

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРИБОРОСТРОЕНИЯ ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

УДК 57.087

# ТЕСТИРОВАНИЕ АЛГОРИТМА И УСТРОЙСТВА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КОЖИ С УЧЕТОМ ЕЕ КРОВЕНАПОЛНЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭРИТЕМЫ У ЖИВОТНЫХ

© Авторы, 2021

doi: 10.25210/jfor-2104-010021

**Гержик А. А.** — Лаборатория медико-физических исследований Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ), Москва. E-mail: gerjik18@yandex.ru

**Глазкова П. А.** — Лаборатория медико-физических исследований Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ). E-mail: polinikul@mail.ru

**Разницына И. А.** — Лаборатория медико-физических исследований Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ). E-mail: RaznitsynaIA@yandex.ru

## Аннотация

Поглощение света кровью вносит значительные помехи в работу медицинских приборов лазерной флуоресцентной спектроскопии *in vivo*, что обуславливает необходимость учитывать данное влияние на этапе обработки данных. В представленной работе проведено пилотное экспериментальное исследование авторского алгоритма расчета относительной концентрации флуорофоров в коже с учетом ее кровенаполнения. Предложенный алгоритм является аналитическим и основан на модифицированной модели Кубелки-Мунка. В эксперименте реализовано моделирование разных уровней кровенаполнения кожи при помощи радиационно-индуцированной эритемы на белых нелинейных мышцах, которые подвергались УФ-облучению. В ходе исследования оценивалось объемное кровенаполнение кожи при помощи анализа RGB изображений с применением регрессионных уравнений. Регистрировались *in vivo* спектры диффузного отражения, эндогенной и экзогенной флуоресценции облученной и интактной кожи. Продемонстрирована возможность алгоритма расчета относительных концентраций флуорофора компенсировать занижение регистрируемых сигналов флуоресценции, возникающее за счет поглощения кровью излучения видимого диапазона спектра.

**Ключевые слова:** лазерная флуоресцентная спектроскопия *in vivo*, теория переноса, алгоритм Кубелки-Мунка, эритема, кровенаполнение, концентрация, флуорофор, ультрафиолетовая радиация

## Abstract

The absorption of light by blood contributes significant noises to the performance of *in vivo* laser fluorescence spectroscopy devices, making it necessary to take this influence into account during data processing. In the presented work, a pilot experimental study of the authors' algorithm for calculating a relative concentration of fluorophores in skin taking into account its blood content has been carried out. The proposed algorithm is analytical and based on the modified Kubelka-Munk model. In the experiment, different levels of blood volume were simulated using radiation-induced erythema in white non-linear mice, whose skin was exposed to UV irradiation. Relative blood volume was estimated by RGB image analysis using regression equations. *In vivo* spectra of diffuse reflectance, endogenous and exogenous fluorescence of both irradiated and intact skin were recorded. The ability of the relative fluorophore concentrations computational algorithm to compensate the underestimation of recorded fluorescence signals due to the absorption of visible-band radiation by blood was demonstrated.

**Keywords:** Laser fluorescence spectroscopy *in vivo*, radiative transfer theory, Kubelka-Munk algorithm, erythema, relative blood volume, concentration, fluorophore, ultraviolet radiation

## Введение

Приборы неинвазивной оптической диагностики состояния органов и тканей *in vivo* все чаще применяются сегодня в современной медицине, так как они способны оперативно предоставлять объективную информацию о функциональном состоянии тканей пациента. Одной из ключевых задач для повышения точности оптической диагностики является разработка физически и физиологически обоснованных алгоритмов обработки данных, так как именно на этапе их применения производится преобразование зарегистрированной физиче-

ской величины в интересующий врача медико-биологический параметр. С точки зрения важной диагностической информации для медицинской диагностики перспективен метод лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС). ЛФС *in vivo* — один из методов оптической неинвазивной диагностики, основанный на анализе спектров флуоресценции эндогенных или экзогенных флуорофоров биоткани. Метод уже активно применяется в клиникфх, в частности, для интраоперационной навигации при хирургическом лечении злокачественных новообразований. Флуоресцентная навигация предполагает системное введение фотосенсибилизатора (ФС), который избирательно накапливается в опухоли, освещение тканей узкополосным лазерным излучением, например, в ультрафиолетовом (УФ) диапазоне спектра и оценке флуоресцирующих очагов накопления ФС [1,2]. Иногда оценивают флуоресценцию природных (эндогенных) флуорофоров в тканях без введения дополнительных препаратов, но такая диагностика имеет низкую специфичность [2,3].

Известно, что потенциал ЛФС *in vivo* не ограничивается задачами онкологии. Современные исследования описывают возможные применения метода для диагностики неопухолевых патологий, разрабатываются численные критерии состояния биоткани, основанные на спектрах флуоресценции, например, для воспалительных процессов [4–8]. При этом актуальным остается вопрос разработки алгоритмов обработки данных в ЛФС, учитывающих помеховые факторы и дающих точную количественную информацию.

Как известно, зарегистрированные с поверхности биоткани спектры флуоресценции отражают не только содержание в тканях флуорофоров, но и общие поглощающие и рассеивающие свойства области исследования. Потому количественные диагностические критерии патологии, например, для кожи с различной пигментацией или для разных других органов будут различны. Однако, так как большинство диагностических методик разрабатываются для патологии конкретной локализации, различия в типах тканей не столь критичны. Например, в работе [9] описано применение флуоресцентного томографа, в котором концентрации ФС в тканях определяются относительно заданной концентрации этого же ФС в фантоме, имитирующем данную ткань. Для минимизации влияния индивидуальных оптических особенностей тканей и органов (например, рассеивающих свойств кожи) иногда в качестве количественных показателей используют нормированные на интактную ткань значения потока флуоресценции [10, 11] или различные коэффициенты флуоресценции [12]. Более сложная задача — учесть влияние локального кровенаполнения, которое может значительно различаться в разные моменты времени даже в пределах одной области исследования [13]. Влияние поглощения гемоглобином крови оптического излучения (особенно в синей и зеленой частях спектра) на регистрируемые *in vivo* спектры флуоресценции неоднократно обсуждалось и было подтверждено экспериментально [14–16]. Потому большое внимание уделяется разработке новых методов и аппаратуры, которые бы позволили данное влияние компенсировать. Наиболее интересными с нашей точки зрения являются аналитические алгоритмы расчета локальных концентраций флуорофоров с учетом кровенаполнения ткани. Как правило, такие алгоритмы подразумевают получение дополнительных данных об оптических свойствах тканей, например, путем регистрации спектров диффузного отражения в видимом, ближних УФ и ИК диапазонах.

