



Анализ люминесценции в мутных биологических средах

Гусева И.А.^{1,2} • Рогаткин Д.А.^{1,3} • Бувалая Е.С.^{1,4}

Гусева Ирина Андреевна – техник лаборатории медико-физических исследований¹, аспирант факультета экспериментальной и теоретической физики²

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–9, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 681 89 84.

E-mail: gusevairinaand@gmail.com

Рогаткин Дмитрий Алексеевич – д-р техн. наук, заведующий лабораторией медико-физических исследований¹, научный руководитель программ и проектов³

Бувалая Екатерина Сергеевна – лаборант лаборатории медико-физических исследований¹, магистр физического факультета⁴

Актуальность. Количественный люминесцентный анализ широко используется в биологии, лабораторной диагностике и клинической медицине для исследования объектов на различных уровнях. Однако существующие упрощенные алгоритмы расчета концентрации люминофоров в разбавленных линейных растворах не могут быть применены к условиям мутных сред с сильным светорассеянием, к которым относятся большинство живых биологических тканей. Сегодня развитие люминесцентного анализа в медицине идет по пути создания неразрушающих и неинвазивных методик контроля *in vivo*. В этой связи вопрос о постановке задачи исследования и разработки алгоритмов вычислений концентрации люминофоров по регистрируемому спектру люминесценции в условиях мутных сред представляется актуальным. **Цель** – формулировка и обоснование задачи разработки алгоритмов вычислений концентрации люминофоров по регистрируемому спектру люминесценции в условиях оптически мутных сред. **Материал и методы.** Рассматривалось физико-математическое моделирование процесса формирования вынужденного излучения флуоресценции в светорассеивающей среде на основе модифицированной двухпоточковой модели Кубелки – Мунка. Проводилась серия лабораторных

экспериментов с макрооднородными светорассеивающими модельными средами на основе натуральных препаратов крови для выяснения характера реальной зависимости регистрируемой с поверхности оптически мутной биологической среды интенсивности флуоресценции от фактора светорассеяния и концентрации флуорофора в среде. **Результаты.** И теоретические, и экспериментальные результаты демонстрируют сложную нелинейную зависимость регистрируемой интенсивности флуоресценции от оптических свойств среды и концентрации флуорофора в среде. Эта зависимость сильно отличается от известного линейного решения Паркера для прозрачных сред, что приводит к невозможности его применения в условиях оптически мутных сред. **Заключение.** Необходимо дальнейшее развитие исследований в направлении поиска замкнутого аналитического решения обратной задачи оптики светорассеивающих и флуоресцирующих сред для вычисления по регистрируемому потоку люминесценции концентрации люминофора в светорассеивающей среде.

Ключевые слова: спектроскопия, люминесценция, концентрация, оптически мутная среда

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-163-169

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; 115409, г. Москва, Каширское шоссе, 31, Российская Федерация

³ ООО «Центр исследований и разработок ЭОС-Медика»; 117246, г. Москва, Научный проезд, 8/1, Российская Федерация

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ); 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1–2, Российская Федерация

Явление люминесценции основано на возбуждении атомов и/или молекул, возникающем в среде вследствие перехода электронов на новый энергетический уровень после поглощения энергии падающих фотонов и переизлучения квантов света с большей длиной волны при переходе возбужденных атомов и/или молекул назад в основное состояние [1]. В зависимости от энергетического уровня, с которого атом или молекула переходит в основное состояние, люминесценцию принято разделять на флуоресценцию и фосфоресценцию [2]. Регистрируя излучение люминесценции, можно получать информацию о содержании и динамике накопления различных люминофоров в клетках и тканях [3, 4]. Методы люминесцентного анализа нашли широкое применение в области исследования биологических сред на различных уровнях благодаря их высокой чувствительности [1, 3]. Самые простые качественные методы анализа используются для визуального определения факта наличия тех или иных веществ в объекте [1, 5]. Но современные компьютеризированные лабораторные спектральные приборы позволяют осуществлять и количественный анализ состава исследуемых сред, для чего используют различные калибровочные кривые и/или аналитические модели расчета концентраций люминофоров в растворах [3–6].

