

АНАЛИТИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЛЮОРОФОРА В БИОТКАНИ С УЧЕТОМ КРОВЕНАПОЛНЕНИЯ ПО ДАННЫМ НЕИНВАЗИВНЫХ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

И.А. Разницына

Московский областной научно-исследовательский клинический институт
им. М.Ф. Владимирского, Москва

Для лазерной флуоресцентной спектроскопии *in vivo* переход от измеряемых оптических величин к концентрациям флюорофоров в биоткани, учитывающий различия в их поглощающих и рассеивающих свойствах, – одна из наиболее актуальных задач. В работе представлен новый разработанный алгоритм расчета относительной концентрации флюорофора в биоткани по данным неинвазивных методов оптической диагностики. В основу алгоритма положено аналитическое решение обратной задачи распространения света в полубесконечной мутной флуоресцирующей среде с применением модифицированной модели Кубелки–Мунка. Предложенный алгоритм позволяет учесть различия в кровенаполнении биотканей, которое вносит существенный вклад в зарегистрированный спектр флуоресценции и, как следствие, влияет на интерпретацию полученных результатов.

Ключевые слова: оптическое излучение, теория Кубелки–Мунка, биоткани, концентрация флюорофора, кровенаполнение

Введение

Расчет концентрации флюорофоров в биологических тканях является одной из самых актуальных и нетривиальных задач лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) *in vivo*. ЛФС *in vivo* основана на анализе спектров флуоресценции, возникающей при освещении поверхности биоткани монохроматическим маломощным излучением. В клинической практике метод наиболее часто применяется для контроля фотодинамической терапии и навигации при хирургическом удалении опухолей, в том числе, эндоскопически [1].

Все устройства для флуоресцентного анализа *in vivo* работают по примерно одинаковому принципу. От лазерного источника возбуждающее излучение по осветительным волокнам оптоволоконного зонда подводится в поверхность биоткани. Приемное волокно зонда доставляет вторичное излучение от биотка-

ни в блок фильтров, который уменьшает диффузно отраженную часть на длине волны возбуждения, при этом незначительно влияя на флуоресцентную часть. Отфильтрованное излучение детектируется спектрометром. Существуют также системы, в которых регистрация флуоресцентного излучения проводится с помощью камеры, что позволяет получить флуоресцентное изображение объекта [2].

В настоящее время анализ данных ЛФС в большинстве случаев опирается на вычисление показателей, которые относятся, скорее к характеристикам зарегистрированного спектра флуоресценции, нежели к медико-биологическим данным. Часто анализируют площади под спектром флуоресценции, индексы тканевого содержания, коэффициенты флуоресцентной контрастности, рассчитанные по значениям зарегистрированных потоков на длинах волн флуоресценции $J(\lambda_e)$ и возбуждения $J(\lambda_e)$ и др. [3].

Отсутствие единого алгоритма вычисления содержания флюорофоров, как показателей состояния биологической ткани, объясняется сложностью учета влияния оптических свойств самой биоткани на регистрируемый сигнал. Так, интенсивность флюоресценции областей с различным кровенаполнением и одинаковым содержанием флюорофора может значительно отличаться, особенно в синезеленой части спектра, где поглощение света кровью наиболее выражено. Результаты исследования влияния характеристик биоткани на спектр флюоресценции описаны во многих работах [4, 5]. При этом отмечается, что именно различия в объемном кровенаполнении (V_b) являются основным фактором, определяющим неточность и разброс результатов ЛФС [6].

Работа устройств для ЛФС в режиме реального времени предъявляет высокие требования к скорости обработки данных, потому ограничивает множество используемых подходов и выдвигает аналитические алгоритмы расчета C_f как наименее ресурсозатратные, на первый план. Среди них для *in vitro* измерений часто используется уравнение Паркера для интенсивности флюоресценции в поглощающей флюоресцирующей среде [7]:

$$J(\lambda_p) = 2,3 \Phi_0(\lambda_e) \varphi(\lambda_e, \lambda_p) \varepsilon(\lambda_e) C_f d, \quad (1)$$

где Φ_0 – возбуждающий монохроматический поток света, $\varphi(\lambda_e, \lambda_p)$ – квантовый выход флюоресценции, ε – молярный коэффициент экстинкции флюорофора, зависящий от длины волны λ , C_f – молярная концентрация флюорофора в кювете, d – оптическая толщина кюветы с раствором.

Данная формула никак не учитывает ни поглощение излучения элементами биоткани, ни его рассеяние. Она справедлива только для разбавленных растворов [8], потому использовать ее для анализа измерений *in vivo* некорректно. Тем не менее, опираясь на уравнение (2), в работах часто полагают, что $J(\lambda_p)$ линейен по отношению к C_f [9, 10], а различия в оптических свойствах самой биоткани условно “корректируют” учетом либо $J(\lambda_e)$ [11], либо данных измерений с интактных тканей [12]. Такие подходы также построены на ряде допущений. В первом случае – на равенстве оптических свойств объекта на длинах волн возбуждения λ_e и флюоресценции λ_p , во втором – на идентичности выбранных областей с точки зрения рассеивающих и поглощающих свойств. Да, при

малых концентрациях флюорофоров, которые характерны для биомедицины, зависимость $J(\lambda_p)$ от C_f можно принять за линейную. Однако в таком случае встает вопрос о нахождении тангенса угла наклона k этой линии, который, очевидно, зависит от коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния биоткани μ_s , меняющихся в зависимости от присутствующего объема крови V_b . Подробнее данная задача описана в [13].

Понимание необходимости в физически обоснованном способе расчета C_f в биологических средах, учитывающем оптические свойства среды во всем интересующем диапазоне длин волн, привели к появлению различных новых методик, приборов и алгоритмов для ЛФС. Современные устройства для флюоресцентного анализа помимо источников лазерного излучения обычно включают в себя широкополосный источник (белого света) для регистрации спектров диффузного отражения $r(\lambda)$ [14–16] с целью дальнейшего расчета μ_a и μ_s . Однако универсального и обоснованного алгоритма “коррекции” спектров флюоресценции на V_b или расчетов C_f по данным спектроскопии диффузного отражения (СДО) на сегодняшний день пока нет.

Ряд исследователей для учета влияния V_b используют Монте-Карло-моделирование. С заданными кровенаполнением, сатурацией, толщиной слоев кожи и другими характеристиками среды моделируют спектры диффузного отражения, которые формируют обучающую выборку для нейросети, после чего, анализируя зарегистрированные спектры, она подбирает наиболее вероятные параметры биоткани. В работе [15] такой подход используется для определения оптимального давления на оптоволоконный зонд, при котором влияние кровенаполнения на флюоресценцию будет минимальным при высокой воспроизводимости результатов. Такой метод, безусловно, представляет интерес, однако расчетные алгоритмы содержания флюорофора в биоткани с применением данного подхода на сегодняшний день не опубликованы. Возможно, это связано с большим количеством варьируемых параметров при формировании обучающей выборки и неоднозначностью их определения при решении обратной задачи. Важным вопросом остается, как именно учесть восстановленные нейросетью показатели среды (сатурацию, объемные концентрации меланина и фракций гемоглобина и др.) в расчетах C_f ?

Классическими остаются аналитические подходы, построенные на теории переноса излучения. Нетривиальность решения задач распространения света в мутных флюоресцирующих средах приводит к необходимости упрощать модели и использовать допущения, ограничивающие применимость разработанных вычислительных алгоритмов. Тем не менее, поиск таких алгоритмов актуален, поскольку полученные формулы легко внедрить в программное обеспечение диагностических комплексов и в режиме реального времени выводить на экран компьютера рассчитанное значение C_f . В качестве примера можно привести алгоритм и устройство, его реализующее, описанные в [16]. Здесь авторы используют диффузионное приближение и опираются на априорно постулированную взаимосвязь μ_s от длины волны λ . Такой метод справедлив только в ограниченном диапазоне μ_s , который в свою очередь зависит от геометрии измерения, а именно, от расстояния между осветительным и приемным волокном. Несмотря на ограничения, данный способ используется в современных исследованиях [17]. Тем не менее, поиск более универсальных способов аналитического расчета концентраций флюорофоров в биотканях при измерениях *in vivo* остаётся актуальным.

В данной работе предложен один из новых подходов к расчету относительных концентраций флюорофоров в биотканях.

Теоретические основы предлагаемого алгоритма

В теории переноса излучения в оптике биотканей часто используется диффузионное приближение и реже – модель Кубелки–Мунка (КМ) [18]. В ЛФС *in vivo* осветительные и приемные волокна располагаются на небольшом расстоянии друг от друга, при котором диффузионное приближение не работает [8]. Потому в основу данной работы легла модифицированная двухпоточковая модель КМ [19]. Ранее, применив ее к одномерной полубесконечной мутной среде с равномерным поглощением, распределением рассеивателей и флюорофора [20], мы получили выражение для потока флюоресценции с поверхности исследуемого объекта J [Вт]:

$$J = \Phi_0 \cdot A_f(\lambda_e) \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot \gamma. \quad (2)$$

Здесь Φ_0 [Вт] – возбуждающий монохроматический поток, $A_f(\lambda_e)$ [см⁻¹] – часть возбуждающего потока, поглощенного флюорофором на элементарной единице длины dx среды:

$$A_f(\lambda_e) = \{\beta_1(\lambda_e) - \beta_2(\lambda_e)\}_{C_f \neq 0} - \{\beta_1(\lambda_e) - \beta_2(\lambda_e)\}_{C_f = 0}. \quad (3)$$

где λ_e, λ_f – длины волн возбуждения и флюоресценции, соответственно, $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$ – квантовый выход флюоресценции, $\beta_1(\lambda)$ [см⁻¹] и $\beta_2(\lambda)$ [см⁻¹] – коэффициенты затухания и рассеяния исследуемой ткани для модифицированной модели КМ; γ [см] – эффективная глубина регистрации сигнала, выражающаяся по формуле [20]:

$$\gamma = \frac{(1 + r_{\omega\lambda e})(1 + r_{\omega\lambda f})}{2(\alpha(\lambda_e) + \alpha(\lambda_f))}, \quad (4)$$

где $\alpha(\lambda) = \sqrt{\beta_1^2(\lambda) - \beta_2^2(\lambda)}$, $r_{\omega\lambda}$ – коэффициент диффузного отражения ткани на длине волны λ , который может быть измерен методом СДО, а также рассчитан по формуле:

$$r_{\omega\lambda} = \frac{\beta_2(\lambda)}{\beta_1(\lambda) + \alpha_\lambda}. \quad (5)$$

В модифицированной модели КМ $\beta_1(\lambda)$, $\beta_2(\lambda)$ и $r_{\omega\lambda}$ выражаются через коэффициент поглощения $\mu_a(\lambda)$, плотность неоднородностей μ_p и коэффициент отражения (Френеля) $R(\lambda)$:

$$\begin{aligned} \beta_1(\lambda) &= \omega \cdot (\mu_a(\lambda) - \mu_p(\lambda) \ln(1 - R(\lambda)) + \mu_p \times \\ &\times \ln(1 - \omega(\lambda) + \sqrt{\omega^2(\lambda) - R^2(\lambda)} e^{-2\mu_a(\lambda)/\mu_p}) \\ &/ \sqrt{\omega^2(\lambda) - R^2(\lambda)} e^{-2\mu_a(\lambda)/\mu_p}, \\ \beta_2(\lambda) &= R(\lambda) \cdot e^{-2\mu_a(\lambda)/\mu_p} \cdot (\mu_a(\lambda) - \mu_p(\lambda) \ln(1 - R(\lambda)) + \mu_p \times \\ &\times \ln(1 - \omega(\lambda) + \sqrt{\omega^2(\lambda) - R^2(\lambda)} e^{-2\mu_a(\lambda)/\mu_p}) \\ &/ \sqrt{\omega^2(\lambda) - R^2(\lambda)} e^{-2\mu_a(\lambda)/\mu_p}, \end{aligned} \quad (6)$$

$$\text{где } \omega(\lambda) = \frac{1 - (1 - 2R(\lambda)) \cdot e^{-2\mu_a(\lambda)/\mu_p}}{2}.$$

Влияние C_f на величину J определяется зависимостью $\mu_a(C_f)$:

$$\begin{aligned} \mu_a(\lambda) &= \mu_{af}(\lambda_e) C_f + \mu_{at}(\lambda_e) (1 - C_f) \\ \mu_a(\lambda_f) &= \mu_{af}(\lambda_f) \end{aligned} \quad (7)$$

Здесь C_f – это относительные объемные концентрации флюорофоров в среде ($0 \leq C_f \leq 1$); μ_{af} – коэффициент поглощения флюорофора (как правило, известная величина), μ_{atiss} – коэф-

коэффициент поглощения биоткани, зависящий, в основном, от объемного кровенаполнения V_b :

$$\mu_{at}(\lambda) = \mu_{atiss}(\lambda)(1-V_b) + \mu_{abi}(\lambda)V_b, \quad (8)$$

где $\mu_{atiss}(\lambda)$ – коэффициент поглощения обескровленной тканью на длине волны λ , а $\mu_{abi}(\lambda)$ – коэффициент поглощения крови (известная величина [21]), V_b измеряется неинвазивными методами оптической тканевой оксиметрии (ОТО) или рассчитывается по данным СДО и выражается в относительных единицах ($0 \leq V_b \leq 1$).

Адаптация алгоритма для практического применения

Исходя из формул (2)–(8), практически все используемые величины, в частности, $\beta_1(\lambda)$, $\beta_2(\lambda)$, $A_f(\lambda_e)$ и γ сложным образом зависят от C_f и V_b . Напрямую однозначно определить искомые значения из представленных уравнений очень сложно. На практике представленные зависимости неприменимы. Поэтому для обоснования алгоритма проанализируем и при необходимости модифицируем уравнение (2) с учетом возможностей методов неинвазивной диагностики *in vivo* и свойств биотканей, как объектов исследования.

Примем во внимание следующее:

1. Для биотканей характерны небольшие концентрации флюорофоров. Например, для фотосенсибилизатора “Фотосенс”, разрешенного для клинического использования, C_f в крови достигает порядка 10^{-5} отн. ед., а, следовательно, в мягких тканях, слизистых и коже его C_f еще меньше. При таких концентрациях влиянием флюорофора на общие оптические свойства среды можно пренебречь. Следовательно, величина γ в уравнении (2) может быть принята за константу, так как по аналогии с множителем d уравнения (1), она характеризует биоткань с точки зрения эффективной глубины проникновения в нее излучения. Потому можем заключить, что основная зависимость $J(C_f)$ определяется множителем $A_f(\lambda_e)$.
2. Малые C_f также позволяют считать зависимость $J(C_f)$ линейной [9, 10].

Для аналитического определения коэффициента пропорциональности k потока флюоресценции J и C_f запишем линейный член раз-

ложения уравнения (2) в ряд Тейлора J_T в окрестностях точки $C_f=0$. Учитывая, что $J(C_f=0)=0$, получим:

$$J_T(C_f) = \Phi_0 \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot \frac{\partial A_f(0) \cdot \gamma(0)}{\partial C_f} \cdot C_f. \quad (9)$$

Теперь используем первый пункт и положим $\gamma = \text{const}$. Далее разложим (2) в ряд в окрестностях точки $C_f=0$ с условием, что зависимость $J(C_f)$ определяется только множителем $A_f(\lambda_e)$, и подробнее распишем линейный член разложения функции (2) в ряд Тейлора J_A :

$$J_A(C_f) = \frac{(\mu_{af}(\lambda_e) - \mu_{at}(\lambda_e))}{Z(\lambda_e)^2} \times \left. \left(\frac{(1-r_{\omega\lambda_e})^2}{(1+r_{\omega\lambda_e})^2} + \frac{(1-\omega(\lambda_e))}{\omega(\lambda_e)} \left[\frac{\beta_2(\lambda_e)}{\mu_p} - \frac{4r_{\omega\lambda_e}^2}{(1+r_{\omega\lambda_e})^2} \frac{\beta_1(\lambda_e)}{\mu_p} \right] \right) \right|_{C_f=0}, \quad (10)$$

$$\Phi_0 \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \frac{(1+r_{\omega\lambda_e})(1+r_{\omega\lambda_f})}{2(\alpha(\lambda_e) + \alpha(\lambda_f))} C_f,$$

где $Z(\lambda) = \sqrt{1 - \frac{4r^2(\lambda)}{(1+r^2(\lambda))^2}}$.

Оценим вклады линейных членов разложения (9) и (10) для различных оптических характеристик среды в исходную функцию (2) при малых C_f , не влияющих на поглощающие и рассеивающие свойства биоткани (рис. 1а), а также при больших C_f , где данным влиянием пренебречь нельзя (рис. 1б).

Отметим, что значение C_f , при котором зависимость $J(C_f)$ можно считать линейной, неодинаково для различных наборов оптических показателей (рис. 1б). Анализируя графики рис. 1, можно заметить, что $J_T(C_f)$ хорошо согласуется с зависимостью $J(C_f)$ только при малых концентрациях флюорофора, однако функция $J_A(C_f)$ (5) и при малых, и при больших концентрациях достаточно точно описывает исходную функцию (2). Следовательно, нелинейность может быть с высокой точностью описана величиной эффективной глубины регистрации сигнала γ [см]. Действительно, при увеличении концентрации флюорофоров в среде, они начинают оказывать заметное влияние на общие оптические свойства среды и, как следствие, на глубину проникновения излучения в биоткань. Данное объяснение нелинейности уже было упомянуто В. Шмидтом в [8] при определении

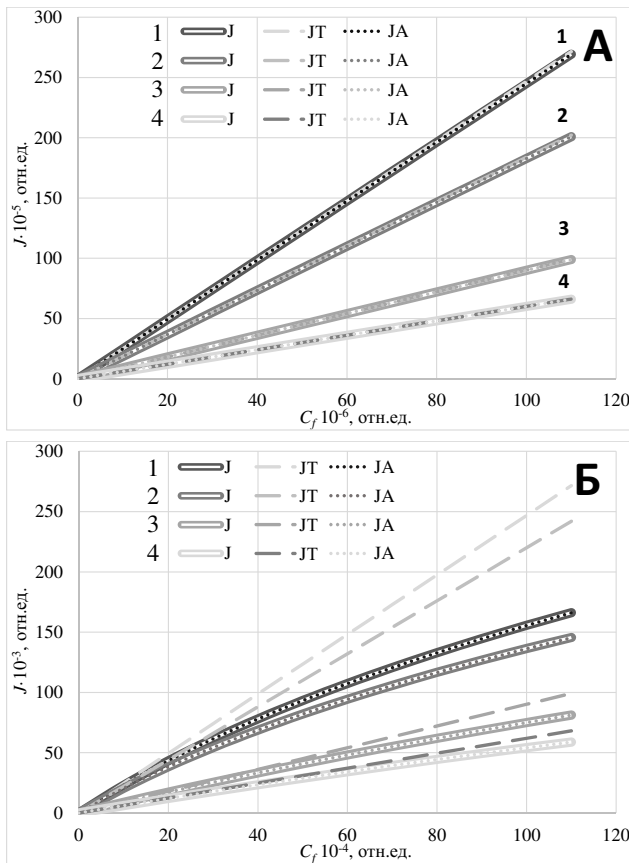


Рис. 1. Функции $J(C_f)$, $J_T(C_f)$ и $J_A(C_f)$. А – влияние C_f на оптические свойства биотканей пренебрежимо мало. Б – проявляется нелинейность функции (2), описанная в [19]. На данных графиках функции $J(C_f)$ и $J_A(C_f)$ практически неразличимы. Кривые 1–4 соответствуют следующим оптическим характеристикам среды: 1 – $\mu_a(\lambda_e)=2 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_{af}(\lambda_e)=500 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_e)=0,2$, $\mu_p=250 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_a(\lambda_f)=2 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_f)=0,2$; 2 – $\mu_a(\lambda_e)=1 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_{af}(\lambda_e)=200 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_e)=0,2$, $\mu_p=150 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_a(\lambda_f)=1 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_f)=0,2$; 3 – $\mu_a(\lambda_e)=3 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_{af}(\lambda_e)=200 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_e)=0,2$, $\mu_p=150 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_a(\lambda_f)=3 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_f)=0,2$; 4 – $\mu_a(\lambda_e)=10 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_{af}(\lambda_e)=300 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_e)=0,2$, $\mu_p=100 \text{ мм}^{-1}$, $\mu_a(\lambda_f)=10 \text{ мм}^{-1}$, $R(\lambda_f)=0,2$

границ применимости уравнения Паркера. Теперь для модифицированной модели КМ оно приняло математически обоснованное выражение.

Таким образом, функция $J_A(C_f)$ представляет для нас наибольший интерес, так как при ее использовании, во-первых, нет ограничений, связанных с малостью C_f , а во-вторых, в данной функции можно выделить множитель,

ответственный за влияние V_b на результаты ЛФС и, как следствие, за нелинейность. Обозначим его $k(V_b)$. Так как абсолютные значения J для нас не интересны, будем считать Φ_0 и $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$ константами, равными 1.

$$k(V_b) = \frac{(1-r_{\infty\lambda_e})^2}{(1+r_{\infty\lambda_e}^2)Z(\lambda_e)^2} \times \left(1 + \frac{2r_{\infty\lambda_e}}{(1+r_{\infty\lambda_e}^2)} \frac{(1-\omega(\lambda_e))}{\omega(\lambda_e)} \frac{\alpha(\lambda_e)}{\mu_p Z(\lambda_e)} \right)_{C_f=0} \times (11)$$

$$\times \frac{(\mu_{af}(\lambda_e) - \mu_{at}(\lambda_e))(1+r_{\infty\lambda_e})(1+r_{\infty\lambda_f})}{2(\alpha(\lambda_e) + \alpha(\lambda_f))}$$

Как уже было отмечено, этот коэффициент зависит непосредственно от оптических свойств самой биоткани, которые можно определить через регистрируемые коэффициенты диффузного отражения $r(\lambda)$. Для этого выразим из (5) и (6) все неизвестные в (11) величины через известные (табличные) либо через измеряемые. Получим:

$$\omega(\lambda) = R^2(\lambda) \sqrt{\frac{1 - 2R(\lambda)(1 - Z(\lambda)^2) - 1}{R^2(\lambda)(1 - Z(\lambda)^2)}} - 1 \quad (12)$$

$$\frac{\alpha(\lambda)}{\mu_p} = \frac{\mu_{at}(\lambda)}{\mu_p} - \ln(1 - R(\lambda)) + \ln(1 - \omega(\lambda) + \omega(\lambda)Z(\lambda)).$$

Для обработки экспериментальных данных множитель $(\mu_{af}(\lambda_e) - \mu_{at}(\lambda_e))$ уравнения (11) требует особого внимания: μ_{af} – характеристика флюорофора, т.е., как правило, известная величина; μ_{at} и μ_p – характеристики ткани, зависящие от кровенаполнения, отношение которых можно найти по результатам СДО из соотношения:

$$\frac{\mu_a(\lambda)}{\mu_p} = -\ln \frac{2r(\lambda)\omega(\lambda)}{R(\lambda)(1+r^2(\lambda))} \quad (13)$$

Так как в расчетах Φ_0 и φ были приняты за единицу, значения C_f теперь нормированы на поток. Для ясности обозначим эти величину \tilde{C}_f . Итого, для известных коэффициентов поглощения чистого флюорофора μ_{af} и обескровленной ткани $\mu_{atiss}(\lambda)$ и известных $R(\lambda)$

можно вычислить \tilde{C}_f по результатам ЛФС, СДО и/или ОТО по следующей формуле:

$$\tilde{C}_f = \frac{J(\lambda_f)}{k(V_b)}, \quad (14)$$

где $J(\lambda_f)$ – детектируемый поток на длине волны флюоресценции с поверхности биоткани, а $k(V_b)$ рассчитывается по данным СДО с применением формул (11–13) и табличных данных.

Апробация предложенного алгоритма на модельных средах

Верификация метода проводилась на модельных средах с заданным V_b , аналогичных тем, что использовались в работе [22]. Они представляют собой гомогенные среды с разными концентрациями (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 нг/мл) фотосенсибилизатора “Фотосенс” в физрастворе, в которые добавлялись различные объёмы эритроцитарной массы ($V_b=2\%$, 4%, 6%, 8% и 10% от общего объёма раствора) для моделирования различных μ_{at} и μ_p . Для разведения растворов использовались одноканальные пипеточные дозаторы с абсолютной погрешностью менее 30 мкл (при общем объёме раствора 50 мл) и электронные весы. Растворы помещались в цилиндрическую ёмкость из черного PLA-пластика с диаметром 3,5 см и высотой 7 см для минимизации отражения от поверхностей ёмкости.

Спектры флюоресценции и диффузного отражения детектировались при помощи прибора “Мультиком”. Данное устройство содержит маломощный лазер (5–6 мВт) с длиной волны $\lambda_e=635$ нм для возбуждения флюоресценции, импульсный источник белого света для регистрации спектров диффузного отражения, оптоволоконный зонд для доставки излучения от источников к среде и от модельной среды через блок фильтров в спектрометр. Максимум флюоресценции фотосенсибилизатора “Фотосенс” $\lambda_f=680-690$ нм. Схема прибора “Мультиком” и принцип его работы описаны в статье [23].

Осветительные волокна оптоволоконного жгута с диаметрами 100 мкм для всех источников (лазерного и белого света) располагаются по кругу, равномерно освещая область исследования, в центре расположено приемное волокно с диаметром 400 мкм. В процессе из-

мерений оптоволоконный зонд погружался в среду примерно на 1 мм.

Расчеты \tilde{C}_f по экспериментальным данным проводились при значениях $R=0,2$, известных из литературы [24], $\mu_{af}=168,35$ см⁻¹ [25], $\mu_{atiss}=0,1$ см⁻¹, $\mu_{abl}=36,5$ см⁻¹ [21] по формулам (11–14). Для удобства и наглядности все рассчитанные \tilde{C}_f нормировались на значение, рассчитанное для среды с максимальной концентрацией “Фотосенса” 300 нг/мл и $V_b=10\%$. Параллельно определялись коэффициенты флюоресцентной контрастности K_f , которые часто используются как количественные критерии при ЛФС *in vivo* [15, 26, 27]. Аналогично для сравнения отслеживалось относительное изменение данной величины. На графике (рис. 2)

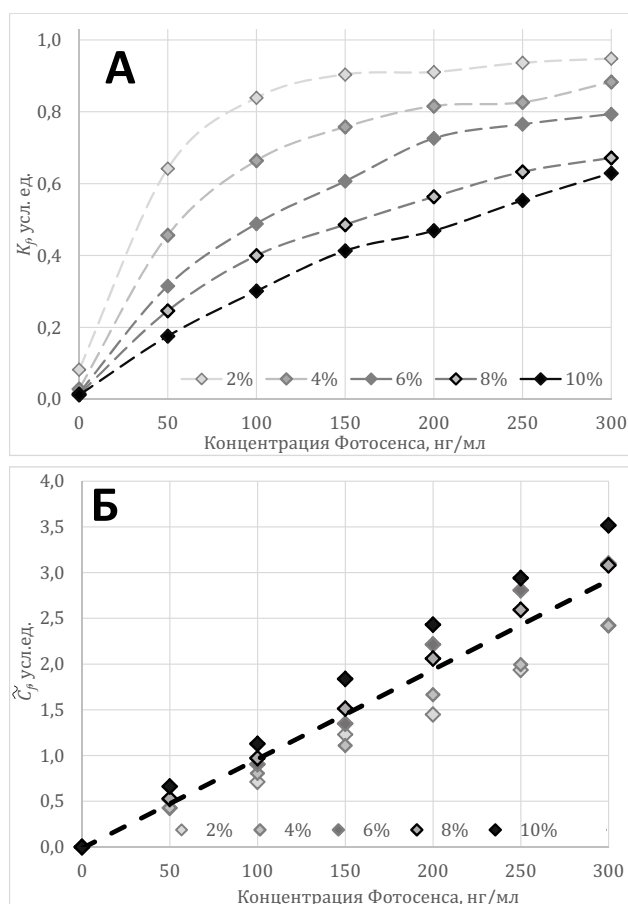


Рис. 2. А – рассчитанные значения относительных K_f для различных V_b . Б – рассчитанные по экспериментальным данным значения относительных \tilde{C}_f (14) для различных V_b

представлены значения рассчитанных \tilde{C}_f и K_f для различных концентраций эритроцитов V_b .

Из результатов анализа видно, что использование значений K_f для анализа содержания флюорофоров в биоткани может ввести в заблуждение. Предположение о том, что данная величина пропорционально растет с увеличением C_f [9] приводит к ошибкам в интерпретации данных. Для выполненного эксперимента погрешность определения относительного изменения содержания флюорофора в тканях по динамике K_f может составлять до 70 % в зависимости от V_b . Кроме того, изменение кровенаполнения исследуемой области значительно влияет на значения K_f (рис. 2а). При расчете \tilde{C}_f (рис. 2б) кровенаполнение учитывается, потому что разброс значений \tilde{C}_f в данном эксперименте составил менее 25 %.

Заключение

Внедрение новых технологий в клиническую практику всегда накладывает требования к удобству используемых приборов, однозначности интерпретации данных, к точности и воспроизводимости результатов исследования. ЛФС *in vivo* обладает большим потенциалом в решении ряда диагностических задач, однако основным недостатком метода является сложность в трактовке данных, которые сегодня носят физический, но не биомедицинский характер. Переход от измеряемых оптических величин к концентрациям флюорофоров в среде, то есть к понятным величинам для медицинской интерпретации, является текущей задачей многих исследовательских групп.

В работе предложен и обоснован новый аналитический алгоритм определения относительной концентрации флюорофора в мутной флуоресцирующей среде. В основу алгоритма положено решение обратной задачи распространения света в полубесконечной флуоресцирующей среде с применением модифицированной модели КМ. Предложенный алгоритм учитывает различия в кровенаполнении биотканей, что позволяет проводить сравнительную оценку изменения содержания флюорофоров, например, в локализациях с различной степенью васкуляризации. Алгоритм также мо-

жет снизить разброс результатов ЛФС, связанный с изменением положения датчика или его давления на биоткань в ходе исследования, однако данное предположение необходимо подтвердить экспериментально.

Список литературы

1. Myscek M.A., Pogue B.W. Handbook of Biomedical Fluorescence. – Boca Raton: CRC Press. 2003. 694 Pp.
2. Liu L., Huang Z., Qiu Z., Li B. Visualization of Porphyrin-Based Photosensitizer Distribution from Fluorescence Images *In Vivo* Using an Optimized RGB Camera // J. Appl. Spectrosc. 2018. Vol. 84. № 6. P. 1124–1130.
3. Рогаткин Д.А. Физические основы лазерной клинической флуоресцентной спектроскопии *in vivo*. Лекция // Мед. физика. 2014. № 4. С. 78–96.
4. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. 2-е изд., испр. и доп. – М.: Физматлит. 2010. 488 с.
5. Chen R., Li Y., Lin H. et al. The impact of blood content on skin spectra // In proc. SPIE Vol. 6445 "Optical Diagnostics and Sensing VII" edited by Gerard L.C., Priezhev A.V. – San Jose: SPIE – International Society for Optics and Photonics. 2007. P. 64450D.
6. Dunaev A.V., Dremin V.V., Zhrebtsov E.A. et al. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow // Medical Engineering & Physics. 2015. Vol. 37. № 6. P. 574–583.
7. Parker C.A., Rees W.T. Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency // Analyst. 1960. Vol. 85. № 1013. P. 587–600.
8. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. – М.: Техносфера. 2007. 368 с.
9. Рогаткин Д.А. Аппаратное, программное и методическое обеспечение неинвазивной спектрофотометрической диагностики. Дисс. д. т. н. М.: МОНИКИ, 2004. 405 с.
10. Золоторева Ю.О. Лазерно-спектроскопическое исследование наночастиц фталоцианина алюминия для флуоресцентной диагностики в стоматологии. Дисс. к. ф.-м. н. М.: МИФИ, 2019. 143 с.
11. Moncel B., Mahieu-William L., Armoiry X. et al. Two-peaked 5-ALA-induced PpIX fluores-

- cence emission spectrum distinguishes glioblastomas from low grade gliomas and infiltrative component of glioblastomas // *Biomed. Opt. Express*. 2013. Vol. 4. № 4. P. 548–558.
12. Филоненко Е.В., Каприн А.Д., Алексеев Б.Я. и соавт. Флуоресцентная диагностика рака мочевого пузыря с препаратом гексасенс – результаты многоцентрового клинического исследования // *Biomed. Photon.* 2017. Т. 6. № 1. С. 20–27.
 13. Гусева И.А., Рогаткин Д.А., Бувалая Е.С. Анализ люминесценции в мутных биологических средах // *Альманах клинической медицины*. 2017. Т. 45. № 2. С. 163–169.
 14. Xie Y., Thom M., Miserocchi A. Multi-scale spectrally resolved quantitative fluorescence imaging system: towards neurosurgical guidance in glioma resection // *In Proc. SPIE Vol. 10050 “Clinical and Translational Neurophotonics”* edited by Madsen S.J. – San Francisco: SPIE – International Society for Optics and Photonics. 2017. P. 1005002.
 15. Zharebtsov E., Dremin V., Zharkikh E. et al. Fibre optic probe for fluorescence diagnostics with blood influence compensation // *In Proc. SPIE Vol. 10493 “Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XV”* edited by Tuchin V.V. – San Francisco: SPIE – International Society for Optics and Photonics. 2018. P. 104931L.
 16. Kim A., Khurana M., Moriyama Y., Wilson B.C. Quantification of in vivo fluorescence decoupled from the effects of tissue optical properties using fiber-optic spectroscopy measurements // *J. Biomed. Opt.* 2010. Vol. 15. № 6. P. 067006.
 17. Bravo J.J., Olson J.D., Davis S.C. et al. Hyperspectral data processing improves PpIX contrast during fluorescence guided surgery of human brain tumors // *Scientific reports*. 2017. Т. 7. № 1. P. 1–13.
 18. Исимару А. Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. Т. 1. – М.: Мир. 1981. 280 с.
 19. Рогаткин Д.А. Об особенности в определении оптических свойств мутных биологических тканей и сред в расчетных задачах медицинской неинвазивной спектrophотометрии // *Мед. техника*, 2007. № 2. С. 10–17.
 20. Rogatkin D., Guseva I., Lapaeva L. Nonlinear behavior of the autofluorescence intensity on the surface of light-scattering biotissues and its theoretical proof // *J. Fluoresc.* 2015. Vol. 25. № 4. P. 917–924.
 21. Prahl S. Tabulated molar extinction coefficient for hemoglobin in water. Available at: <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html>, 1998.
 22. Raznitsyna I., Rogatkin D., Tarasov A. Determination of Luminophores Content in Light-Scattering Phantom Medium by Optical Methods // *In Radiation and Scattering of Electromagnetic Waves (RSEMW)*. IEEE, 2019. С. 404–407.
 23. Разницына И.А., Тарасов А.П., Рогаткин Д.А. Усовершенствованная система для флуоресцентного анализа *in vivo* в медицине // *Приборы и техника эксперимента*, 2020. № 2. С. 142–148.
 24. Burns J.M., Saager R., Majaron B. et al. Optical properties of biomimetic probes engineered from erythrocytes // *Nanotechnology*, 2016. Т. 28. № 3. С. 035101.
 25. Lukyanets E.A., Nemykin V.N. The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines and their analogs // *J. Porphyr. Phthalocya.* 2010. Т. 14. № 1. P. 1–40.
 26. Великанов Е.В., Терещенко С.Г., Лапаева Л.Г. и соавт. Возможности эндоскопической лазерной биоспектрофотометрии при заболеваниях пищеварительного тракта // *Неотложная медицинская помощь*, 2012. № 4. С. 26–29.
 27. Цапко Л.П., Евтушенко А.В., Евтушенко В.В., Ципилев В.П. Метод лазерной флуоресцентной диагностики в оценке состояния миокарда в режиме реального времени в условиях оперативного кардиохирургического вмешательства // В сб. “Высокие технологии в современной науке и технике (ВТСНТ-2017)” Под ред. Яковлева А. Н. – Томск: Изд-во ТПУ, 2017. С. 167–168.

**ANALYTICAL ALGORITHM FOR CALCULATION OF THE FLUOROPHORE CONCENTRATION
TAKING INTO ACCOUNT THE BLOOD CONTENT IN LIVING TISSUE BASED ON THE DATA
OF NON-INVASIVE OPTICAL METHODS**

I.A. Raznitsyna

Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

Conversion from measured optical values to fluorophore concentrations in living tissues considering the differences in their absorbing and scattering properties is one of the most significant and topical problem in the field of the laser fluorescence spectroscopy. The article presents an analytical algorithm for calculating the relative fluorophore concentration in living tissue with the use of non-invasive optical diagnostic methods *in vivo*. The algorithm is based on the solution of the inverse problem of light propagation in a semi-infinite turbid fluorescent medium with the use of a modified Kubelka–Munk model. The proposed algorithm allows to take into account differences in the blood supply to living tissues, which makes a significant contribution to the recorded fluorescence spectrum and, as a result, affects the interpretation of the obtained results.

Key words: *optical radiation, Kubelka–Munk theory, biological tissue, fluorophore concentration, blood filling*

E-mail: raznitsynaIA@yandex.ru