Отметим, что в работе речь пойдет об аналитических методах, так как они, в отличие от имитационного моделирования методом Монте-Карло, работают в режиме реального времени. Также, в отличие от методов Монте-Карло и машинного обучения, аналитические подходы более понятны и наглядны. Чаще всего для решения задач распространения света в биомедицинской оптике используют диффузионное приближение уравнения переноса излучения или модель Кубелки-Мунка (КМ). При этом из-за ограничений на минимальную среднюю длину свободного пробега фотонов диффузионное приближение чаще используют, когда источник и детектор излучения разнесены в пространстве. В неинвазивной флуоресцентной диагностике диффузионное приближение используется, например, при реконструкции распределения флуорофора и определении его концентрации во флуоресцентной диффузной оптической томографии [17]. В ЛФС *in vivo* оптическое излучение, возбуждающее флуоресценцию, обычно доставляется к поверхности объекта по осветительным волокнам оптоволоконного зонда. По приемным волокнам зонда вторичное излучение (флуоресцентное и диффузно отраженное) подводится к детектору. При этом расстояние между волокнами на дистальном торце зонда зачастую минимальное, ограниченное лишь возможностями технологий сборки зондов и конкретной медико-биологической задачей, что не позволяет использовать диффузионное приближение. Потому для ЛФС *in vivo* стараются либо использовать модель КМ, либо ограничивать предлагаемую аналитическую модель определенной конструкцией оптоволоконного зонда, как это было предложено в работе [18]. При этом надо сказать, что какого-то общепринятого метода количественной оценки флуоресценции пока в ЛФС не существует. Есть только единичные демонстрационные работы, например, [19–21]. Потому сегодня задачи разработки новых моделей и их экспериментальная проверка остаются актуальными.

В данной работе на примере исследования особенностей флюоресценции кожи животных с различным кровенаполнением тестировалась работа ранее предложенного алгоритма расчета концентрации флюорофора, основанного на модифицированной для биотканей двухпоточковой модели КМ, с использованием дополнительных данных спектроскопии диффузного отражения (СДО).

## 1. Материалы и методы

Основная идея исследования — смоделировать повреждения кожи, вызывающие повышенную флюоресценцию экзогенных и эндогенных флюорофоров в ней и разные уровни кровенаполнения, и протестировать предложенный алгоритм оценки концентрации флюорофоров в коже с учетом влияния кровенаполнения в области обследования. В качестве объекта исследования были выбраны белые лабораторные мыши-самцы ICR, повреждения кожи вызывались внешним УФ облучением (УФ-индуцированная эритема) и использовался экзогенный ФС «Радахлорин».

### 1.1. Моделирование эритемы

Количественный анализ содержания флюорофоров в биоткани с учетом ее кровенаполнения был проведен для животных, участвовавших в эксперименте по моделированию радиационно-индуцированной эритемы. Исследование проводилось на 5 белых лабораторных мышках-самках ICR в возрасте 7–8 мес., весом 25–30 гр. За неделю до проведения эксперимента мыши были переведены на сбалансированный гранулированный корм, не содержащий флюорофоров. Радиационно-индуцированную эритему моделировали на левой половине предварительно проэпилированной спины животных при помощи УФА излучения (терапевтический источник YUTEC-solarium gk-480-s8/515). Правая часть спины во время сеанса облучения была защищена непрозрачным для УФА материалом. Спектр излучения УФ источника представлен на рис. 1.

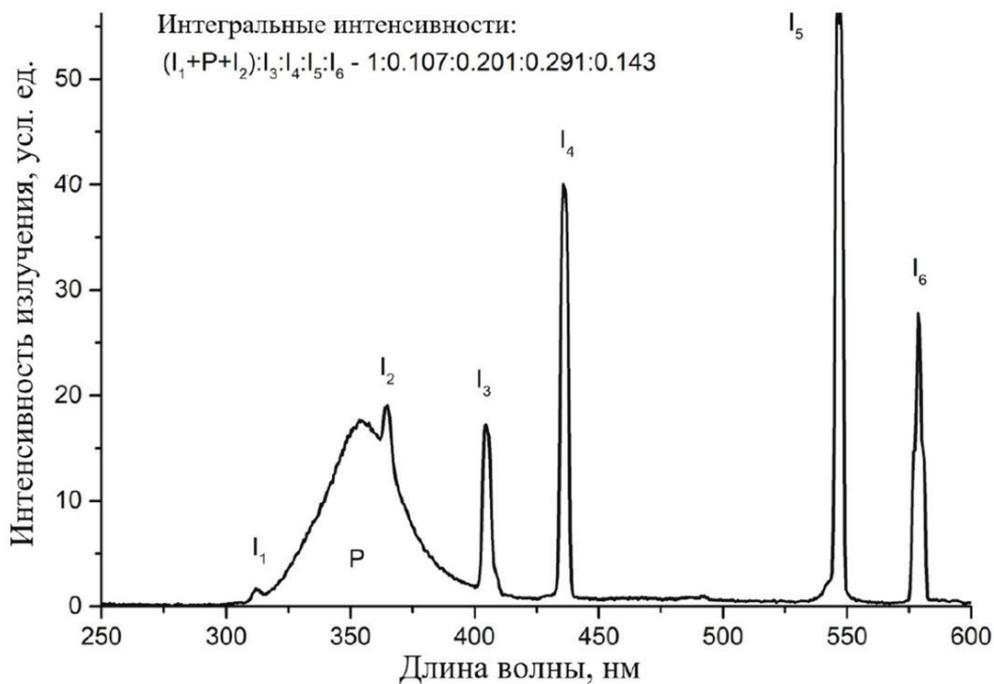


Рис. 1. Спектр источника излучения.

Плотность мощности УФ-излучения на поверхности кожи животных составляла  $4.5 \text{ мВт/см}^2$ . Область воздействия УФА излучения площадью порядка  $5\text{--}6 \text{ см}^2$  показана на рис. 2. Такое излучение УФА спектра индуцирует умеренное воспаление в слоях эпидермиса и дермы животных [22], которое влияет на спектры эндогенной флюоресценции тканей и перераспределение экзогенного ФС в них [8].

Животные подверглись воздействию УФ-излучения в эксперименте двукратно, с разницей в 24 часа. Разовая доза для моделирования покраснения без повреждения тканей составляла  $1,1 \text{ Дж/см}^2$ , (суммарная  $2,2 \text{ Дж/см}^2$ ), что по данным литературы соответствует минимальной эритемной дозе УФА излучения для мыши [23]. Эксперимент был выполнен с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).



Рис. 2. Подготовка животных к УФ-облучению.

### 1.2. Измерение и количественный анализ спектров флуоресценции

Всем животным сначала проводили методом ЛФС контрольное измерение эндогенной флуоресценции кожи за сутки до облучения. Также оценивали методом СДО оптические параметры кожи в 6 локализациях — по три симметричные точки на интактной и подготовленной для облучения части спины. В эксперименте далее аналогичные измерения проводили непосредственно перед облучением, а также через 5, 24 и 48 часов после первого сеанса УФ-облучения. Экзогенную флуоресценцию кожи вызывали предварительным введением животным ФС «Радахлорин». Согласно фармакокинетике препарата «Радахлорин» его максимальное накопление в тканях наблюдается через 3 часа после введения. Поэтому за 2 часа до проведения исследования каждому животному парентерально вводили ФС в дозе 5 мг/кг. В точке «24 часа» сначала вводили препарат «Радахлорин», через 3 часа после введения проводили измерения методами ЛФС и СДО, после чего следовало повторное облучение.