Сегодня развитие люминесцентного анализа в медицине идет уже по пути создания неразрушающих и неинвазивных методик мониторинга и контроля *in vivo* [4, 7]. В частности, такие методики лазерной флуоресцентной спектроскопии находят свое применение в диагностике при процедурах фотодинамической терапии, во флуоресцентной навигации при хирургическом

удалении опухолей головного мозга, в контроле потребления лекарственных препаратов, оценке содержания коллагена в тканях, порфирина при гипоксических состояниях и т.д. [7–11]. Однако существующие упрощенные алгоритмы калибровки и расчета концентрации люминофоров в разбавленных линейных растворах *in vitro* не могут быть применены к условиям мутных сред с сильным светорассеянием. А к таким средам относятся большинство живых биологических тканей. В этой связи важным представляется вопрос о постановке задачи исследования и разработки алгоритмов вычислений концентрации люминофоров по регистрируемым спектрам люминесценции в условиях мутных сред. Особенно актуален количественный анализ при определении содержания витаминов, гормонов, антибиотиков в таких биологических объектах, как кровь, моча, мягкие ткани и др. [5, 6].

В данной статье формулируется и обосновывается проблема количественного определения концентрации люминесцирующих веществ в мутных биологических тканях и средах на примере лазерной флуоресцентной спектроскопии в режиме регистрации обратно рассеянного света.

Материал и методы

Проводилась серия лабораторных экспериментов с модельными средами для выяснения характера существующей зависимости регистрируемой с поверхности оптически мутной биологической среды интенсивности флуоресценции от фактора светорассеяния. В качестве модельной среды использовались гомогенные растворы разных концентраций в диапазоне 0–350 нг/мл фталоцианина алюминия в физиологическом растворе

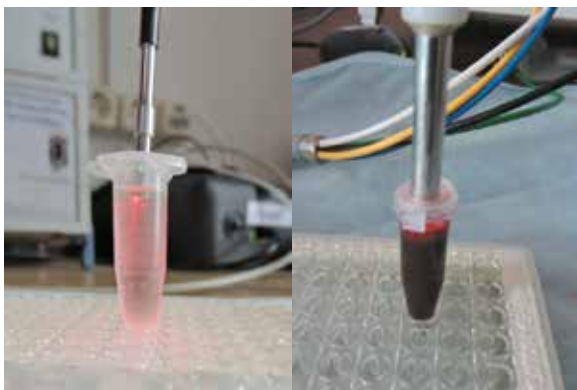


Рис. 1. Геометрия измерения флуоресценции с поверхности модельных растворов с помощью оптоволоконного зонда в режиме регистрации обратно рассеянного излучения



Рис. 2. Лазерный диагностический комплекс ЛАКК-М

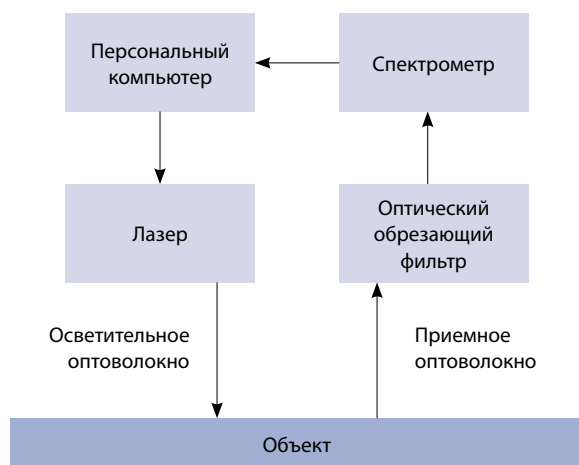


Рис. 3. Упрощенная блок-схема измерений на основе лазерного спектроскопического комплекса ЛАКК-М

