhestkov, D.M. (2004) Monitoring of glycated hemoglobin by OCT measurement of refractive index. *Proc. SPIE*, 5316, 66–78.
- Khalil, O.S. (1999) Spectroscopic and clinical aspects of noninvasive glucose measurements, *Clin. Chem.*, 45(2), 165–177.
- Pavillon, N., Fujita, K., Smith, N.I. (2014) Multimodal label-free microscopy, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 7(05), 1330009.
- Streets, A.M., Li, A., Chen, T., Huang, Y. (2014) Imaging without Fluorescence: Nonlinear Optical Microscopy for Quantitative Cellular Imaging, *Anal. Chem.*, 86(17), 8506–8513.
- 9. Edelman, S.V. and Polonsky, W.H. (2017) Type 2 diabetes in the real world: the elusive nature of glycemic control, *Diabetes Care*, **40**(11), 1425–1432

- Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, **414**(6865), 813–820.
- 11. Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Baynes, J.W., Metz, T.O. (2008) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease, *J. Proteome Res.*, 8(2), 754–769.
- Lapolla, A., Fedele, D., Reitano, R., Bonfante, L., Guizzo, M., Seraglia, R., Tubaro, M., Traldi, P. (2005) Mass spectrometric study of in vivo production of advanced glycation end-products/peptides, *J. Mass Spectrom.*, 40(7), 969–972.
- Ahmed, N. (2005) Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 67(1), 3–21.
- Kalousova, M., Skrha, J., Zima, T. (2002) Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus, *Physiol. Res.*, **51**(6), 597–604.
- Dedov, I.I. (2010) Diabetes mellitus: development of technologies in diagnostics, treatment and prevention, *Diabetes Mellit.*, **13**(3), 6–13.
- Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., Ascenzi, P., (2012) Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Aspects Med.*, 33(3), 209–290.
- Cherkasova, O., Nazarov, M., Shkurinov, A. (2016) Noninvasive blood glucose monitoring in the terahertz frequency range. *Opt. Quantum Electron.*, 48(3), 217.
- Mallya, M., Shenoy, R., Kodyalamoole, G., Biswas, M., Karumathil, J., Kamath, S. (2013) Absorption spectroscopy for the estimation of glycated hemoglobin (HbA1c) for the diagnosis and management of

diabetes mellitus: a pilot study, *Pho-tomed. Laser Surg.*, **31**(5), 219–224.

- Tuchina, D.K., Shi, R., Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Zhu, D., Luo, Q., Tuchin, V.V. (2015) Ex vivo optical measurements of glucose diffusion kinetics in native and diabetic mouse skin, *J. Biophotonics*, 8(4), 332–346.
- Tuchina, D.K., Bashkatov, A.N., Bucharskaya, A.B., Genina, E.A., Tuchin, V.V (2017) Study of glycerol diffusion in skin and myocardium ex vivo under the conditions of developing alloxan-induced diabetes, J. Biomed. Photonics Eng., 3(2), 20302.
- Zhernovaya, O.S., Tuchin, V.V., Meglinski, I.V. (2008) Monitoring of blood proteins glycation by refractive index and spectral measurements, *Laser Phys. Lett.* 5(6), 460.
- Lazareva, E.N., Tuchin, V.V., Meglinski, I.V. (2008) Measurements of absorbance of hemoglobin solutions incubated with glucose, *Proc. SPIE*, 6791, 679100.
- Giacco, F. and Brownlee, M. (2010) Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ. Res.* 107(9), 1058–1070.
- 24. Larin, K.V., Ghosn, M.G., Ivers, S.N., Tellez, A., Granada, J.F. (2006) Quantification of glucose diffusion in arterial tissues by using optical coherence tomography, *Laser Phys. Lett.*, 4(4), 312.
- Galanzha, E.I., Solovieva, A.V., Tuchin, V.V., Wang, R.K., Proskurin, S.G. (2003) Application of optical coherence tomography for diagnosis and measurements of glycated hemoglobin. *Proc. SPIE*, **5140**, 125.
- 26. Okamoto, F., Sone, H., Nonoyama, T., Hommura, S. (2000) Refractive changes in diabetic patients during intensive glycaemic control, *Br. J. Ophthalmol.*, 84(10), 1097–1102.
- Mazarevica, G., Freivalds, T., Jurka, A. (2002) Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients, *J. Biomed. Opt.*, 7(2), 244–248.