Эндогенная флуоресценция при измерениях возбуждалась маломощным лазерным источником с длиной волны возбуждения  $\lambda_e = 515$  нм и регистрировалась в максимуме флуоресценции на длине волны  $\lambda_f = 580$  нм, соответствующей флуоресценции совокупности эндогенных флуорофоров: липофусцина, кератина, ФАД и др. Экзогенная флуоресценция ФС «Радахлорин» также наблюдалась при возбуждении излучением с  $\lambda_e = 515$  нм с характерным максимумом флуоресценции на  $\lambda_f \approx 670$  нм. Для минимизации влияния поглощения кровью на зарегистрированные спектры, флуоресценцию ФС «Радахлорин», как правило, возбуждают в красном диапазоне длин волн [24]. Но так как цель исследования — продемонстрировать способность алгоритма компенсировать данное влияние, для возбуждения флуоресценции в нашем эксперименте использовалось лазерное излучение зеленого диапазона с  $\lambda_e = 515$  нм.

Измерения проводились при помощи прототипа специально разработанного для этого устройства «Мультиком», краткое описание которого представлено ниже. При каждом измерении спектра флуоресценции регистрировался также спектр диффузного отражения. Коэффициент диффузного отражения  $r_{\lambda_f}$  ткани рассчитывали по отношению к измеренным при помощи источника белого света спектрам диффузного отражения фантома с известными  $r_{\lambda}$ . Значения  $r_{\lambda_e}$  определялись аналогично, но по величине диффузно отраженного потока лазерного излучения  $F_{bs}$  на длине волны возбуждения флуоресценции, регистрируемого при измерении спектров флуоресценции.

Базовое аналитическое решение задачи распространения света на длине волны флюоресценции  $\lambda_f$  для полубесконечной среды с равномерным поглощением и рассеянием, на границу которой падает поток  $\Phi_0$  на длине волны возбуждения флюоресценции  $\lambda_e$ , было ранее предложено в работе [16]. Авторами было выведено на основе модифицированной двухпотоковой модели КМ [25] с использованием решения А. А. Кохановского [26] в замкнутой аналитической форме выражение для потока флюоресценции, выходящего с границы среды, который регистрируется прибором. А в работе [21] данная модель была упрощена с учетом малых концентраций флюорофоров в биоткани и с учетом того, что основным хромофором в биоткани является кровь. Также в [21] был предложен на ее основе авторский алгоритм расчета относительной концентрации флюорофоров в биоткани с учетом ее кровенаполнения по совместно регистрируемым данным ЛФС и СДО, который и тестировался в описываемых экспериментах. Модифицированная модель КМ, в отличие от классической, учитывает многократность рассеяния на элементе среды  $dx$  и дает точное аналитическое решение для обратно рассеянного потока, вышедшего с границы среды [25].

В [16] авторами в замкнутой форме было получено выражение для потока флюоресценции  $F_f$ , выходящего с границы среды, однако данное выражение на практике оказалось неприменимым, так как оно не определяет взаимно однозначное соответствие между зарегистрированным  $F_f$  и концентрацией флюорофора в биоткани. Решением данной проблемы стало упрощение аналитического выражения для  $F_f$  с учетом малых концентраций флюорофоров  $C_f$  путем разложения его в ряд Тейлора в окрестности  $C_f = 0$  с удержанием линейного члена [21]. Коэффициент разложения, зависящий, очевидно, от  $\Phi_0$ , квантового выхода флюоресценции  $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$ , поглощающих и рассеивающих свойств биоткани, был выражен через измеряемые или известные (табличные) величины.

Зависимость регистрируемого с поверхности биоткани потока на длине волны флюоресценции  $F_f$  от концентрации флюорофора, согласно предложенному подходу, приняло вид

$$F_f(C_f) = \Phi_0 \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot f(r_{\infty\lambda_e}, r_{\infty\lambda_f}) \frac{(\mu_{af}(\lambda_e) - \mu_{at}(\lambda_e))}{\mu_p} \cdot C_f, \quad (1)$$

где  $C_f$  — концентрация флюорофора, выраженная в относительных единицах, определяющая вклад флюорофора в суммарный коэффициент поглощения биоткани

$$\mu_a(\lambda_e) = \mu_{af}(\lambda_e) \cdot C_f + \mu_{at}(\lambda_e) \cdot (1 - C_f), \quad (2)$$

где  $\mu_{af}(\lambda_e)$  — коэффициент поглощения чистого флюорофора на длине волны  $\lambda_e$ ,  $\mu_p$  — плотность неоднородностей, согласно модели не зависящая от  $C_f$ ;  $\mu_{at}(\lambda_e)$  — коэффициент поглощения биоткани на длине волны  $\lambda_e$ . Для расчета концентраций использовались значения  $\mu_{af}(\lambda)$  неразбавленного препарата Радахлорин (0,35% раствора), оцененные по опубликованным в [24] данным оптической плотности, молярной массы и коэффициентам экстинкции. Для  $\lambda = 515$  нм  $\mu_{af}$  было оценено в  $150 \text{ см}^{-1}$ . При анализе концентраций эндогенных флюорофоров значения  $\mu_{af}(\lambda)$  брались аналогичные. Зависимость  $\mu_{at}(\lambda_e)$  от доли фракции крови в диагностическом объеме биоткани описывается формулой [27]

$$\mu_{at}(\lambda) = \mu_{atiss}(\lambda)(1 - V_b) + \mu_{abl}(\lambda)V_b, \quad (3)$$

где  $\mu_{atiss}(\lambda)$  — коэффициент поглощения обескровленной ткани на длине волны  $\lambda$  (при расчетах использовалось значение  $1 \text{ см}^{-1}$ ), а  $\mu_{abl}(\lambda)$  — коэффициент поглощения крови на длине волны  $\lambda$ , который определялся по данным [28] для концентрации гемоглобина  $150 \text{ г/л}$  (вкладом дезоксигенированного гемоглобина пренебрегли [26]),  $V_b$  — объемное кровенаполнение;  $f(r_{\infty\lambda_e}, r_{\infty\lambda_f})$  — функция, описывающая влияние поглощения и рассеяния в биоткани и выражающаяся через измеряемые значения коэффициентов диффузного отражения на длине волны возбуждения  $r_{\infty\lambda_e}$  и флюоресценции  $r_{\infty\lambda_f}$  [21]

$$f(r_{\infty\lambda_e}, r_{\infty\lambda_f}) = \frac{(1 + r_{\infty\lambda_e}^2)(1 + r_{\infty\lambda_f})}{(1 + r_{\infty\lambda_e})} \left[ 1 + \frac{2r_{\infty\lambda_e}}{(1 - r_{\infty\lambda_e}^2)} \frac{(1 - \omega(\lambda_e)) \alpha(\lambda_e)}{\omega(\lambda_e) \mu_p} \right] \frac{\mu_p}{2(\alpha(\lambda_e) + a(\lambda_f))} \quad (4)$$

$$\omega(\lambda) = \frac{1}{2} \left( 1 - (1 - 2R(\lambda)e^{-2\mu_a(\lambda)/\mu_p}) \right) \quad (5)$$

$$\frac{\alpha(\lambda)}{\mu_p} = \frac{\mu_{at}(\lambda)}{\mu_p} - \ln(1 - R(\lambda)) + \ln \left[ 1 - \omega(\lambda) + \omega(\lambda) \frac{(1 - r_{\infty\lambda}^2)}{(1 + r_{\infty\lambda}^2)} \right]. \quad (6)$$