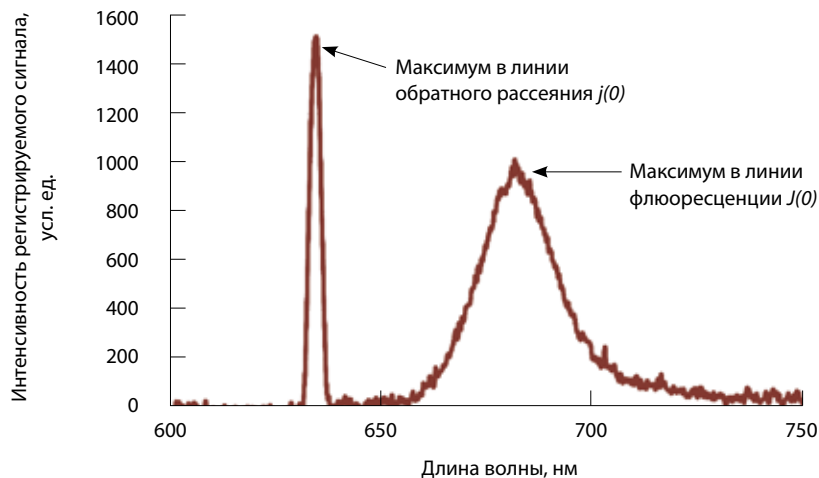


Рис. 4. Регистрируемый суммарный спектр вторичного излучения

(стандартный флуоресцирующий препарат-фотосенсибилизатор Фотосенс, разрешенный для клинического применения), в которые добавлялись различные небольшие объемы крови группы 1 – 0,6, 1,15 и 2,3% от общего объема раствора. Полученные модельные среды-суспензии помещались в микропробирку объемом 1,5 мл. К ее поверхности подводился дистальный конец диагностического оптоволоконного зонда регистрирующей лазерной спектроскопической системы ЛАКК-М. В отличие от использовавшихся в нашей предыдущей теоретической работе [12] искусственных светорассеивающих модельных мер с одной большой неоднородностью внутри, которые моделировали опухоль, в данном исследовании изучалась макрооднородная светорассеивающая модельная среда на основе натуральных препаратов крови.

Измерения спектров флуоресценции проводились с помощью многофункционального лазерного спектроскопического комплекса ЛАКК-М [8], который имеет в своем составе канал регистрации флуоресценции (рис. 1). Комплекс ЛАКК-М разрешен к применению в медицине именно для целей неинвазивной лазерной клинической диагностики *in vivo*. Режим работы комплекса в данном исследовании – «Флуоресценция» (рис. 2).

Для возбуждения флуоресценции в исследуемых объектах комплекс оснащен тремя маломощными непрерывными лазерами с разными длинами волн. В нашем исследовании для возбуждения флуоресценции фталоцианина алюминия в модельной среде использовался полупроводниковый лазер с длиной волны

$\lambda_e = 635$ нм, мощность которого была порядка 5 мВт с выхода оптического волокна. Блок-схема измерений в режиме регистрации обратно рассеянного излучения приведена на рис. 3.

Излучение от лазера доставляется к поверхности исследуемого объекта по осветительному оптоволоконному волокну – одной из жил многожильного оптоволоконного зонда. Другая жила – приемное оптическое волокно. Оно собирает от объекта обратно рассеянное вторичное излучение и излучение флуоресценции и доставляет их совместно через обрезавший оптический фильтр в спектрометр. Обрезающий оптический фильтр необходим для ослабления обратно рассеянного излучения лазера на длине волны генерации до уровней, соизмеримых с уровнями излучения флуоресценции. В противном случае слабое излучение флуоресценции не будет видно на фоне яркого излучения лазера (коэффициент ослабления фильтра примерно равен $k = 1000$). Далее в спектрометре происходит разложение прошедшего фильтра излучения в оптический спектр, и весь этот спектр одновременно регистрируется линейным фотоприемником, преобразуясь в электрический сигнал, который затем усиливается и через стандартное устройство сопряжения подается для обработки в управляющий персональный компьютер. Спектр вторичного излучения, включая спектр флуоресценции, в этой схеме можно сразу наблюдать на экране монитора компьютера в реальном времени (рис. 4). При обработке результатов измерений диапазон длин волн флуоресценции выбирался равным области максимума флуоресценции фталоцианина алюминия в районе длины волны $\lambda_f = 680$ нм.