- Tuchin, V.V., Xu, X., Wang, R.K. (2002) Dynamic optical coherence tomography in studies of optical clearing, sedimentation, and aggregation of immersed blood, *Appl. Opt.*, 41(1), 258–271.
- 29. Zhernovaya, O.S., Tuchin, V.V., Wang, R.K. (2006) Comparable application of the OCT and Abbe refractometers for measurements of glycated hemoglobin portion in blood. *Proc. SPIE*, **6085**, 608507.
- Gonchukov, S.A., Lazarev, Y.B. (2003) Laser refractometry in medicine and biology, *Laser Phys.*, 13(5), 749–755.
- Gonchukov, S., Vakurov, M., Yermachenko, V. (2006) Precise laser refractometry of liquids, *Laser Phys. Lett.*, 3(6), 314.
- 32. Tavousi, A., Rakhshani, M.R., Mansouri-Birjandi, M.A. (2018) High sensitivity label-free refractometer based biosensor applicable to glycated hemoglobin detection in human blood using all-circular photonic crystal ring resonators, *Opt. Commun.*, 429, 166–174.
- 33. Rowe, D.J., Smith, D., Wilkinson, J.S. (2017) Complex refractive index spectra of whole blood and aqueous solutions of anticoagulants, analgesics and buffers in the mid-infrared, *Sci. Rep.*, 7(1), 7356.
- Lazareva, E.N., Zyubin, A.Y., Samusev, I.G., Slezhkin, V.A., Kochubey, V.I., Tuchin, V.V. (2018) Refraction, fluorescence and Raman spectroscopy of normal and glycated hemoglobin, *Proc. SPIE*, **10685**, 1068540.
- 35. Hosking, S.P.M., Bhatia, R., Crock, P.A., Wright, I., Squance, M.L., Reeves, G. (2013) Non-invasive detection of microvascular changes in a paediatric and adolescent population with type 1 diabetes: a pilot crosssectional study, *BMC Endocr. Disord.*, **13**(1), 41.
- 36. Vallance, P. (2001) Importance of asymmetrical dimethylarginine in

cardiovascular risk, *Lancet*, **358**(9299), 2096–2097.

- Bonetti, P.O., Lerman, L.O., Lerman, A. (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk Arterioscler, *Thromb. Vasc. Biol.*, 23(2), 168–175.
- Nathan, D.M. (1993) Long-term complications of diabetes mellitus, *N. Engl. J. Med.*, **328**(23), 1676–1685.
- Hernandez-Cardoso, G.G., Rojas-Landeros, S.C., Alfaro-Gomez, M., Hernandez-Serrano, A.I., Salas-Gutierrez, I., Lemus-Bedolla, E., Castillo-Guzman, A.R., Lopez-Lemus, H.L., Castro-Camu, E. (2017) Terahertz imaging for early screening of diabetic foot syndrome: A proof of concept, *Sci. Rep.*, 7, 42124.
- Erokhin, A.I., Morachevskii, N.V., Faizullov, F.S. (1978) Temperature dependence of the refractive index in condensed media, *Sov. J. Exp. Theor. Phys.*, 47, 699.
- Волькенштейн М.В. (1951) Молекулярная оптика. М.-Л., ГИТТЛ, 745 с.
- 42. Talaykova, N.A., Kalyanov, A.L., Lychagov, V.V., Ryabukho, V.P., Malinova, L.I. (2013) Change dynamics of RBC morphology after injection glucose for diabetes by diffraction phase microscope, *Proc. SPIE*, **9032**, 90320F.
- Doblas, A., Roche, E., Ampudia-Blasco, F.J., Martinez-Corral, M., Saavedra, G., Garcia-Sucerquia, J. (2016) Diabetes screening by telecentric digital holographic microscopy, J. Microsc., 261(3), 285–290.
- Doblas, A., Martinez-Corral M., Saavedra, G., Garcia-Sucerquia, J. (2016) Digital holographic microscopy for diabetes screening, *SPIE Newsroom*, **261**(3), 285–290.
- Lin, Y.-C., Cheng, C.-J., (2010) Determining the refractive index profile of micro-optical elements using transflective digital holographic microscopy, J. Opt., 12(11), 115402.