В упрощенной модели принято, что концентрации флюорофоров в биотканях малы, потому не влияют на поглощающие свойства ткани, и, как следствие, на зарегистрированные  $r_{\infty\lambda}$ . Согласно аналитической модели и данному ограничению

$$\frac{\mu_a(\lambda)}{\mu_p} = \frac{\mu_{at}(\lambda)}{\mu_p} = -\ln \frac{2r_{\infty\lambda}\omega(\lambda)}{R(\lambda)(1+r_{\infty\lambda}^2)}. \quad (7)$$

Здесь  $R(\lambda)$  — коэффициент отражения (Френеля), принятый за 0.02. В модифицированной модели КМ  $\alpha(\lambda)$  и  $r_{\infty\lambda}$  связаны с коэффициентами затухания  $\beta_1$  и рассеяния  $\beta_2$

$$\alpha(\lambda) = \sqrt{\beta_1^2(\lambda) - \beta_2^2(\lambda)},$$

$$r_{\infty\lambda} = \frac{\beta_2(\lambda)}{\beta_1(\lambda) + \alpha(\lambda)}.$$

Величина  $V_b$  может быть измерена, например, неинвазивными оптическими методами, как контактными [29], так и дистанционными [30]. Формулы (5) и (7) позволяют выразить  $\omega(\lambda)$  через измеряемую величину  $r_{\infty\lambda}$  и  $R(\lambda)$ . Таким образом, исходя из (1), (3) и (7),  $C_f$  может быть рассчитана по данным ЛФС *in vivo* и СДО при помощи следующей формулы:

$$C_f = \frac{F_f}{\Phi_0\varphi(\lambda_e, \lambda_f)} \frac{\ln \frac{2r_{\infty\lambda_e}\omega(\lambda_e)}{R(\lambda_e)(1+r_{\infty\lambda_e}^2)}}{f(r_{\infty\lambda_e}, r_{\infty\lambda_f}) \left[ \left( \ln \frac{2r_{\infty\lambda_e}\omega(\lambda_e)}{R(\lambda_e)(1+r_{\infty\lambda_e}^2)} \right)^2 - \mu_{af}(\lambda_e) (\mu_{atiss}(\lambda_e)(1-V_b) + \mu_{abl}(\lambda_e)V_b) \right]}. \quad (8)$$

Для сравнения результатов обработки данных ЛФС *in vivo* классическими методами и с помощью тестируемого алгоритма оценивались значения зарегистрированных потоков флуоресценции  $F_f$  на длинах волн  $\lambda_f$ , а также рассчитывались индексы тканевого содержания флюорофора  $\eta_f$  по формуле

$$\eta_f = \frac{F_f(\lambda_f)}{F_f(\lambda_f) + F_{bs}(\lambda_e)}, \quad (9)$$

где  $F_{bs}$  — диффузно отраженный поток излучения на длине волны возбуждения флуоресценции  $\lambda_e$ , вышедший с поверхности биоткани, уменьшенный светофильтром примерно в 1000 раз и зарегистрированный прибором. Анализ  $\eta_f$  или коэффициентов флуоресцентной контрастности  $K_f$ , которые численно равны  $K_f = 2\eta_f$ , часто встречается в литературе и, можно сказать, является традиционным. Эти показатели позволяют устранить влияние мощности возбуждающего излучения и являются метрологически более надежным по сравнению с  $F_f$  [31]. Нормировка на диффузно отраженную часть спектра также может частично компенсировать влияние поглощения света биотканью, но только в случае, когда  $\lambda_e$  и  $\lambda_f$  близки. Однако в различных устройствах для ЛФС используются светофильтры с разными, неунифицированными коэффициентами пропускания, что приводит к различиям в величинах зарегистрированных  $F_{bs}$  и, как следствие, к невозможности сравнивать данные с приборов разных производителей и использовать этот критерий в клинической практике без привязки к конкретному устройству.

### 1.3. Устройство для количественного анализа флуоресценции «Мультиком»

Для реализации предложенного алгоритма обработки данных ЛФС необходимо определить коэффициенты диффузного отражения на длинах волн возбуждения и флуоресценции. Для этого в лаборатории медико-физических исследований ГБУЗ МО МОНКИ им. М. Ф. Владимирского был разработан прототип диагностического комплекса «Мультиком», который позволяет последовательно регистрировать спектры флуоресценции и диффузного отражения исследуемой области. Устройство помимо лазерных источников излучения для возбуждения флуоресценции включает в себя широкополосный источник белого света — ксеноновую лампу-вспышку (рис. 3). Конструкция устройства подробно описана в [32].

Для доставки излучения использовался оптоволоконный зонд с радиальной геометрией освещения, позволяющей равномерно освещать область исследования всеми используемыми источниками света. В дистальном торце зонда, контактирующего с биотканью, осветительные волокна ш 100 мкм располагаются вокруг приемного волокна ш 400 мкм. Для лазерных источников — по 7 осветительных волокон, для источника белого света — 19. Расстояние между центром приемного волокна и кольцом осветительных волокон — 1 мм.

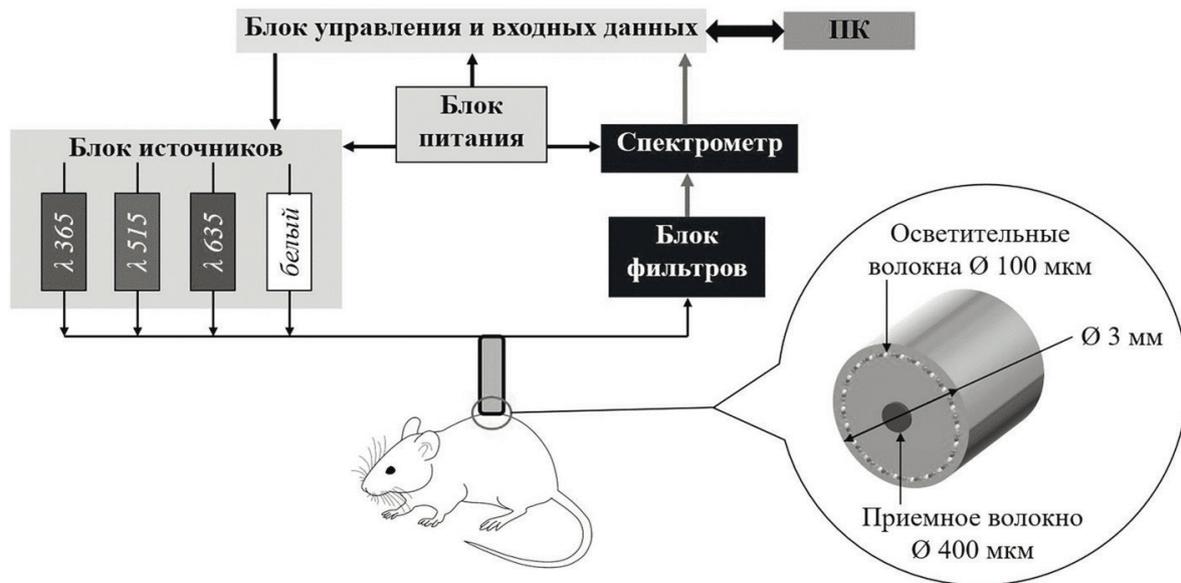


Рис. 3. Схема прототипа диагностического комплекса «Мультиком».

При данной геометрии измерений глубина зондирования лазерным излучением может оцениваться в 1,5–2 мм для  $\lambda_e = 515$  нм [27], что позволяет оценить изменения, вызванные УФ излучением в эпидермисе и дерме кожи животных.

#### 1.4. Определение показателя $V_b$

Значение объемного кровенаполнения  $V_b$  оценивалось при помощи анализа RGB изображений с применением регрессионных уравнений. При выборе метода определения  $V_b$  учитывались особенности кожи лабораторных мышей: суммарная толщина их эпидермиса и дермы не превышает 0,5 мм [32]. При определении  $V_b$  методом оптической тканевой оксиметрии чаще всего используются лазеры с длинами волн 660 и 940 нм. Однако ИК-излучение проникает на большую глубину, до 6 мм, и захватывает внутренние органы животных, что вносит погрешности. При захвате же изображения цифровой камерой глубина диагностируемого участка оценивается от 0,5 до 2 мм [30].

Для съемки использовалась научная камера для систем технического зрения Ace acA1300–200uc (Basler AG Inc., Germany) с высокой линейностью, известными кривыми спектрального отклика, а также с отключенными алгоритмами постобработки. Расстояние от объектива камеры до объекта съемки было фиксировано и составляло 20 см. Камера была закреплена на штативе и установлена под прямым углом к плоскости съемки. Диафрагменное число —  $f/2$ . Перед съемкой проводилась настройка баланса белого на белый референсный материал — фторопласт, расположенный в кадре. Время экспозиции — 3500 мкс. Источником освещения при съемке служила кольцевая лампа Aura Helle FC-480 SE Multicolor (RGB) Max с максимальным световым потоком 9600 лм. Выбранная геометрия источника обеспечивает равномерность освещения сцены и позволяет избежать возникновения теней, которые могли бы повлиять на результаты измерения. Все измерения проводились на 20% мощности от максимальной. Цвет источника — белый с цветовой температурой 4500 К.

Значение  $V_b$  определялось по изображению по аналогии с работой [30]. Регрессионное уравнение для используемой камеры было составлено на основе результатов моделирования Монте-Карло распространения оптического излучения в биоткани при варьируемом  $V_b$  (от 0 до 100% от общего объема биоткани). Физическая модель биоткани для моделирования методом Монте-Карло — полубесконечная среда с равномерно распределенными рассеивателями и с различным содержанием крови, которая задает различные поглощающие и рассеивающие свойства среды. Источник освещения представлен в модели расположенным на границе биоткани генератором фотонов,двигающихся перпендикулярно поверхности среды до первого оптического взаимодействия. Число выпущенных на конкретной длине волны фотонов задано в соответствии со спектром используемого источника освещения.

В результате моделирования были получены спектры обратного рассеяния от биоткани, которые переводились в RGB значения с учетом кривых спектрального отклика сенсора используемой камеры. По полу-

ченному набору данных из значений кровенаполнения и соответствующих им значений RGB был проведен регрессионный анализ. Ранее в работе [34] было показано, что зависимость  $V_b$  от значений RGB носит экспоненциальный характер, в связи с чем регрессионное уравнение определения кровенаполнения по значениям RGB для используемой камеры было выбрано в виде

$$V_b = 2,34 \cdot \exp(0,61 \cdot R - 1,49 \cdot G - 4,65 \cdot B). \quad (10)$$

При обработке изображений для каждой области интереса выделялась квадратная область  $20 \times 20$  пикселей (соответствует примерно  $4 \text{ мм}^2$  поверхности кожи, (рис. 4)), находились средние значения RGB в квадрате, по которым затем рассчитывалось значение  $V_b$  по (10).

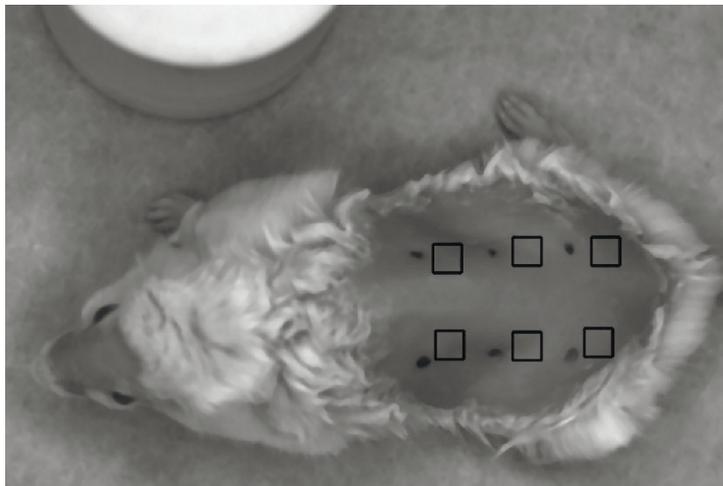


Рис. 4. Выделение областей изображения участков спины мыши для определения  $V_b$ .

Так как площадь исследуемых областей мала, кривизну поверхности кожи в исследовании не учитывали. Камера располагалась под небольшим углом к поверхности кожи, которым в исследовании пренебрегли и считали, что кожа располагалась перпендикулярно оси визирования.

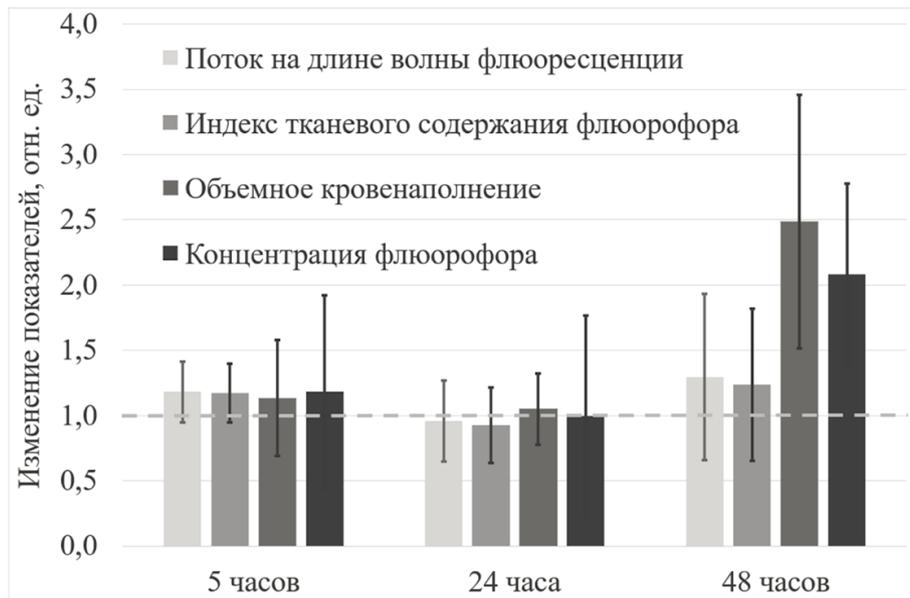
## 2. Результаты и обсуждение

В результате исследования была отмечена высокая вариабельность реакции кожи животных на действие УФА излучения в используемых дозах. Не у всех животных сформировалось визуально заметное покраснение области облучения, вероятно, из-за недостаточно агрессивного воздействия УФА излучения в используемых дозах на верхние слои кожи и вариабельности индивидуальной чувствительности животных к излучению. Поэтому отдельно были проанализированы результаты ЛФС животного с визуально сформированной эритемой и, соответственно, со значимым увеличением усредненного по области исследования  $V_b$ .

Следует отметить, что ФС «Радахлорин» активно поглощает излучение УФА диапазона, что может вызвать фотодинамический эффект. Однако в фотодинамической терапии (ФДТ) с ФС хлоринового ряда используются дозы излучения  $20\text{--}1000 \text{ Дж/см}^2$  для красного диапазона длин волн [35]. В работах по применению более коротковолновых источников излучения, например,  $455 \text{ нм}$  [36] и  $410 \text{ нм}$  [37] для ФДТ с другими ФС также применяются дозы указанного выше диапазона, что на несколько порядков выше примененной в нашем исследовании. Потому можно считать, что фотодинамические эффекты в данной работе незначительны, а наблюдаемые изменения в коже животных связаны с повреждающим действием УФ-излучения.

Для сравнения количественных переменных (показателей облученной и интактной областей данного животного) использовали t-критерий Стьюдента для двух независимых выборок в варианте для неравных дисперсий. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . На рис. 5 представлены изменение регистрируемых показателей в области воздействия через 5, 24 и 48 часов после первого облучения УФ излучением относительно тех же показателей, измеренных до воздействия.

Наблюдалось достоверное увеличение  $V_b$  кожи животного спустя 48 часов после первого облучения ( $p = 0,02$ ) При этом значения зарегистрированных  $F_f$ , как и рассчитанных  $\eta_f(580)$ , на протяжении всего эксперимента находились на уровне интактной ткани (на рис. 5 — пунктирная линия) в пределах разброса. Расчет  $C_f(580)$ , очевидно, позволил скомпенсировать увеличение поглощения биотканью, вызванного эритемой, и позволил выявить достоверное увеличение  $C_f(580)$  через 48 часов ( $p = 0,04$ ). В остальные временные точки разница показателей облученной и интактной тканей была недостоверна.



**Рис. 5.** Показатели оптической диагностики кожи животного после воздействия УФ-излучения, нормированные на значения интактной ткани (до воздействия),  $\lambda_e = 515$  нм,  $\lambda_f = 580$  нм.

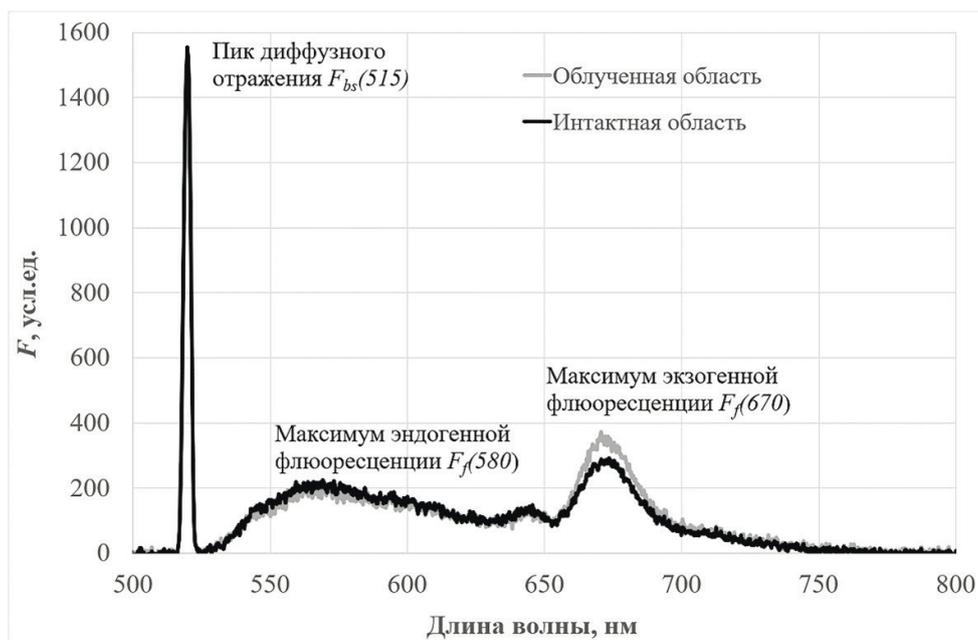
Указаны стандартные отклонения.

У остальных животных выраженность эритемы была менее значительная, потому и компенсация не столь выраженная. Однако, на примере единичных измерений спектров флюоресценции и диффузного отражения этот эффект может быть прослежен. На примере зарегистрированных спектров флюоресценции с облученной и с интактной кожи второго животного (рис. 6) можно отметить, что  $F_f(580)$  равны. Ошибочно можно предположить, что и флюоресцентные свойства данных локализаций идентичны. Однако RGB камера зафиксировала покраснение поврежденной области,  $V_b$  в области облучения составило  $0.15 \pm 0.02$ , в интактной —  $0.094 \pm 0.010$ . Следовательно, в облученной области регистрируемая  $F_f(580)$  занижена, что было скомпенсировано расчетом  $C_f(580)$ : отношение показателя облученной/интактной областей — 1.33.

Увеличение регистрируемого  $F_f(580)$  эритемы могло быть связано с аутофлюоресценцией ФАД (флавинадениндинуклеотида) — кофермента, принимающего участие во многих окислительно-восстановительных биохимических процессах. Известно, что ФАД является важным эндогенным хромофором кожи, который поглощает энергию УФА [38]. Ряд патологических процессов сопряжен с изменением окислительно-восстановительного статуса тканей, детекция повышенной аутофлюоресценции ФАД может наблюдаться при различных патологических процессах, таких как воспаление, радиационное повреждение ионизирующей радиацией и др. [39, 40].

При этом в красной части спектра (рис. 6) заметны различия в зарегистрированной флюоресценции облученной и интактной областей, что может быть связано как с меньшим влиянием поглощения кровью в данном диапазоне спектра, так и с более значимым ростом концентрации ФС. Повышенная экзогенная флюоресценция в области воспаления уже наблюдалась в наших предыдущих исследованиях [8], в том числе при УФ-индуцированном воспалении [41]. Флюорофоры, в частности, экзогенные ФС, активно накапливаются в тканях. Тем не менее, какая-то их часть циркулирует в кровяном русле. Потому повышение кровенаполнения в коже влечет за собой и увеличение локальной концентрации данных веществ в диагностическом объеме. Вместе с тем, за счет повышения поглощения оптического излучения кровью, пропорционального увеличения регистрируемого потока флюоресценции не наблюдается. Одним словом, влияние величины объемного кровенаполнения на результаты ЛФС *in vivo* имеет достаточно сложный характер, что учитывается в представленной аналитической модели.

Более точно верифицировать работу алгоритма на животных моделях сегодня затруднительно, так как отсутствует референтный метод определения концентрации флюорофоров в диагностическом объеме, в том числе за счет неопределенности величины самого объема. Несмотря на то, что предложенный подход был проверен на флюоресцирующих фантомах [21], остается ряд неопределенностей в данном алгоритме, в том числе связанных с использованием табличных данных и выбором способа определения объемного кровенаполнения  $V_b$ .



**Рис. 6.** Пример зарегистрированных спектров флуоресценции симметричных участков кожи (интактной и облученной) второго животного через 48 часов после облучения,  $\lambda_e = 515$  нм.

Диагностические объемы биотканей для методов ЛФС и СДО для правильной работы алгоритма должны максимально совпадать. Это означает, что данные методы должны быть реализованы в одном устройстве, с определенной геометрией освещения и регистрации оптического излучения. Для применения формулы (2) на практике необходимо знание  $\mu_{abl}$ ,  $\mu_{af}$  и  $\mu_{a,tiss}$  на интересующих длинах волн и  $V_b$ . Как известно, данные величины напрямую измерить невозможно, потому для их расчетов используются разные модели и экспериментальные подходы, что приводит к большому разбросу показателей в разных литературных источниках. Особенно остро данная проблема наблюдается при поиске значений поглощения чистых эндогенных флюорофоров. Так, например,  $\mu_{af}$  для коллагена могут различаться на два порядка в зависимости от используемых сырья и растворителей, способов измерения и расчетов [42]. Результаты вычисления сильно зависят от выбранных литературных данных, и при неверно выбранных параметрах могут даже увеличить влияние  $V_b$  на сигнал флуоресценции. Проблему выбора используемых табличных данных теоретически можно решить при помощи измерений с биологических фантомов, содержащих природные флюорофоров в тех формах, в каких они присутствуют в биоткани, и крови. Однако разработка фантомов, адекватно моделирующих биоткань, — нетривиальная задача.

### Заключение

Представленные в работе результаты применения аналитического подхода к расчету относительного содержания флюорофора показали возможность компенсировать в алгоритме обработки данных влияние кровенаполнения на регистрируемые спектры флуоресценции. Зарегистрированные потоки флуоресценции патологически измененных и интактных областей на практике могут не отличаться, если патология связана с локальным воспалением и, соответственно, с увеличением объемного кровенаполнения. Например, локальное увеличение концентрации ФС, циркулирующего в крови, может не регистрироваться прибором из-за увеличения поглощения света кровью. Учет данного феномена, возможно, позволит более точно клиницистам регистрировать патологические процессы на фоне воспаления и упростит интерпретацию данных ЛФС *in vivo* в клинической практике.

### Список литературы

1. Firdous, S. Development and Imaging of Zinc Oxide Nanorods as a Photosensitizer for the Diagnosis and Treatment of Cancer Using Lasers // *Laser Phys. Lett.* IOP Publishing, 2018. Vol. 15. No. 9. P. 95604. DOI: 10.1088/1612-202X/Aad28c
2. Pogue, B. W. et al. Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies // *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 2010. Vol. 16. No. 3. P. 493–505. DOI: 10.1109/JSTQE.2009.2034541
3. Wu, C. et al. In-Vivo Optical Imaging in Head and Neck Oncology: Basic Principles, Clinical Applications and Future Directions // *Int. J. Oral Sci.* 2018. Vol. 10. No. 2. P. 1–13. DOI: 10.1038/s41368-018-0011-4
4. Fischer, T. et al. Detection of Rheumatoid Arthritis Using Non-Specific Contrast Enhanced Fluorescence Imaging // *Acad. Radiol.* 2010. Vol. 17. No. 3. P. 375–381. DOI: 10.1016/j.acra.2009.09.016

5. Peng, C. et al. Detection and Photodynamic Therapy of Inflamed Atherosclerotic Plaques in the Carotid Artery of Rabbits // J. Photochem. Photobiol. B Biol. 2011. Vol. 102. No. 1. P. 26–31. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2010.09.001
6. Kandurova, K. et al. Application of the Fluorescence Spectroscopy for the Analysis of the State of Abdominal Cavity Organs Tissues in Mini-Invasive Surgery // Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI.: International Society for Optics and Photonics. 2018. P. 106854P. DOI: 10.1117/12.2290037
7. Yim, J. J. et al. Short-Wave Infrared Fluorescence Chemical Sensor for Detection of Otitis Media // ACS Sensors. 2020. Vol. 5. No. 11. P. 3411–3419. DOI: 10.1021/acsensors.0c01272
8. Петрицкая Е. Н. и др. Использование флуоресцентной спектроскопии для диагностики гипоксии и воспалительных процессов в тканях // Оптический журнал. 2015. Т. 82. № 12. С. 41–46.
9. Тарасов Д. С. и др. Распределение фотосенсибилизатора на основе индотрикарбоданинового красителя в тканях животных in Vivo // Доклады Белорусского государственного университета информатики и радиоэлектроники. 2018. Т. 7. № 117.
10. Mizutani, T. et al. Carbonylated Proteins Exposed to UVa and to Blue Light Generate Reactive Oxygen Species Through a Type I Photosensitizing Reaction // J. Dermatol. Sci. 2016. Vol. 84. No. 3. P. 314–321. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.09.016
11. Морозова Н. Б. и др. Доклиническое изучение препарата «Бактериосенс», предназначенного для фотодинамической терапии злокачественных новообразований, в том числе рака предстательной железы // Российский биотерапевтический журнал. 2018. Т. 17. № 3.
12. Чернышев И. В., Ханакаев Р. А. Анализ собственной и индуцированной флуоресценции злокачественных новообразований и интактных тканей почек // Экспериментальная и клиническая урология. 2014. № 4.
13. Dunaev, A. V. et al. Individual Variability Analysis of Fluorescence Parameters Measured in Skin with Different Levels of Nutritive Blood Flow // Med. Eng. Phys. 2015. Vol. 37. No. 6. P. 574–583. DOI: 10.1016/j.medengphys.2015.03.011
14. Рогаткин Д. А. Физические основы современных оптических методов исследования микрогемодинамики in Vivo. Лекция. // Медицинская физика. 2017. № 4. С. 75–93.
15. Patwardhan, S.V. et al. Time-Dependent Whole-Body Fluorescence Tomography of Probe Bio-Distributions in Mice // Opt. Express. 2005. Vol. 13. No. 7. P. 2564–2577. DOI: 10.1364/OPEX.13.002564
16. Рогаткин Д. А., Смирнова О. Д. Математическое моделирование регистрируемых сигналов в медицинской лазерной неинвазивной флуоресцентной диагностике // Оптический журнал. 2013. Т. 80. № 9. С. 54–60.
17. Hervy, L. et al. Noncontact Fluorescence Diffuse Optical Tomography of Heterogeneous Media // Appl. Opt. 2007. Vol. 46. No. 22. P. 4896–4906. DOI: 10.1364/AO.46.004896
18. Kim, A. et al. Quantification of in Vivo Fluorescence Decoupled From the Effects of Tissue Optical Properties Using Fiber-Optic Spectroscopy Measurements // J. Biomed. Opt. 2010. Vol. 15. No. 6. P. 67006. DOI: 10.1117/1.3523616
19. Valdes, P. A. et al. 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence in Meningioma: Qualitative and Quantitative Measurements in Vivo // Oper. Neurosurg. 2014. Vol. 10. No. 1. P. 74–83. DOI: 10.1227/NEU.0000000000000117
20. Valdes, P. A. et al. Quantitative Fluorescence in Intracranial Tumor: Implications for ALA-Induced PpIX as an Intraoperative Biomarker // J. Neurosurg. 2011. Vol. 115. No. 1. P. 11–17. DOI: 10.3171/2011.2.JNS101451
21. Разницына И. А. Аналитический алгоритм определения концентрации флюорофора в биоткани с учетом кровенаполнения по данным неинвазивных оптических методов // Медицинская физика. 2020. № 2. С. 52–60.
22. Zheng, P., Kligman, L. H. UVA-Induced Ultrastructural Changes in Hairless Mouse Skin: a Comparison to UVB-Induced Damage // J. Invest. Dermatol. 1993. Vol. 100. No. 2. P. 194–199. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12462807
23. Valacchi, G. et al. Ozone Potentiates Vitamin E Depletion by Ultraviolet Radiation in the Murine Stratum Corneum // FEBS Lett. 2000. Vol. 466. No. 1. P. 165–168. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01787-1
24. Решетников А. В. и др. В сб. «Использование лазеров для диагностики и лечения заболеваний. Научно-информационный сборник» (приложение к бюллетеню «Лазер-информ»), в печати. 2001. Т. 3.
25. Рогаткин Д. А. об особенности в определении оптических свойств мутных биологических тканей и сред в расчетных задачах медицинской неинвазивной» спектрофотометрии // Медицинская техника. 2007. № 2. С. 10–17.
26. Kokhanovsky, A. A. Radiative Properties of Optically Thick Fluorescent Turbid Media // JOSa A. 2009. Vol. 26. No. 8. P. 1896–1900. DOI: 10.1364/JOSAA.26.001896
27. Рогаткин Д. А. Физические основы оптической оксиметрии // Медицинская физика. 2012. № 2. С. 97–114.
28. Tabulated Molar Extinction Coefficient for Hemoglobin in Water. URL: <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/summary.html>
29. Durduran, T. et al. Diffuse Optics for Tissue Monitoring and Tomography // Reports Prog. Phys. 2010. Vol. 73. No. 7. P. 76701. DOI: 10.1088/0034-4885/73/7/076701
30. Nishidate, I. et al. Visualizing of Skin Chromophore Concentrations by Use of RGB Images // Opt. Lett. 2008. Vol. 33. No. 19. P. 2263–2265. DOI: 10.1364/OL.33.002263
31. Рогаткин Д. А. Физические основы лазерной клинической флуоресцентной спектроскопии in Vivo // Медицинская физика. 2014. Т. 4. № 64. С. 78–96.
32. 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. DOI: 10.31857/S0032816220020068
33. Treuting, P.M. et al. Comparative Anatomy and Histology: a Mouse and Human Atlas (Expert Consult). Academic Press, 2011.
34. Гержик А. А., Разницына И. А. Определение кровенаполнения биотканей по их RGB изображению с использованием регрессионных уравнений // Лазеры в науке, технике, медицине. 2020. Т. 31. С. 108–110.
35. Странадко Е. Ф., Армичев А. В., Гейниц А. В. Источники света для фотодинамической терапии // Лазерная медицина. 2011. Т. 15. № 3. С. 63–69.
36. Oliveira Mima, E. G. de et al. Susceptibility of Candida Albicans to Photodynamic Therapy in a Murine Model of Oral Candidosis // Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology. 2010. Vol. 109. No. 3. P. 392–401. DOI: 10.1016/j.tripleo.2009.10.006
37. Morimoto, K. et al. Photodynamic Therapy Using Systemic Administration of 5-Aminolevulinic Acid and a 410-nm Wavelength Light-Emitting Diode for Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus-Infected Ulcers in Mice // PLoS One. 2014. Vol. 9. No. 8. P. e105173. DOI: 10.1371/journal.pone.0105173

38. Dupont, E., Gomez, J., Bilodeau, D. Beyond UV Radiation: a Skin Under Challenge // *Int. J. Cosmet. Sci.* 2013. Vol. 35. No. 3. P. 224–232. DOI: 10.1111/Ics.12036
39. Schyrmann, S. et al. Label-Free Imaging of Inflammatory Bowel Disease Using Multiphoton Microscopy // *Gastroenterology*. 2013. Vol. 145. No. 3. P. 514–516.
40. Schae, D., Ratikan, J.A., Iwamoto K.S. Cellular Autofluorescence Following Ionizing Radiation // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. No. 2. P. e32062. DOI: 10.1371/Journal.Pone.0032062
41. Разницына И. А., Макматов-Рысь М.Б., Рогаткин Д. А. Аппаратное и алгоритмическое обеспечение лазерной флуоресцентной диагностики острого локального воспаления различной этиологии // *Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии-ФРЭМЭ'2020*. 2020. С. 145–149.
42. Пушкарева А. Е., Кузнецова А. А. Компьютерное моделирование в оптике биотканей // *СПб Университет ИТМО*. 2016.

**Поступила 30 сентября 2021 г.**

## ALGORITHM AND DEVICE TESTING FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF SKIN FLUORESCENCE WITH REGARD TO A RELATIVE BLOOD VOLUME IN IT ON THE EXAMPLE OF RADIATION-INDUCED ERYTHEMA IN ANIMALS

A.A. GERZHIK, P.A. GLAZKOVA, AND I.A. RAZNITSYNA

doi: 10.25210/jfop-2104-010021

One of the key elements of modern devices for laser non-invasive medical fluorescence spectroscopy in vivo are computational algorithms used at the stage of data processing to obtain the desired biomedical information from registered physical signals from a biological object. An important task at development of biological tissues fluorescence signal processing algorithms is to compensate for the influence of relative blood volume that contributes significantly to absorption and scattering properties of the studied area of the object. In the present study, we analyzed the application possibilities of analytical algorithm based on a modified Kubelka-Munk model for calculating the relative fluorescence concentration, which makes it possible to take into account the biological tissues' blood volume. The algorithm was validated in experiments on nonlinear white mice with radiation-induced erythema, simulating different levels of the relative blood volume in skin. Quantitative assessment of relative blood volume of area under the investigation was conducted using a color analysis of digital images from the RGB camera via regression equations. Obtained values were used during processing of endogenous and exogenous fluorescence spectra of both irradiated and intact skin. Analysis of the obtained data showed that the developed algorithm, in contrast to conventional methods, can detect a significant increment in the relative fluorophore concentration 48 hours after irradiation. Thus, it has been demonstrated that excluding the influence of blood absorption on the results of quantitative fluorescence analysis can improve the accuracy of diagnosis of pathological processes on the backdrop of inflammation and simplify the interpretation of the results. To improve the accuracy of the algorithm, it is recommended to pay more attention to the tabular data used, in particular, the absorbance coefficients of pure endogenous fluorophores, which show a strong variation in different publications. The problem of choosing the tabular data can be solved by performing measurements from phantoms, properly simulating biological tissues, the development of which is still a non-trivial task for biomedical engineers.