В теоретическом плане рассматривалось физико-математическое моделирование процесса распространения оптического излучения в мутных флуоресцирующих биологических тканях и средах. Использовалась одномерная модифицированная модель Кубелки – Мунка [12]. Приведем постановку задачи. В качестве модели биологической ткани была взята однослойная полубесконечная среда с равномерным распределением внутри нее флуорофора, рассеивателей и поглотителей света. Возбуждающий поток лазерного излучения Φ_0 с длиной волны возбуждения флуоресценции λ_e падает на левую границу среды ($x=0$) (рис. 5). Внутри среды этот поток распространяется слева направо вдоль оси x (обозначен как $i(x)$), поглощается хромофорами ткани и рассеивается на неоднородностях, формируя таким образом поток обратно рассеянного излучения $j(x)$. Часть суммарно распространяющегося в среде излучения ($i(x) + j(x)$), поглощенная флуорофором, индуцирует вынужденную флуоресценцию флуорофора на длине волны флуоресценции λ_f . Излучение флуоресценции также распространяется в среде в обоих направлениях (потоки флуоресценции обозначены $I(x)$ и $J(x)$), рассеивается и поглощается. Рассеивающие и поглощающие свойства среды на любой длине волны λ задаются коэффициентами затухания и обратного рассеяния $\beta_1(\lambda)$ [мм^{-1}] и $\beta_2(\lambda)$ [мм^{-1}] соответственно. Флуорофор, распределенный внутри биологической среды, характеризуется своей относительной объемной концентрацией C_f , выраженной в относительных единицах ($0 < C_f < 1$), а также коэффициентом поглощения излучения μ_{af} , который зависит от длины волны излучения λ . Требуется найти явный вид зависимости регистрируемых

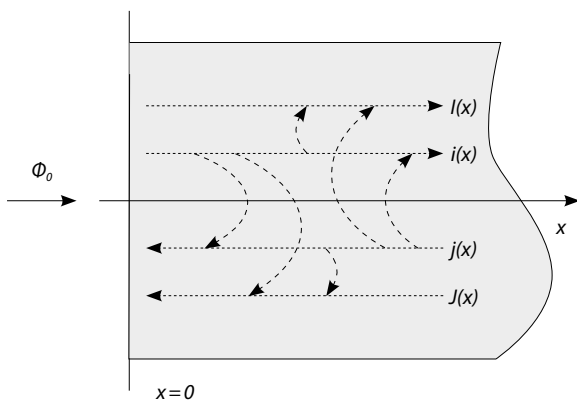


Рис. 5. Постановка задачи моделирования распространения света в светорассеивающей и флуоресцирующей биологической среде (объяснения в тексте)

с внешней поверхности среды потоков $j(x=0)$ и $J(x=0)$ как функций оптических свойств среды распространения излучения и концентрации флуорофора в ней.

Результаты и обсуждение

Полученные теоретические результаты наиболее наглядно могут быть продемонстрированы в сравнении с классическим решением для прозрачной среды без рассеяния. В среде без рассеяния излучение распространяется прямолинейно, обратно рассеянного потока не образуется, поэтому измерение обычно проводится на просвет. Для этой ситуации еще в 1968 г. С. Parker в своей классической книге [13] подробно описал и проанализировал решение задачи для регистрируемого излучения флуоресценции. С использованием введенных нами в предыдущем разделе обозначений это решение в режиме измерения «на просвет» может быть записано в виде:

$$I(x=H) = 2,3 \cdot \Phi_0 \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot \mu_{af}(\lambda_e) \cdot C_f \cdot H, \quad (1)$$

где $I(x)$ – регистрируемое излучение флуоресценции, $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$ – квантовый выход флуоресценции, H – толщина просвечиваемого раствора, обычно равная 1 см.

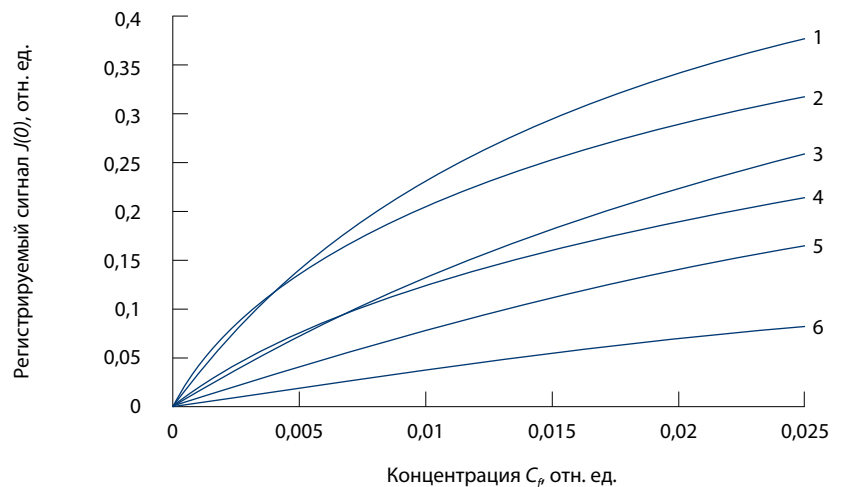


Рис. 6. Расчетное семейство нелинейных соотношений согласно уравнению (2). Исходные данные для расчета при $C_f = 0$:

- 1) $\mu_{af} = 200 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 4,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 4,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$,
- 2) $\mu_{af} = 200 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 13,3 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 13,0 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 2,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 1,5 \text{ мм}^{-1}$,
- 3) $\mu_{af} = 150 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 6,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 4,1 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 3,1 \text{ мм}^{-1}$,
- 4) $\mu_{af} = 200 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 43,8 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 43,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 12,2 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 10,2 \text{ мм}^{-1}$,
- 5) $\mu_{af} = 150 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 18,0 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 13,0 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 2,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 1,5 \text{ мм}^{-1}$,
- 6) $\mu_{af} = 100 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_e) = 48,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_e) = 43,5 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_1(\lambda_f) = 22,8 \text{ мм}^{-1}$; $\beta_2(\lambda_f) = 20,8 \text{ мм}^{-1}$.



Подход Паркера фактически сегодня признан «золотым стандартом» в лабораторной клинической диагностике. Он до сих пор излагается как базовый в различных учебных материалах (см., например, [5]), а уравнение (1) неизменно используется во многих биологических и медицинских исследованиях. Несмотря на то что применимость формулы (1) ограничена условием малой оптической плотности раствора и решение (1) не учитывает нелинейные эффекты (нелинейные члены разложения экспоненты уравнения Бугера – Ламберта – Бира, лежащего в основе решения Паркера, в ряд по малому параметру показателя степени), ее широкое применение на практике вполне оправдано. Оно обусловлено тем, что на основании формулы (1) легко решить обратную задачу, а именно: выразить из нее и вычислить концентрацию флюорофора в среде C_f , зная (регистрируя) мощность излучения флюоресценции $I(x)$.

К сожалению, для оптически мутных сред и для излучения флюоресценции $J(0)$, регистрируемого в режиме обратного рассеяния с передней (освещаемой) поверхности ткани, это решение неприменимо. На основе модифицированной модели Кубелки – Мунка для случая мутных сред в рамках данной работы нами было получено и проанализировано следующее более общее решение [12]:

$$J(0) = \Phi_0 \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot A_f(\lambda_e) \cdot \gamma, \quad (2)$$

$$\text{где } \gamma = \frac{(1 + r_{\infty \lambda_e})(1 + r_{\infty \lambda_f})}{2(\alpha_{\lambda_e} + \alpha_{\lambda_f})}; \quad r_{\infty \lambda} = \frac{\beta_2(\lambda)}{\beta_1(\lambda) + \alpha_{\lambda}};$$

$$\alpha_{\lambda} = \sqrt{\beta_1^2(\lambda) - \beta_2^2(\lambda)};$$

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

Как видно, структура этого решения (уравнение (2)) аналогична уравнению Паркера, но имеются и существенные отличия. Первое значимое отличие заключается в том, что коэффициент γ с размерностью [мм], представляющий собой вместо H некую эффективную толщину среды, с которой снимается полезный сигнал флюоресценции в случае мутной среды, в отличие от фиксированного и известного значения H , здесь является сложной функцией оптических свойств среды и заранее не известен. Второе отличие обнаруживается в описании количества поглощенного флюорофором возбуждающего излучения. Если в (1) это количество определяется известной