- Talaikova, N.A., Popov, A.P., Kalyanov, A.L., Ryabukho, V.P., Meglinski, I.V. (2017) Dual mode diffraction phase microscopy for quantitative functional assessment of biological cells, *Laser Phys. Lett.*, 14(10), 105601.
- 47. Kostencka, J., Kozacki, T., Kuś A., Kemper, B., Kujawińska, M. (2016) Holographic tomography with scanning of illumination: space-domain reconstruction for spatially invariant accuracy, *Biomed. Opt. Express*, 7(10), 4086–4101.
- Lin, Y., Chen, H.-C., Tu, H.-Y., Liu, C.-Y., Cheng, C.-J. (2017) Optically driven full-angle sample rotation for tomographic imaging in digital holographic microscopy, *Opt. Lett.*, 42(7), 1321–1324.
- 49. Lee, S., Park, H., Kim, K., Sohn, Y., Jang, S., Park, Y. (2017) Refractive index tomograms and dynamic membrane fluctuations of red blood cells from patients with diabetes mellitus, *Sci. Rep.*, 7(1), 1039.
- 50. Park, H., Lee, S., Ji, M., Kim, K., Son, Y., Jang, S., Park, Y. (2016) Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging, *Sci. Rep.*, 6, 34257.
- Muzzey, D., van Oudenaarden, A. (2009) Quantitative time-lapse fluorescence microscopy in single cells, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 25, 301–327.
- Klonoff, D.C. (2012) Overview of fluorescence glucose sensing: a technology with a bright future, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 6(6), 1242–1250.
- 53. Matoba, O., Quan, X., Xia, P., Awatsuji, Y., Nomura, T. (2017) Multimodal imaging based on digital holography, *Proc. IEEE*, **105**(5), 906–923.
- Boss, D., Kühn, J., Jourdain, P., Depeursinge, C.D., Magistretti, P.J., Marquet, P.P. (2013) Measurement of absolute cell volume, osmotic mem-

brane water permeability, refractive index of transmembrane water and solute flux by digital holographic microscopy, *J. Biomed. Opt.*, **18**(3), 36007.

- Petrov, N.V, Putilin, S.E., Chipegin, A.A. (2017) Time-resolved image plane off-axis digital holography, *Appl. Phys. Lett.*, **110**(16), 161107.
- Lin, Y.-C., Cheng, C.-J., Lin, L.-C. (2017) Tunable time-resolved ticktock pulsed digital holographic microscopy for ultrafast events, *Opt. Lett.*, 42(11), 2082–2085.
- 57. Lin, Y.-C., Tu, H.-Y., Wu, X.-R., Lai, X.-J., Cheng, C.-J. (2018) One-shot synthetic aperture digital holographic microscopy with non-coplanar angular-multiplexing and coherence gating, *Opt. Express*, **26**(10), 12620–12631.
- Petrov, N.V., Nalegaev, S.S., Belashov, A.V., Shevkunov, I.A., Putilin, S.E., Lin, Y.C., Cheng, C.J. (2018) Time-resolved inline digital holography for the study of noncollinear degenerate phase modulation, *Opt. Lett.*, 43(15), 3481–3484.
- Nalegaev, S.S., Belashov, A.V, Petrov, N.V. (2017) Application of photothermal digital interferometry for nonlinear refractive index measurements within a Kerr approximation, *Opt. Mater.*, **69**, 437–443.
- Belashov, A.V, Zhikhoreva, A.A., Belyaeva, T.N., Kornilova, E.S., Petrov, N.V, Salova, A.V, Semenova, I.V, Vasyutinskii, O.S. (2016) Digital holographic microscopy in label-free analysis of cultured cells' response to photodynamic treatment, *Opt. Lett.*, 41(21), 5035–5038.
- Cuche, E., Bevilacqua, F., Depeursinge, C. (1999) Digital holography for quantitative phase-contrast imaging, *Opt. Lett.*, 24(5), 291–293.
- Kemper, B. and von Bally, G. (2008) Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection, *Appl. Opt.*, 47(4), A52–A61.

- Colomb, T., Dahlgren, P., Beghuin, D., Cuche, E., Marquet, P., Depeursinge, C. (2002) Polarization imaging by use of digital holography, *Appl. Opt.*, 41(1), 27–37.
- 64. Nomura, T., Javidi, B., Murata, S., Nitanai, E., Numata, T. (2007) Polarization imaging of a 3D object by use of on-axis phase-shifting digital holography, *Opt. Lett.*, **32**(5), 481–483.
- Rosen, J. and Brooker, G. (2008) Nonscanning motionless fluorescence three-dimensional holographic microscopy, *Nat. Photonics*, 2(3), 190–195.
- 66. Xia, P., Awatsuji, Y., Nishio, K., Ura, S., Matoba, O. (2014) Parallel phaseshifting digital holography using spectral estimation technique, *Appl. Opt.*, **53**(27), G123--G129.
- Dudenkova, V.V., Zakharov, Y.N. (2016) Multimodal combinational holographic and fluorescence fluctuation microscopy to obtain spatial super-resolution, *Journal of Physics: Conference Series*, 737(1), p. 12069.
- 68. Quan, X., Nitta, K., Matoba, O., Xia, P., Awatsuji, Y. (2015) Phase and fluorescence imaging by combination of digital holographic microscopy and fluorescence microscopy, *Opt. Rev.*, **22**(2), 349–353.
- Quan, X., Matoba, O., Awatsuji, Y. (2017) Image recovery from defocused 2D fluorescent images in multimodal digital holographic microscopy, *Opt. Lett.*, **42**(9), 1796–1799.
- 70. Rappaz, B., Cano, E., Colomb, T., Kuhn, J., Depeursinge, C. D., Simanis, V., Magistretti, P. J., Marquet, P.P. (2009) Noninvasive characterization of the fission yeast cell cycle by monitoring dry mass with digital holographic microscopy, J. *Biomed. Opt.*, 14(3), 34049.
- Rappaz, B., Marquet, P., Cuche, E., Emery, Y., Depeursinge, C., Magistretti, P. J. (2005) Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with

digital holographic microscopy, Opt. Express, **13**(23), 9361–9373.

- 72. Siegel, G.J., Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. (2006) Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects (7-th Ed.). Elsevier, Academic Press, 175 p.
- Berclaz, C., Pache, C., Bouwens, A., Szlag, D., Lopez, A., Joosten, L., Ekim, S., Brom, M., Gotthardt, M., Grapin-Botton, A., Lasser, T. (2015) Combined Optical Coherence and Fluorescence Microscopy to assess dynamics and specificity of pancreatic beta-cell tracers, *Sci. Rep.*, 5, 10385.
- 74. Franken, P.A., Hill, A.E., Peters, C.W., Weinreich, G. (1961) Generation of optical harmonics, *Phys. Rev. Lett.*, 7(4), 118.
- Gannaway, J.N., Sheppard, C.J.R. Second-harmonic imaging in the scanning optical microscope, *Opt. Quantum Electron.*, 10(5), 435–439.
- Hellwarth, R., Christensen, P. (1974) Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe, *Opt. Commun.*, **12**(3), 318–322.
- 77. Barad, Y., Eisenberg, H., Horowitz, M., Silberberg, Y. (1997) Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation, *Appl. Phys. Lett.*, **70**(8), 922–924.
- Müller, M., Squier, J., Wilson, K. R., Brakenhoff, G. J. (1998) 3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation, *J. Microsc.*, **191**(3), 266–274.
- 79. Wang, H.-F., Gan, W., Lu, R., Rao, Y., Wu, B.-H. (2005) Quantitative spectral and orientational analysis in surface sum frequency generation vibrational spectroscopy (SFG-VS), *Int. Rev. Phys. Chem.*, 24(2), 191–256.
- Woodbury, E.J., Ng, W.K. (1962) Ruby laser operation in near IR, *Proc. Inst. Radio Eng.*, 50(11), 2367.
- 81. Freudiger, C.W., Min, W., Saar, B.G., Lu, S., Holtom, G.R., He, C., Tsai,

J.C., Kang, J.X., Xie, X.S., (2008) Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy, *Science*, **322**(5909), 1857–1861.

- 82. Maker P.D. and Terhune R.W. (1965) Study of optical effects due to an induced polarization third order in the electric field strength, *Phys. Rev.*, 137(3A), A801.
- Zumbusch, A., Holtom G.R., Xie, X.S. (1999) Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering, *Phys. Rev. Lett.*, 82(20), 4142.
- Duncan, M.D., Reintjes, J., Manuccia, T.J. (1982) Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope, *Opt. Lett.*, 7(8), 350–352.
- Tuchina, D.K., Tuchin, V.V. (2018) Optical and structural properties of biological tissues under diabetes mellitus, *J. Biomed. Photonics Eng.*, 4(2), 20201.
- Pan, T., Li, M., Chen, J., Xue, H. (2014) Quantification of glycated hemoglobin indicator HbA1c through near-infrared spectroscopy, *J. Innov. Opt. Health Sci.*, 7(04), 1350060.
- 87. Briers, D., Duncan, D.D., Hirst, E.R., Kirkpatrick, S.J., Larsson, M., Steenbergen, W., Stromberg, T., Thompson, O.B. (2013) Laser speckle contrast imaging: theoretical and practical limitations, *J. Biomed. Opt.*, **18**(6), 66018.
- Dunn, A.K. (2012) Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow, *Ann. Biomed. Eng.* 40(2), 367–377.
- Briers, J.D. (2001) Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging, *Physiol. Meas.*, 22(4), R35.
- 90. Cheng, H., Luo, Q., Zeng, S., Chen, S., Luo, W., Gong, H. (2004) Hyperosmotic chemical agent's effect on in vivo cerebral blood flow revealed by laser speckle, *Appl. Opt.*, **43**(31), 5772–5777.

- Zhu, D., Larin, K.V, Luo, Q., Tuchin, V.V. (2013) Recent progress in tissue optical clearing, *Laser Photon. Rev.*, 7(5), 732–757.
- 92. Mao, Z., Han, Z., Wen, X., Luo, Q., Zhu, D. (2009) Influence of glycerol with different concentrations on skin optical clearing and morphological changes in vivo, *Proc. SPIE*, **7278**, 72781T.
- 93. Timoshina, P.A., Bucharskaya, A.B., Alexandrov, D.A., Tuchin, V.V. (2017) Study of blood microcirculation of pancreas in rats with alloxan diabetes by laser speckle contrast imaging, *J. Biomed. Photonics Eng.*, 3(2), 20301.
- 94. Омнипак (Omnipaque®) инструкция по применению https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_2438.htm, 02.11.2018.
- 95. Tuchin, V.V. (2006) Optical clearing of tissues and blood, PM 154, SPIE Press, Bellingham, WA. 256 p.
- 96. Kim, B.-M., Eichler, J., Reiser, K.M., Rubenchik, A.M., Da Silva, L.B. (2000) Collagen structure and nonlinear susceptibility: effects of heat, glycation, enzymatic cleavage on second harmonic signal intensity, *Lasers Surg. Med.*, 27(4), 329–335.
- 97. Tanaka, S., Avigad, G., Brodsky, B., Eikenberry, E. F. (1988) Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen, *J. Mol. Biol.*, 203(2), 495–505.
- 98. Mayrovitz, H.N., McClymont, A., Pandya, N. (2013) Skin tissue water assessed via tissue dielectric constant measurements in persons with and without diabetes mellitus, *Diabetes Technol. Ther.*, **15**(1), 60–65.
- 99. Dikht, N.I., Bucharskaya, A.B., Terentyuk, G.S., Maslyakova, G.N., Matveeva, O.V, Navolokin, N.A., Khlebtsov, N.G., Khlebtsov, B.N. (2014) Morphological study of the internal organs in rats with alloxan diabetes and transplanted liver tumor after intravenous injection of gold nanorods, *Russ. Open Med. J.*, 3(3), 301.

- 100. Lee, Y.-S. (2009) Principles of Terahertz Science and Technology, New York, Springer Science + Business Media, 340 p.
- 101. Zeitler, J.A., Taday, P.F., Newnham, D.A., Pepper, M., Gordon, K.C., Rades, T. (2007) Terahertz pulsed spectroscopy and imaging in the pharmaceutical setting-a review, *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**(2), 209–223.
- 102. Yang, X., Zhao, X., Yang, K., Liu, Y., Liu, Y., Fu, W. and Luo, Y. (2016) Biomedical applications of terahertz spectroscopy and imaging, *Trends Biotechnol.* 34(10), 810–824.
- 103. Berry, E., Walker, G.C., Fitzgerald, A.J., Zinov'ev, N.N., Chamberlain, M., Smye, S.W., Miles, R.E., Smith, M. A. (2003) Do in vivo terahertz imaging systems comply with safety guidelines? J. Laser Appl., 15(3), 192–198.
- 104. Titova, L.V, Ayesheshim, A.K., Golubov, A., Rodriguez-Juarez, R., Woycicki, R., Hegmann, F.A., Kovalchuk, O. Intense THz pulses down-regulate genes associated with skin cancer and psoriasis: a new therapeutic avenue? *Sci. Rep.*, **3**, 2363.
- 105. Torii, T., Chiba, H., Tanabe, T., Oyama, Y. (2017) Measurements of glucose concentration in aqueous solutions using reflected THz radiation for applications to a novel sub-THz radiation non-invasive blood sugar measurement method, *Digit. Heal.*, 3, 1–5.
- 106. Fyodorov, V.I., Serdyukov, D.S., Cherkasova, O.P., Popova, S.S., Nemova, E.F. (2017) The influence of terahertz radiation on the cell's genetic apparatus, *J. Opt. Technol.*, 84(8), 509–514.
- 107. Wallace, V.P., Fitzgerald, A.J., Shankar, S., Flanagan, N., Pye, R., Cluff, J., Arnone, D.D. (2004) Terahertz pulsed imaging of basal cell carcinoma ex vivo and in vivo, *Br. J. Dermatol.*, **151**(2), 424–432.

- 108. Joseph, C.S., Patel, R., Neel, V.A., Giles, R.H., Yaroslavsky, A.N. (2014) Imaging of ex vivo nonmelanoma skin cancers in the optical and terahertz spectral regions optical and terahertz skin cancers imaging, *J. Biophotonics*, 7(5), 295–303.
- 109. Zaytsev, K.I., Kudrin, K.G., Karasik, V.E., Reshetov, I.V, Yurchenko, S.O. (2015) In vivo terahertz spectroscopy of pigmentary skin nevi: Pilot study of non-invasive early diagnosis of dysplasia, *Appl. Phys. Lett.*, **106**(5), 53702.
- 110. Ashworth, P. C., Pickwell-MacPherson, E., Provenzano, E., Pinder, S. E., Purushotham, A. D., Pepper, M., Wallace, V. P. (2009) Terahertz pulsed spectroscopy of freshly excised human breast cancer, *Opt. Express*, **17**(15), 12444–12454.
- 111. Reid, C. B., Fitzgerald, A., Reese, G., Goldin, R., Tekkis, P., O'Kelly, P. S., Pickwell-MacPherson, E., Gibson, A. P., Wallace, V. P. (2011) Terahertz pulsed imaging of freshly excised human colonic tissues, *Phys. Med. Biol.*, **56**(14), 4333.
- 112. Bin, Ji.Y., Oh, S.J., Kang, S.-G., Heo, J., Kim, S.-H., Choi, Y., Song, S., Son, H.Y., Kim, S.H., Choi, Y., Song, S., Son, H.Y., Kim, S.H. Lee, J.H., Haam, S.J., Huh, Y.M., Chang, J.H., Joo, C., Suh, J.S. (2016) Terahertz reflectometry imaging for low and high grade gliomas, *Sci. Rep.*, 6, 36040.
- Pickwell, E., Cole, B.E., Fitzgerald, A.J., Wallace, V.P., Pepper,M. (2004) Simulation of terahertz pulse propagation in biological systems, *Appl. Phys. Lett.*, 84(12), 2190–2192.
- 114. Laurette, S., Hatirnaz, B., Treizebre, A., Affouard, F., Bocquet, B. (2013) Terahertz microfluidic sensor for in situ exploration of hydration shell of molecules, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **123**, 28–35.
- 115. Morozov, N.A. (1907) Periodic Systems of the Structure of Matter: The Theory of the Formation of

Chemical Elements / Ed. I.D.Sytin, 480 p.

- 116. Nagai, M., Yada, H., Arikawa, T., Tanaka, K. (2006) Terahertz timedomain attenuated total reflection spectroscopy in water and biological solution, *Int. J. Infrared Millimeter Waves*, **27**(4), 505–515.
- 117. Shiraga, K., Ogawa, Y., Kondo, N., Irisawa, A., Imamura, M. (2013) Evaluation of the hydration state of saccharides using terahertz timedomain attenuated total reflection spectroscopy, *Food Chem.*, **140**(1– 2), 315–320.
- 118. Arikawa, T., Nagai, M., Tanaka, K. (2008) Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, **457**(1–3), 12–17.
- 119. Yada, H., Nagai, M., Tanaka, K. (2008) Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz timedomain attenuated total reflection spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **464**(4–6), 166–170.
- Cherkasova, O.P., Nazarov, M.M., Angeluts, A.A., Shkurinov, A.P. (2016) The Investigation of blood plasma in the terahertz frequency range, *Opt. Spectrosc.*, **120**(1), 50–57.
- 121. Tielrooij, K.J., Paparo D., Piatkowski L., Bakker H. J., Bonn M. (2009) Dielectric relaxation dynamics of water in model membranes probed by terahertz spectroscopy, *Biophys. J.* 97(9), 2484–2492.
- 122. Auston, D.H. (1975) Picosecond optoelectronic switching and gating in silicon, *Appl. Phys. Lett.*, **26**(3), 101–103.
- 123. Martin, P.C. (1967) Sum rules, Kramers-Kronig relations, transport coefficients in charged systems, *Phys. Rev.*, **161**(1), 143.
- 124. Griffith, P.R. and De Haseth, J.A. (1986) Fourier transform infrared spectroscopy, *Chem. Anal. Ser.*, 656 p.

- 125. Komandin, G.A., Chuchupal, S.V, Lebedev, S.P., Goncharov, Y.G., Korolev, A.F., Porodinkov, O.E., Spektor, I.E., Volkov, A.A. (2013) BWO generators for terahertz dielectric measurements, *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.*, 3(4), 440–444.
- 126. Sun, C.-K., Chen, H.-Y., Tseng, T.-F, You, B., Wei, M.-L., Lu, J.-Y., Chang, Y.-L., Tseng, W.-L., Wang, T.-D. (2018) High Sensitivity of T-Ray for Thrombus Sensing, *Sci. Rep.*, 8(1), 3948.
- 127. Zaytsev, K.I., Gavdush, A.A., Chernomyrdin, N.V, Yurchenko, S.O. (2015) Highly accurate in vivo terahertz spectroscopy of healthy skin: Variation of refractive index and absorption coefficient along the human body, *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.*, 5(5), 817–827.
- Smolyanskaya, O.A., Kravtsenyuk, O.V., Panchenko, A.V., Odlyanitskiy, E.L., Guillet, J.P., Cherkasova, O.P., Khodzitsky, M.K. (2017) Study of blood plasma optical properties in mice grafted with Ehrlich carcinoma in the frequency range 0.1–1.0 THz, *Quantum Electron.*, 47(11), 1031–1040.
- 129. Smolyanskaya, O.A., Schelkanova, I.J., Kulya, M.S., Odlyanitskiy, E.L., Goryachev, I.S., Tcypkin, A.N., Grachev, Y.V., Toropova, Y.G., Tuchin, V.V. (2018) Glycerol dehydration of native and diabetic animal tissues studied by THz-TDS and NMR methods, *Biomed. Opt. Express*, 9(3), 1198–1215.
- 130. Serita, K., Matsuda, E., Okada, K., Murakami, H., Kawayama, I., Tonouchi, M. (2018) Terahertz microfluidic chip sensitivity-enhanced with a few arrays of meta atoms. *Optical Sensors*, 3(5), 051603.
- Soltani, A., Neshasteh, H., Mataji-Kojouri, A., Born, N., Castro-Camus, E., Shahabadi, M., Koch, M.

(2016) Highly sensitive terahertz dielectric sensor for small-volume liquid samples, *Appl. Phys. Lett.*, **108**(19), 191105.

- 132. Skorobogatiy, M. (2009) Microstructured and photonic bandgap fibers for applications in the resonant bio-and chemical sensors, *J. Sensors*, **2009**, 524237.
- 133. Xie, L., Gao, W., Shu, J., Ying, Y., Kono, J. (2015) Extraordinary sensitivity enhancement by metasurfaces in terahertz detection of antibiotics, *Sci. Rep.*, 5, 8671.
- Serita, K., Mizuno, S., Murakami, H., Kawayama, I., Takahashi, Y., Yoshimura, M., Mori, Y., Darmo, J., Tonouchi, M. (2012) Scanning laser terahertz near-field imaging system, *Opt. Express*, **20**(12), 12959–12965.
- 135. Zhang, Y., Zhou, W., Wang, X., Cui, Y., Sun, W. (2008) Terahertz digital holography, *Strain*, **44**(5), 380–385.
- 136. Petrov, N.V, Kulya, M.S., Tsypkin, A.N., Bespalov, V.G., Gorodetsky, A. (2016) Application of terahertz pulse time-domain holography for phase imaging. *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.*, 6(3), 464–472.
- Guerboukha, H., Nallappan, K., Skorobogatiy, M. Exploiting k-space/frequency duality toward realtime terahertz imaging, *Optica*, 5(2), 109–116.
- 138. Krozer, V., Loffler, T., Dall, J., Kusk, A., Eichhorn, F., Olsson, R.K., Buron, J.D., Jepsen, P.U., Zhurbenko, V., Jensen, T. (2010) Terahertz imaging systems with aperture synthesis techniques, *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, **58**(7), 2027–2039.
- 139. Chen, H.-T., Kersting, R., Cho, G.C. (2003) Terahertz imaging with nanometer resolution. *Appl. Phys. Lett.*, **83**(15), 3009–3011.
- 140. Planken, P. (2008) Microscopy: A terahertz nanoscope, *Nature*, **456** (7221), 454.

- 141. Luk'yanchuk, B.S., Paniagua-Dominguez, R., Minin, I., Minin, O., Wang, Z. (2017) Refractive index less than two: photonic nanojets yesterday, today and tomorrow, *Opt. Mater. Express*, 7(6), 1820–1847.
- 142. Nguyen Pham, H.H., Hisatake, S., Minin, O.V., Nagatsuma, T., Minin, I.V. (2017) Enhancement of spatial resolution of terahertz imaging systems based on terajet generation by dielectric cube, *APL Photonics*, 2(5), 56106.
- 143. Yue, L., Yan, B., Monks, J.N., R. Dhama, R., Wan, Z., Minin, O.V., Minin, I.V., (2018) A millimetrewave cuboid solid immersion lens with intensity-enhanced amplitude mask apodization, J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves, 39(6), 546–552.
- 144. Chernomyrdin, N.V., Schadko, A.O., Lebedev, S.P., Tolstoguzov, V.L., Kurlov, V.N., Reshetov, I.V, Spektor, I.E., Skorobogatiy, M., Yurchenko, S.O., Zaytsev, K.I. (2017) Solid immersion terahertz imaging with sub-wavelength resolution, *Appl. Phys. Lett.*, **110**(22), 221109.
- 145. Chernomyrdin N.V, Kucheryavenko, A.S., Malakhov, K.M., Schadko, A.O., Komandin G.A., Lebedev, S.P., Dolganova I.N., Kurlov, V.N., Lavrukhin, D.V, Ponomarev, D.S. et al. (2018) Terahertz solid immersion microscopy for sub-wavelength-resolution imaging of biological objects and tissues. *Proc.* SPIE, 10716, 1071606.
- 146. Chernomyrdin, N.V, Kucheryavenko, A.S., Kolontaeva, G.S., Katyba, G.M., Karalkin, P.A., Parfenov, V.A., Gryadunova, A.A., Norkin, N.E., Smolyanskaya, O.A., Minin, O.V. et al. (2018) A potential of terahertz solid immersion microscopy for visualizing sub-wavelength-scale tissue spheroids, *Proc. SPIE*, **10677**, 106771Y.

- 147. Shiraga, K., Suzuki, T., Kondo, N., De Baerdemaeker, J., Ogawa, Y. (2015) Quantitative characterization of hydration state and destructuring effect of monosaccharides and disaccharides on water hydrogen bond network, *Carbohydr. Res.*, **406**, 46–54.
- 148. Lee, D., Kang, J.-H., Lee, J.-S., Kim, H.-S., Kim, C., Kim, J. H., Lee, T., Son, J.-H., Park, Q.-H., Seo, M. (2015) Highly sensitive and selective sugar detection by terahertz nano-antennas, *Sci. Rep.*, 5, 15459.
- 149. Cherkasova, O.P., Nazarov, M.M., Shkurinov, A.P. (2016) Investigation of bovine serum albumin glycation by THz spectroscopy, *Proc. SPIE*, **9917**, 991706.
- Mernea, M., Ionescu, A., Vasile, I., Nica, C., Stoian, G., Dascalu, T., Mihailescu, D. F. (2015) In vitro human serum albumin glycation monitored by Terahertz spectroscopy, *Opt. Quantum Electron.*, 47(4), 961–973.
- 151. Heyden, M., Bründermann, E., Heugen, U., Niehues, G., Leitner, D.M., Havenith, M. (2008) Long-Range Influence of Carbohydrates on the Solvation Dynamics of Water? Answers from Terahertz Absorption Measurements and Molecular Modeling Simulations, J. Am. Chem. Soc., 130(17), 5773–5779.
- 152. Leitner, D.M., Gruebele, M., Havenith, M. (2008) Solvation dynamics of biomolecules: modeling and terahertz experiments, *HFSP J.*, 2(6), 314–323.
- 153. Cherkasova, O.P., Nazarov, M.M., Smirnova, I.N., Angeluts, A.A., Shkurinov, A.P. (2014) Application of time-domain THz spectroscopy for studying blood plasma of rats with experimental diabetes, *Phys. Wave Phenom.*, 22(3), 185–188.
- 154. Chen, H., Chen, X., Ma, S., Wu, X., Yang, W., Zhang, W., Li, X. (2018)

Quantify glucose level in freshly diabetic's blood by terahertz timedomain spectroscopy, *J. Infrared*, *Millimeter*, *Terahertz Waves*, **39**(4), 399–408.

- 155. Markelz, A.G., Roitberg, A., Heilweil, E.J. (2000) Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz, *Chem. Phys. Lett.*, **320**(1–2), 42–48.
- 156. Tsai, Y.-F., Tseng T.-F., Chen H., Lu J.-T., Lee W.-J., Wang T.-D., Sun C.-K. (2012) In vivo t-ray imaging of blood glucose level in diabetic mice. *Proc. Int. Symp. Front. THz Technol.*, 1, 26–30.
- 157. Tuchin V.V. (Ed.) (2009) Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues. CRC Press, Taylor & Francis Group, London. 709 p.
- 158. Fine, I. (2009) Glucose correlation with light scattering patterns, *Hand*-

book of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues. Tuchin V.V. (Ed.) CRC Press, Taylor & Francis Group, London, 237–280.

- 159. Tseng, T.-F., Yang, S.-C., Shih, Y.-T., Tsai, Y.-F., Wang, T.-D., Sun, C.-K. (2015) Near-field sub-THz transmission-type image system for vessel imaging in-vivo, Opt. Express, 23(19), 25058–25071.
- 160. Cherkasova, O.P., Nazarov, M.M., Berlovskaya, E.E., Angeluts, A.A., Makurenkov, A.M, Shkurinov, A.P. (2016) Studying human and animal skin optical properties by terahertz time-domain spectroscopy, *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.*, **80**(4), 479–483.
- 161. Schaefer H., Redelmeier T.E. (1996) Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption, Karger, Basel, 310 p.