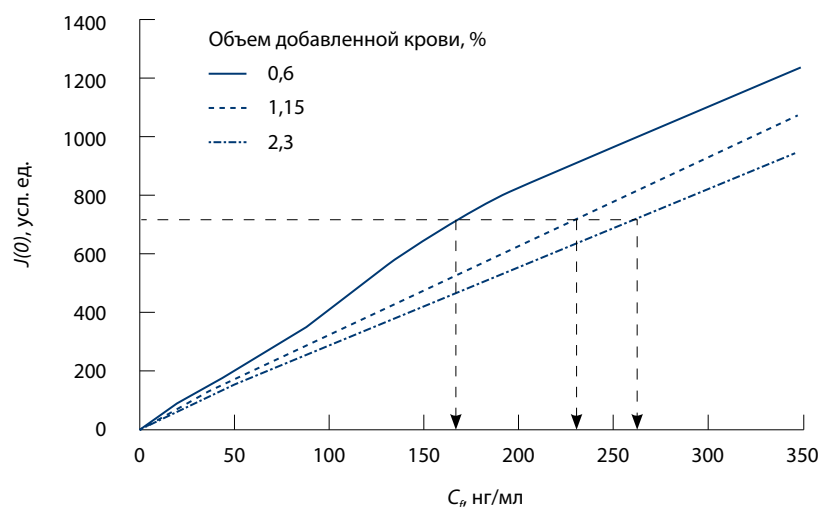


Рис. 7. Экспериментальные зависимости регистрируемой интенсивности флюоресценции $J(0)$ от концентрации фотосенсибилизатора Фотосенс при различных объемах добавленной крови

константой флюорофора μ_{af} то в (2), как было показано в [12], доля поглощенного возбуждающего излучения определяется выражением (3) по разности оптических свойств среды распространения излучения с учетом и без учета наличия флюорофора в среде (для концентраций, соответственно, $C_f = 0$ и $C_f \neq 0$). Это различие небольшое, порядка 5–10%, но оно есть и усложняет задачу.

В целом оба эти отличия приводят к тому, что вместо одной простой линейной зависимости регистрируемого сигнала флюоресценции от концентрации флюорофора C_f в виде (1) для мутной биологической среды мы получаем семейство сложных нелинейных соотношений, определяемых оптическими свойствами $\beta_1(\lambda)$ и $\beta_2(\lambda)$ среды распространения излучения (рис. 6).

Полученные экспериментальные данные подтверждают сделанные теоретические выкладки и расчеты. Семейство полученных экспериментальных зависимостей регистрируемой интенсивности флюоресценции от концентрации флюорофора в модельной светорассеивающей среде при разных объемах добавленной крови представлено на рис. 7.

Качественное сходство двух графиков очевидно. Следовательно, для мутных биологических тканей и сред, в которых большое влияние на процессы распространения света оказывает многократное внутреннее рассеяние, вопрос количественного определения концентрации флюорофора в среде по регистрируемому сигналу флюоресценции существенно усложняется. Если неизвестны оптические параметры среды,



а они априори точно неизвестны, то, регистрируя сигнал флюоресценции с поверхности исследуемых образцов, как показано на рис. 7, например, в 700 усл. ед., концентрация фотосенсибилизатора будет определена в диапазоне от 160 (примерно) до 260 нг/мл. Разброс (погрешность) оценки составит порядка 50%, что нельзя считать приемлемым. Именно поэтому необходимо более точное решение обратной задачи на основе уравнения (2) с учетом дополнительных измерений оптических свойств конкретного исследуемого образца. Собственно, такая постановка задачи в оптической неинвазивной диагностике известна: устройства для такой диагностики строятся с учетом реализации принципа решения обратных задач оптики светорассеивающих сред [14, 15]. Однако применительно к уравнению (2) авторам сегодня такое конкретное аналитическое решение задачи относительно концентрации флюорофора не известно. Оно должно быть дополнительно получено, обосновано, исследовано на точность, линейность, на соответствие результатам эксперимента и т.д. прежде, чем задача может считаться решенной. Безусловно, сегодня можно сделать определенные выкладки на основе уравнений (2) и (3). Тем не менее представляется, что это тема отдельного исследования в продолжение приведенных выше экспериментальных результатов и сформулированных теоретических положений.

Заключение

В проведенном исследовании на примере лазерной флюоресцентной спектроскопии в режиме регистрации обратно рассеянного света рассматривалась проблема определения концентрации флюоресцирующих компонентов в биологических тканях и средах по результатам измерения излучения флюоресценции. Экспериментально на модельных средах на основе натуральных препаратов крови и фотосенсибилизатора Фотосенс изучался реальный характер зависимости регистрируемой с поверхности оптически мутной биологической среды интенсивности флюоресценции от фактора светорассеяния и концентрации флюорофора в среде. В теоретическом плане были получены аналитические уравнения, описывающие формирование потока излучения флюоресценции на поверхности среды в условиях сильного светорассеяния. И экспериментальные, и теоретические результаты показали некорректность использования классических вычислительных алгоритмов, предназначенных для прозрачных сред, в ситуации биологических тканей, в которых нельзя пренебречь процессами многократного рассеяния света. Таким образом, необходимо дополнительное решение задачи поиска аналитического алгоритма определения концентрации люминофора по регистрируемым спектрам люминесценции в условиях оптически мутных сред. ☼

Литература

1. Гладков АА. Люминесцентный анализ в медицине. Кишинев: КГУ; 1958. 389 с.
2. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press; 1983. 488 p.
3. Udenfriend S. Fluorescence assay in biology and medicine. New York, London: Academic Press; 1962. 517 p.
4. Рогаткин ДА. Физические основы лазерной клинической флюоресцентной спектроскопии in vivo. Медицинская физика. 2014;(4): 78–96.
5. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М.: Техносфера; 2007. 368 с.
6. Siraj N, El-Zahab B, Hamdan S, Karam TE, Haber LH, Li M, Fakayode SO, Das S, Valle B, Strongin RM, Patonay G, Sintim HO, Baker GA, Powe A, Lowry M, Karolin JO, Geddes CD, Warner IM. Fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence. Anal Chem. 2016;88(1): 170–202. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04109.
7. Myscek MA, Pogue BW, editors. Handbook of biomedical fluorescence. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003. 665 p.
8. Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. Photonics & Lasers in Medicine. 2013;2(3):225–40. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
9. Smirnova OD, Rogatkin DA, Litvinova KS. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes. J Innov Opt Health Sci. 2012;(5):250010. doi: http://dx.doi.org/10.1142/S1793545812500101.
10. Rogatkin DA, Tereshchenko SG, Lapaeva LG, Gorenkov RV. Complex therapeutic-diagnostic endoscopy with laser irradiation and in-Situ spectrophotometry of erosive-ulcerative impairments of upper part of the gastrointestinal tract. Proc. SPIE 4613. Optical Biopsy IV; 286 (May 7, 2002). doi: 10.1117/12.465257.
11. Sunar U, Rohrbach DJ, Morgan J, Zeitouni N, Henderson BW. Quantification of PpIX concentration in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma models using spatial frequency domain imaging. Biomed Opt Express. 2013;4(4):531–7. doi: 10.1364/BOE.4.000531.
12. 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;25(4): 917–24. doi: 10.1007/s10895-015-1572-7.
13. Parker CA. Photoluminescence of solutions. Amsterdam: Elsevier; 1968. 510 p.
14. Rogatkin DA, Sokolovski SG, Fedorova KA, Stewart NA, Sidorov VV, Rafailov EU. Basic principles of design and functioning of multifunctional laser diagnostic system for non-invasive medical spectrophotometry. Proc. SPIE 7890. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems IX, 78901H (February 21, 2011). doi: 10.1117/12.874258.
15. Рогаткин ДА. Базовые принципы организации системного программного обеспечения многофункциональных неинвазивных спектрофотометрических диагностических приборов и комплексов. Медицинская техника. 2004;(2):8–12.



References

- Gladkov AA. Luminescent analysis in medicine. Kishinev: KGU; 1958. 389 p. Russian.
- Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press; 1983. 488 p.
- Udenfriend S. Fluorescence assay in biology and medicine. New York, London: Academic Press; 1962. 517 p.
- Rogatkin DA. Physical foundations of laser clinical fluorescence spectroscopy in vivo. Medical Physics. 2014;(4):78–96. Russian.
- Shmidt V. Optic spectroscopy for chemists and biologists. Moscow: Tekhnosfera; 2007. 386 p.
- Siraj N, El-Zahab B, Hamdan S, Karam TE, Haber LH, Li M, Fakayode SO, Das S, Valle B, Strongin RM, Patonay G, Sintim HO, Baker GA, Powe A, Lowry M, Karolin JO, Geddes CD, Warner IM. Fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence. Anal Chem. 2016;88(1): 170–202. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04109.
- Mycek MA, Pogue BW, editors. Handbook of biomedical fluorescence. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003. 665 p.
- Rogatkin D, Shumskiy V, Tereshenko S, Polyakov P. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical applications. Photonics & Lasers in Medicine. 2013;2(3):225–40. doi: 10.1515/plm-2013-0010.
- Smirnova OD, Rogatkin DA, Litvinova KS. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes. J. Innov. Opt. Health Sci. 2012;(5):250010. doi: http://dx.doi.org/10.1142/S1793545812500101.
- Rogatkin DA, Tereshchenko SG, Lapaeva LG, Gorenkov RV. Complex therapeutic-diagnostic endoscopy with laser irradiation and in-Situ spectrophotometry of erosive-ulcerative impairments of upper part of the gastrointestinal tract. Proc. SPIE 4613. Optical Biopsy IV; 286 (May 7, 2002). doi: 10.1117/12.465257.
- Sunar U, Rohrbach DJ, Morgan J, Zeitouni N, Henderson BW. Quantification of PpIX concentration in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma models using spatial frequency domain imaging. Biomed Opt Express. 2013;4(4):531–7. doi: 10.1364/BOE.4.000531.
- 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;25(4): 917–24. doi: 10.1007/s10895-015-1572-7.
- Parker CA. Photoluminescence of solutions. Amsterdam: Elsevier; 1968. 510 p.
- Rogatkin DA, Sokolovski SG, Fedorova KA, Stewart NA, Sidorov VV, Rafailov EU. Basic principles of design and functioning of multifunctional laser diagnostic system for non-invasive medical spectrophotometry. Proc. SPIE 7890. Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems IX, 78901H (February 21, 2011). doi: 10.1117/12.874258.
- Rogatkin DA. Basic principles of organization of system software for multifunctional non-invasive spectrophotometric diagnostic devices and systems. Biomedical Engineering. 2004;38(2):61–5.

Analysis of luminescence in turbid biological media

Guseva I.A.^{1,2} • Rogatkin D.A.^{1,3} • Buvalaya E.S.^{1,4}

Background: Quantitative luminescent analysis is widely used in biology, laboratory diagnostics and clinical medicine to study objects at various levels. However, the existing simplified algorithms for calculation of the luminophore concentration in diluted linear solutions cannot be applied to the turbid media with strong light scattering, which include the majority of living biological tissues. Today, the development of luminescence analysis in medicine goes towards the creation of non-destructive and non-invasive methods of *in vivo* monitoring. Therefore, the urgent question is about a formulation of the research purpose and the development of algorithms to compute the luminophore concentration based on the luminescence spectra recorded in the turbid media. **Objective:** To formulate and justify the tasks of elaboration of the algorithms to compute the luminophore concentration based on the luminescence spectra recorded under conditions of the optically turbid media. **Materials and methods:** We looked upon the physico-mathematical simulation of the process of formation of the induced fluorescence emission in the light-scattering medium based on the modified 2-flux Kubelka-Munch model. We

conducted a series of laboratory experiments with macro-homogenous light-scattering model media to determine characteristics of the dependence of the fluorescence intensity detected from the surface of an optically turbid biological medium upon the factor of light scattering and the concentration of the fluorophore in the medium. **Results:** Both theoretical and experimental results demonstrate complex nonlinear dependence of the fluorescence intensity detected upon the optical properties and a concentration of a fluorophore in the turbid media. This dependence is very different from the known linear C. Parker's solution for transparent media, which makes it impossible to use it in the optically turbid media. **Conclusion:** Further studies searching a closed-form analytical solution of the inverse optical problem for light-scattering and fluorescent media are necessary to calculate the luminophore concentration in a light-scattering media based on the recorded luminescence spectra.

Key words: spectroscopy, luminescence, concentration, optically turbid media

doi: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-163-169

Guseva Irina A. – Technician, Laboratory of Medical and Physics Research¹; Postgraduate Student, Faculty of Experimental and Theoretical Physics²
✉ 61/2–9 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 89 84.
E-mail: gusevairinaand@gmail.com

Rogatkin Dmitriy A. – PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physics Research¹; Director of the Research Programs and Projects³

Buvalaya Ekaterina S. – Laboratory Assistant, Laboratory of Medical and Physics Research¹; Master of Faculty of Physics⁴

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe shosse, Moscow, 115409, Russian Federation

³ Research & Development Center EOS-Medica Ltd.; 8/1 Nauchnyy proezd, Moscow, 117246, Russian Federation

⁴ Lomonosov Moscow State University; 1–2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation