

## ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЛАЗЕРНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ *IN VIVO*

Д.А. Рогаткин

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

Рассмотрены физические принципы лазерной клинической флюоресцентной спектроскопии *in vivo* – неинвазивного оптического диагностического метода, предназначенного для оценки содержания в тканях человека различных флюорофоров природного и искусственного происхождения. Приводятся все необходимые термины и определения. Дается информация о технических особенностях конструкции простейших оптических спектральных приборов для реализации метода, об областях и проблемах применения метода в медицине. Обсуждаются вопросы метрологии таких измерений, а также проблемы построения вычислительных алгоритмов для обработки и анализа результатов измерений. Даются методические рекомендации по применению метода в практической медицине.

Ключевые слова: биологические ткани, диагностика, флюоресценция, спектроскопия, свет, длина волны, поглощение, рассеяние, флюорофор

Явление *флюоресценции*\* заключается в испускании возбужденными атомами и/или молекулами вещества нетепловых квантов света (надтепловая компонента излучения) и формально является разновидностью более общего физического явления люминесценции, включающего в себя как флюоресценцию, так и фосфоресценцию, различающихся временем жизни (затухания) излучения, хотя такое деление и считается сегодня уже достаточно устаревшим [1]. Если возбужденное состояние атомов или молекул возникает при этом в системе случай-

но, за счет, например, случайных тепловых флуктуаций, то такая флюоресценция называется спонтанной. Если же возбуждение вызывается внешним целенаправленным воздействием, например, действием внешнего, освещающего молекулы и атомы вещества оптического излучения, то такая флюоресценция называется вынужденной флюоресценцией. Часто в литературе по биомедицинской оптике она именуется автофлюоресценцией (*autofluorescence*).

---

\* Во многих русскоязычных публикациях, особенно XX века, чаще можно встретить термин *флуоресценция*. Смысловое содержание этих названий эквивалентно, а выбор третьей буквы в написании термина определяется предпочтением переводчика (от английского *fluorescence*) и правилами орфографии русского языка. В орфографических словарях до 1970 г. издания (напр. под ред. С.И. Ожегова и А.Б. Шапиро, 1957) содержится слово *флуоресценция*. Орфографический словарь русского языка 1978 г. под ред. С.Г. Бархударова и соавт. содержит термин *флюоресценция* (а также *флюоресцировать*, *флюорография* и пр.). Самый же последний на сегодняшний день словарь Института русского языка РАН под ред. О.Е. Ивановой, Л.К. Чельцовой и соавт. от 2004 г. содержит уже оба термина (и *флуоресценция*, и *флюоресценция*) как равнозначные. Поскольку исторически термин этот произошел от названия минерала *флюорит*, у которого это явление впервые и было обнаружено [1], а флюорография звучит более привычно, нежели флуорография, мы в своих публикациях используем термин *флюоресценция*.

Согласно классической теоретической спектроскопии молекул [2, 3 и др.], квантовомеханическое состояние молекул (полный момент количества движения) характеризуется понятием мультиплетности, зависящим от суммарного спина электронов молекулы. Соответственно, различают синглетные (S), триплетные (T) и иные состояния молекул, характеризующиеся различными энергетическими уровнями. Основное состояние (с наименьшей энергией) большинства молекулярных систем – синглетное  $S_0$ , в котором все электроны спарены. При возбуждении молекулы, система переходит на более высокий энергетический уровень, например  $S_1$ , в котором может находиться некоторое время (метастабильное состояние), теряя затем энергию в процессе обратных переходов или различных других фотохимических или фотофизических процессов. Согласно правилу интеркомбинационного запрета при возбуждении разрешенными являются лишь переходы между уровнями одной мультиплетности. Электронные спектры переходов  $S_0 \rightarrow S_1$  соответствуют спектрам поглощения молекулы. Обратные же переходы могут быть различны и несут названия:

- ✓ Флюоресценция:  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$  (свет).
- ✓ Релаксация:  $S_1 \rightarrow S_0 + Q$  (тепло).
- ✓ Интеркомбинационная конверсия:  $S_1 \rightarrow T_1 + Q$ .
- ✓ Фосфоресценция:  $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ .
- ✓ Интеркомбинационная деградация:  $T_1 \rightarrow S_0 + Q$ .
- ✓ Замедленная флюоресценция:  $T_1 \rightarrow S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ .

Спектры флюоресценции и фосфоресценции в общем случае для любого вещества различны. Различно и время жизни молекул в каждом из этих возбужденных состояний. Испускаемые в актах люминесценции кванты света с энергией  $h\nu$  отличаются при вынужденных процессах от исходных возбуждающих квантов света более низкими значениями энергии и, следовательно, большей длиной волны, т.е. они более “красные”. Существуют также и высшие синглетные состояния ( $S_2, S_3, \dots$ ), правда, излучательные переходы с них существенно более редки, поэтому мы не будем здесь о них говорить.

При способах регистрации спектров флюоресценции *in vivo*, описываемых в данной статье далее, как правило используется так называемый матричный фотоприемник (внутри прибора) с возможностью накопления и сохранения заряда (например, ПЗС-фотоприемник). В этом случае регистрируется, вообще говоря,

не только сигнал флюоресценции, но и любой другой (суммарный) сигнал от всех излучательных переходов молекул внутри биоткани. Таким образом, неправильно, видимо, при описании результатов флюоресцентной спектроскопии *in vivo* говорить только о флюоресцентной диагностике в строгом смысле понимания рабочего перехода  $S_1 \rightarrow S_0$ . Не исключено, что в сигнале присутствуют и компоненты фосфоресцентного излучения, замедленной флюоресценции а также комбинационного рассеяния. Поэтому термины *флюоресцентная диагностика*, *флюоресцентная спектроскопия* и т.п. в медицине, вообще говоря, надо рассматривать как весьма условные, хотя они и достаточно уже устоялись в специализированной литературе по биомедицинской оптике. С точки зрения анализа и интерпретации результатов обследования пациента эти нюансы и вовсе не принципиальны. Как мы увидим далее, основной результат такой диагностики должен выражаться в терминах регистрируемых в тканях веществ и их количеств (концентрации). Были бы от этих веществ зафиксирован сигнал флюоресценции или фосфоресценции – для врача не столь важно. Кроме того, вынужденная флюоресценция, все же, в большинстве случаев при небольшой мощности излучения накачки в непрерывном режиме облучения – доминирующий процесс. Поэтому далее, для краткости, мы будем говорить о флюоресценции или в общем о люминесценции.

В целом методы люминесцентной диагностики, как одного из направлений спектрофотометрической диагностики в медицине, известны уже достаточно давно, практически с начала XX века [4–6]. Но как инструмент для практикующих врачей в свое время они не получили широкого распространения из-за несовершенства конструкции источников света, громоздких ламповых электронных усилителей, сложных в эксплуатации классических спектральных оптических приборов и т.п. [7]. До середины 1980-х гг. они использовались, главным образом, *in vitro* в области лабораторного клинического анализа [5, 8–11]. При лабораторном флюоресцентном анализе наличие молекул в растворах определяют на спектрофотометре (спектрофлюориметре) по спектрам флюоресценции раствора при его освещении монохроматическим или квазимонохроматическим излучением определенной длины волны [5]. Как правило, используется техника регистрации излучения “на просвет” (в проходящем

свете) в кварцевой кювете, наполненной раствором исследуемой субстанции. Большинство органических и неорганических молекул имеют свои собственные “индивидуальные” спектры флюоресценции [6], поэтому они могут быть легко идентифицированы методами оптического спектрального анализа даже в условиях очень незначительных концентраций в растворах (до  $10^{-10}$  степени моль/л и менее).

Базовое классическое уравнение, определяющее интенсивность флюоресценции вещества в кювете, хорошо известно [10]:

$$I_f(\lambda_f) = 2,3 \cdot I_0(\lambda_e) \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot \mu_{af}(\lambda_e) \cdot d. \quad (1)$$

Здесь:  $I_f(\lambda_f)$  – интенсивность излучения флюоресценции на длине волны  $\lambda_f$  на выходе из кюветы,  $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$  – квантовый выход флюоресценции исследуемого вещества,  $I_0(\lambda_e)$  – интенсивность исходного, возбуждающего излучения на длине волны  $\lambda_e$  на входе в кювету,  $\mu_{af}(\lambda_e)$  – коэффициент поглощения (погонный коэффициент поглощения [ $\text{см}^{-1}$ ]) возбуждающего излучения исследуемым флюоресцирующим веществом на длине волны возбуждения  $\lambda_e$ ,  $d$  – длина оптического пути излучения в кювете (толщина кюветы). Поскольку, как известно [11]:

$$\mu_{af}(\lambda_e) = \varepsilon_f(\lambda_e) \cdot c_f \quad (2)$$

где  $\varepsilon_f(\lambda_e)$  – молярный коэффициент экстинкции флюоресцирующего вещества [ $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} / \text{см}$ ],  $c_f$  – молярная концентрация флюоресцирующего вещества в кювете [моль/л], уравнения (1) и (2) совместно позволяют определять концентрацию этого вещества по измерениям  $I_f(\lambda_f)$  при известных  $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$ ,  $\varepsilon_f(\lambda_e)$  и  $d$ .

Эта расчетная схема не учитывает того факта, что флюоресцирующее вещество растворено в другом веществе, которое тоже может поглощать излучение, причем как возбуждающее, так и излучение флюоресценции – растворитель в этой схеме считается идеально прозрачным. Не учитывается здесь и возможная оптическая неоднородность раствора, т.е. не принимается во внимание возможное рассеяние света на неоднородностях среды распространения излучения. При изучении флюоресценции идеально гомогенного мономолекулярного раствора какого-либо вещества с постоянным  $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$  в непоглощающем растворителе в кювете с известной толщиной  $d$ , в правой части уравнения (1) с учетом (2) остается только

одна переменная величина – концентрация флюоресцирующего вещества в растворе  $c_f$ . Интенсивность флюоресценции в этом случае прямо пропорциональна  $c_f$  (в определенных пределах), что и используется в лабораторной практике флюоресцентного анализа растворов *in vitro*. Нелинейный характер зависимости  $I_f(\lambda_f)$  от  $c_f$  рассматривается в такой упрощенной схеме только в связи с проблемами больших концентраций (при больших концентрациях квантовый выход  $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$  для многих веществ становится значимой и нелинейной функцией  $c_f$ ), либо в связи с вопросом точности получения линейного решения (1) из нелинейного уравнения Бугера путем разложения экспоненты в ряд и удержания первого линейного члена разложения. Этот вопрос подробно рассмотрен в книге [11].

При исследованиях уже даже на клеточном уровне ситуация резко меняется [9]. Клетка, как объект спектральных измерений, представляет собой многокомпонентную гетерогенную полидисперсную систему, весьма сложным образом взаимодействующую с падающим на нее излучением [8–10]. В этом случае в правой части уравнения (1) оказываются неизвестными все сомножители кроме  $I_0(\lambda_e)$ . Все  $\mu_{af}(\lambda_e)$ ,  $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$  и  $c_f$  становятся неопределенными, т.к. в целостной клетке много разных флюорофоров могут поглощать  $I_0(\lambda_e)$  и вызывать  $I_f(\lambda_f)$ . Их парциальные концентрации в клетке также заранее не известны. Флюоресценция каждого из веществ будет вносить свой вклад в суммарную  $I_f(\lambda_f)$ , так что вопрос определения наличия и концентрации веществ в живой клетке существенно усложняется. Если, например, в двух участках одной и той же клетки зарегистрированы разные спектры флюоресценции, то в общем случае без привлечения дополнительной информации нет возможности определить, с чем это связано. Возможно, появилось новое флюоресцирующее вещество, возможно, изменились  $\varphi(\lambda_e, \lambda_f)$  у веществ и т.д. Более того, само уравнение (1) перестает быть верным, т.к. оно выведено из простейшего закона Бугера, которое не учитывает многокомпонентность среды и возможное увеличение в ней длины оптического пути  $d$  вследствие переотражения и рассеяния излучения на неоднородностях внутренней структуры клетки.

Тем не менее, несмотря на эти сложности, флюоресцентная спектроскопия широко применяется сегодня и на клеточном уровне. Для

этого используются различные микроспектрофлюориметры и люминесцентные микроскопы [7, 8, 10].

Люминесцентный микроскоп в принципе – обычный световой микроскоп на нужный спектральный диапазон длин волн, но снабженный дополнительными светофильтрами для возбуждения и наблюдения флюоресценции. Как правило, один светофильтр устанавливается на широкополосный (белый) источник освещения в микроскопе, чтобы вычленил необходимый спектральный диапазон длин волн возбуждения флюоресценции, а второй фильтр устанавливается на окуляр, чтобы выделить диапазон регистрации флюоресценции и отрезать (задавить) возбуждающее излучение. Марок и типов таких микроскопов по всему миру сегодня – сотни.

Боле того, это же рассеяние и многократные переотражения света на структурах клеток и тканей делают возможным при изучении клеток и фрагментов тканей *ex vivo*, а тем более клеток и тканей *in vivo* и *in situ* (т.е. лежащих на поверхности органа, не выделенного из организма животного или человека), реализацию схем измерений не на просвет, а на отражение, в рассеянном свете. В противном случае, многие клинические техники флюоресцентной спектроскопии *in vivo* просто нельзя было бы реализовать, т.к. на просвет (в светлом поле) измерения возможны лишь в отдельных единичных участках тела человека. Измерения же на отражение (в темном поле) вполне пригодны во многих практически важных случаях. Есть сообщения о примерах использования *in situ* сочетанной люминесцентной темнопольной микроспектрофотометрии и эндоскопической техники даже при внутриволокнистых обследованиях пациентов [12]. Но это, скорее, экзотика. Основная же часть люминесцентных микроскопов, как светлопольных, так и темнопольных, включая и конфокальные люминесцентные микроскопы, используется, все же, в лабораториях для исследования культур клеток и фрагментов тканей *ex vivo* и *in vitro* при их дополнительной окраске специальными люминесцентными (флюоресцентными) красителями, избирательно окрашивающими разные структуры клеток и тканей, что позволяет их идентифицировать по спектрам флюоресценции. Это так называемые методы люминесцентной цитохимии, гистохимии и т.д.

И только с появлением в конце XX века недорогих лазерных излучателей, интегральной

электроники, волоконной оптики и персональных компьютеров появилась возможность создания достаточно удобных, малогабаритных и дешевых диагностических систем для нужд не только лабораторий, но и других подразделений клиник [13–18 и др.]. Наиболее известными из них и доведенными до уровня официально зарегистрированных изделий медицинского назначения, разрешенных к применению в медицине в нашей стране, являются лазерные диагностические комплексы ЛЭСА и ЛАКК-М. Аналогичные комплексы есть и за рубежом. Эти диагностические системы содержат в своем составе малогабаритные оптоволоконные спектроанализаторы, которые позволяют регистрировать и количественно измерять интенсивности обратно рассеянного тканями исходного (возбуждающего) излучения и излучения флюоресценции как функцию длины волны, т.е. определять спектральную плотность мощности вторичного излучения от биоткани.

Упрощенная блок-схема такого спектроанализатора представлена на рис. 1. Для возбуждения флюоресценции в тканях *in vivo* сегодня, как правило, используется маломощные (мощность  $P < 10$  мВт) непрерывные лазеры на выбранную длину волны или узкополосные светодиодные излучатели. Это наиболее дешевое конструктивное решение, позволяющее использовать оптоволоконные зонды для транспортировки излучения к биоткани и обратно [15]. Диагностическая система ЛАКК-М, например, содержит несколько таких лазерных и светодиодных источников излучения на длины волн  $\lambda_c = 365, 532$  и  $635$  нм. Излучение от лазеров 1 доставляется к поверхности биоткани 2 по осветительному световоду 3, являющемуся одной из жил (обычно центральной) многожильного оптоволоконного зонда 4, содержа-

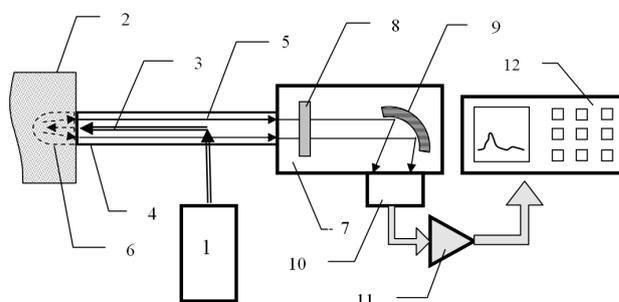
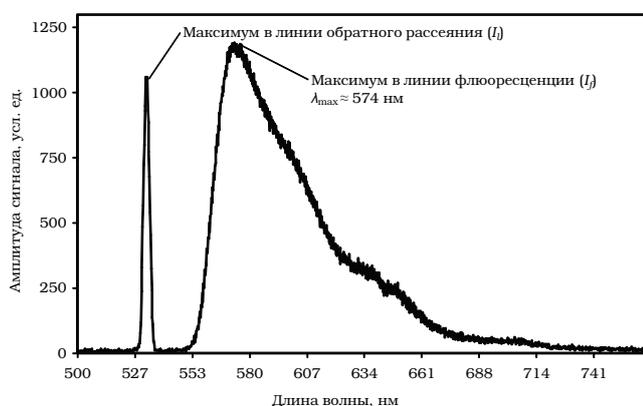


Рис. 1. Блок-схема лазерного спектроанализатора для *in vivo* флюоресцентной спектроскопии в клинике. Пояснения в тексте

щего, кроме осветительного, еще и набор приемных оптических волокон 5, по которым регистрируемое от биоткани вторичное излучение (рассеянное, флуоресценции), формирующееся в диагностическом объеме биоткани 6 [19], доставляется в полихроматор 7. Внутри полихроматора излучение проходит пороговый обрезкающий оптический фильтр 8, ослабляющий исходное излучение на длине волны генерации лазера примерно в 1000 раз, и разлагается в спектр диспергирующим элементом 9 – дифракционной решеткой. Далее весь этот спектр регистрируется линейным фотоприемником 10, преобразуется в электрический сигнал пропорционально падающей на фотоприемник спектральной плотности мощности, электрический сигнал усиливается усилителем 11 и через стандартное устройство сопряжения подается для дальнейшей обработки в компьютер 12. Благодаря матричному многоэлементному фотоприемнику и полихроматору весь спектр вторичного излучения, включая и спектр флуоресценции, можно сразу наблюдать на экране монитора компьютера в реальном времени.

На рис. 2 приведен пример регистрируемого *in vivo* каналом спектроанализатора комплекса ЛАКК-М спектра вынужденной эндогенной флуоресценции кожи хвоста белой лабораторной крысы при наличии в области обследования очага воспаления. На графике отчетливо прослеживаются два максимума спектральной плотности мощности. Первый –  $I_r$ , более острый, представляет собой зарегистрированное обратно рассеянное кожей излучение на длине



**Рис. 2.** Вид спектра флуоресценции на экране монитора. Возбуждение флуоресценции в линии 532 нм. Предположительно люминесценция липофусцина

волны генерации лазера (в данном примере 532 нм, зеленый диапазон спектра). Второй –  $I_f$ , более пологий, располагается правее в более длинноволновой области спектра и является следствием наличия большой концентрации в коже хвоста крысы эндогенных флуорофоров, в данном случае, наиболее вероятно, липофусцина\*. Для нормальных (здоровых) тканей величина  $I_f(\lambda)$  в этом спектральном диапазоне длин волн обычно существенно меньше представленной на графике. Чаще всего она еле-еле проявляется на уровне фона (нуля) или регистрируется чуть выше нуля с амплитудой сигнала, не превышающей 100 усл. ед. Провал же на графике рис. 2 между длинами волн 532 нм и 550 нм обусловлен наличием в конструкции прибора обрезкающего порогового оптического фильтра 8 (рис. 1). Этот фильтр необходим, чтобы примерно выровнять по амплитудам  $I_r$  и  $I_f$ . Он не влияет на спектр флуоресценции (в данном примере в области длин волн больше 570 нм), немного искажает левый край спектра (область от 550 до 570 нм), но ослабляет  $I_r$  примерно в 1000 раз. В противном случае интенсивность флуоресценции была бы не видна на фоне мощного рассеянного лазерного излучения, т.к. реальные интенсивности обратно рассеянного возбуждающего излучения в тысячи раз больше интенсивности флуоресценции.

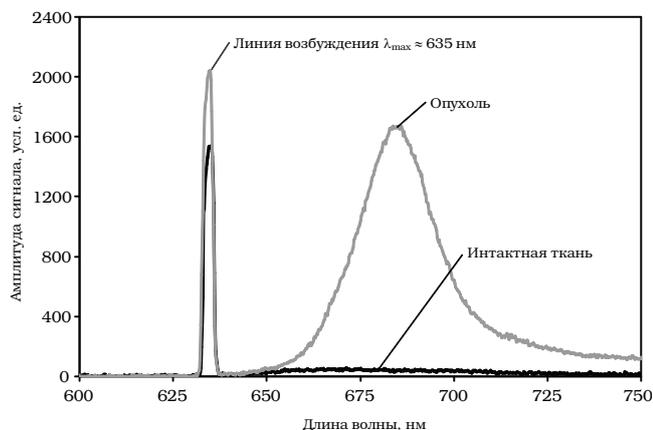
Существуют, конечно, и более сложные системы флуоресцентной диагностики, включающие, например, систему визуализации исследуемого поля [20], измерение времени жизни флуоресценции (времени затухания) [21] или совмещенные с приборами оптической когерентной и диффузионной томографии [22, 23], но физические основы флуоресцентной спектроскопии для всех этих систем, а также проблемы анализа и обработки данных – общие. Поэтому здесь мы не будем касаться более сложных систем, тем более в России они пока не получили широкого распространения, а ограничимся примером простейших спектроскопических медицинских диагностических комплексов типа ЛЭСА и ЛАКК-М.

Сегодня одним из наиболее массовых и признанных применений методов флуоресцентной спектроскопии *in vivo* в клинике на ос-

\* Согласно [9] это может также быть флуоресценция некоторых металлопорфиринов, например, Zn-Копропорфирина III, Zn-Протопорфириана IX и др.

нове этих систем является детекция факта наличия и оценка уровня накопления в тканях разнообразных экзогенных (искусственных) фотосенсибилизаторов для целей дифференциальной диагностики, фотодинамической терапии (ФДТ) и хирургической навигации при онкологических заболеваниях [13, 24–30 и др.]. Согласно существующим представлениям, многие фотосенсибилизаторы обладают способностью к повышенному накоплению в злокачественных опухолевых тканях в концентрациях, превышающих накопление в нормальных интактных тканях в 3–10 раз и более, а также способностью к сильной вынужденной флюоресценции под действием освещающего их лазерного излучения, т.е. способны переизлучать значительную часть поглощенной ими энергии (до 20–25 %) в виде квантов света с меньшей частотой (с большей длиной волны) [24, 26, 27]. Это позволяет при системном введении фотосенсибилизатора (внутривенно, например) онкологическому пациенту контрастировать его опухоль на фоне нормальных тканей. Рис. 3 демонстрирует такой пример с разной интенсивностью зарегистрированной флюоресценции с опухоли (рак дна полости рта) и интактной нормальной слизистой полости рта при системном введении онкологическому больному отечественного фотосенсибилизатора “Фотосенс”.

При нейрохирургических вмешательствах такое интраоперационное флюоресцентное контрастирование и флюоресцентная навигация по данным ряда авторов могут быть весьма информативны для хирурга, помогая



**Рис. 3.** Контрастирование опухоли при системном введении онкологическому больному фотосенсибилизатора Фотосенс

ему визуализировать границы новообразования [28, 29]. Есть ряд сообщений, что и просто первичное обнаружение очагов опухоли возможно с помощью флюоресцентного контрастирования. Например, в [30] сообщается, что у 10 из 200 больных со злокачественными опухолями основных локализаций (кожа, пищеварительный тракт, мочеполовая система) в исследовании были выявлены скрытые очаги рака и дисплазии при контрастировании новообразований отечественным фотосенсибилизатором порфиринового ряда – фотогомом.

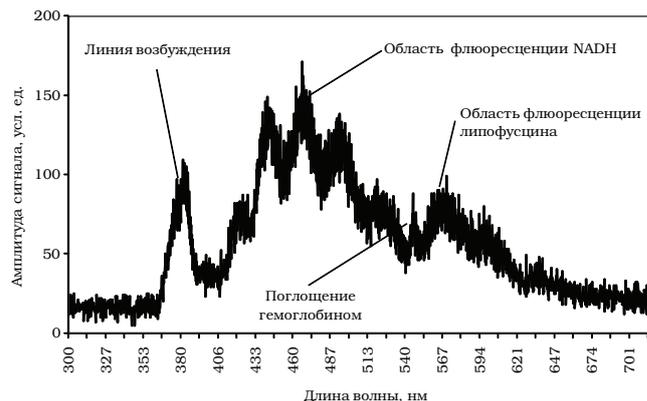
При проведении же ФДТ введение фотосенсибилизатора пациентам продиктовано не столько диагностическими задачами, сколько задачами лечебными. Согласно обобщенному протоколу ФДТ [24–27] до проведения сеанса терапии специальный фотосенсибилизатор принудительно вводится в организм пациента (внутривенно, внутримышечно или местно аппликационно). Введение осуществляется заранее, обычно за несколько часов или даже за сутки до проведения сеанса ФДТ, чтобы дать время фотосенсибилизатору накопиться в опухоли. После накопления фотосенсибилизатора в опухоли она облучается достаточно мощным лазерным излучением (до нескольких ватт на см<sup>2</sup>) с длиной волны, соответствующей полосе поглощения фотосенсибилизатора. Энергия возбужденных молекул фотосенсибилизатора за счет последующих столкновений передается молекулам кислорода, переводя молекулы O<sub>2</sub> в возбужденное синглетное состояние, которые, в свою очередь, будучи активными окислителями обеспечивают деструкцию опухоли. Констатацию же самого факта максимального накопления фотосенсибилизатора и его динамику в опухоли при облучении опухоли лазером как раз и обеспечивают методы флюоресцентной спектроскопии *in vivo*. Это составляет сегодня основной предмет лазерной флюоресцентной диагностики в ФДТ [13, 18, 24, 25, 27, 31].

Однако гораздо более широкие перспективы флюоресцентной спектроскопии *in vivo* заложены в возможности с ее помощью (при достаточной чувствительности аппаратуры) регистрировать очень слабые свечения различных природных (эндогенных) флюорохромов, всегда присутствующих в наших клеточных тканях и жидкостях внутри организма: витаминов, порфиринов, флавинов, NADH, эластина, коллагена и ряда других по типу рис. 2 [6, 16, 17, 32–36 и др.]. Интенсивность флюоресценции в данном случае и ее спектр будут зави-

сеть как от природы (класса) веществ, накапливающихся и содержащихся в тканях, так и от их концентрации в толще ткани. Т.е. в качестве специфической ниши флуоресцентной спектроскопии *in vivo* в более широком медицинском плане просматривается уникальная возможность регистрации и анализа прижизненного содержания в тканях и органах многих эндогенных природных флуоресцирующих веществ, во многом определяющих метаболизм и жизнеспособность всех наших клеток, тканей, органов и систем.

На рис. 2 уже был представлен спектр эндогенной флуоресценции кожи хвоста крысы в условиях воспаления. В разных других случаях для разных других флуорофоров, разных длин волн возбуждения флуоресценции и разных применяемых в приборах пороговых фильтров 8 форма спектра флуоресценции на экране монитора компьютера будет разной. Будет она разной и для разных типов приборов с разной аппаратной функцией преобразования. Она может содержать другие локальные максимумы, провалы и т.п. Например, может практически полностью отсутствовать в регистрируемом сигнале “лазерный пик”  $I_1$  в силу особенностей оптических схем регистрации, полного подавления фильтром 8 этой спектральной линии или в силу полного поглощения этого излучения кровью сосудистого русла в обследуемой клеточной биоткани. Одновременное присутствие в тканях нескольких флуорофоров приведет к сложному регистрируемому суммарному спектру флуоресценции этих веществ, с разным количеством максимумов и минимумов. Дополнительно достаточно сильные искажения спектров флуоресценции могут вызываться несовершенством конструкции полихроматоров, используемых в приборах, а также разной спектральной чувствительностью фотоприемных устройств этих приборов [37]. Поэтому при сравнении спектров флуоресценции, снятых разными авторами на разных установках, надо действовать весьма осторожно, всегда имея в виду возможные приборные и иные их искажения. Стандартизации аппаратной функции преобразования приборов в этой молодой области медицинской диагностики пока нет ни в одной стране мира (см. далее).

В качестве примера на рис. 4 представлен не скорректированный на приборные искажения и на поглощение света кровью суммарный спектр эндогенной флуоресценции базальноклеточного рака (базалиомы) кожи при



**Рис. 4.** Суммарный спектр эндогенной флуоресценции базалиомы кожи с неустраненными приборными и другими искажениями

возбуждении флуоресценции ультрафиолетовым излучением с максимумом в диапазоне длин волн около 375 нм. На спектре отчетливо прослеживаются несколько максимумов спектральной плотности мощности, раздельная интерпретация которых в терминах отдельных накопленных в тканях веществ уже весьма затруднительна. В частности, в области флуоресценции липофусцина здесь можно увидеть некий пик, но истинное его появление обусловлено, скорее всего, не повышенной концентрацией липофусцина или его повышенной  $\phi(\lambda_e, \lambda_p)$ , а предшествующим этой спектральной области провалом в спектре в районе 520–570 нм, вызванным поглощением света кровью [38].

Рис. 5 демонстрирует теоретический вид расчетных спектров флуоресценции в коже человека в зависимости от объема кровенаполнения дермы  $V_b$  и степени сатурации  $StO_2$  оксигемоглобина смешанной крови в микрососудистом русле дермы [38, 39]. Хорошо прослеживается уменьшение амплитуды и искажение формы спектра в зависимости от объема присутствующей крови, особенно в диапазонах длин волн 400–420 нм и 520–590 нм.

Как получают такие расчетные кривые? При реализации методов флуоресцентной спектроскопии *in vivo* для живых тканей уравнением (1) пользоваться уже нельзя. Во-первых, в биоткани, как в многокомпонентной среде, содержится большое количество различных хромофоров и флуорофоров, взаимодействие которых со светом не учитывается в (1). В частности, не учитывается стороннее поглощение света гемоглобином крови и эпидермальным

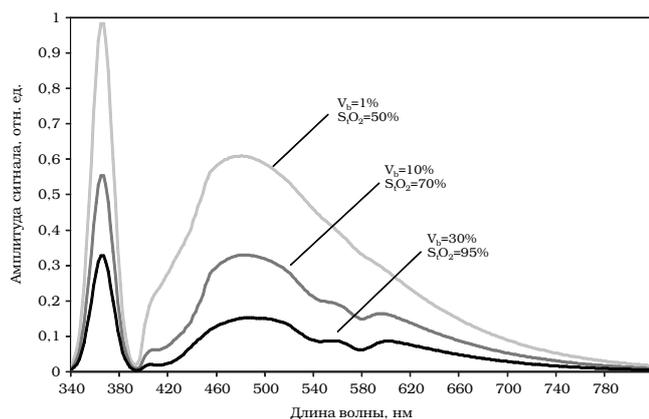


Рис. 5. Искажение формы спектра эндогенной флюоресценции в зависимости от объемного кровенаполнения при неизменной концентрации флюорофора  $c_f$

меланином – основными хромофорами тканей в видимом диапазоне света. Во-вторых, как уже упоминалось, толстые клеточные слои и фрагменты тканей вследствие их гетерогенности (оптической неоднородности) обладают сильным светорассеянием. Это принципиально меняет характер распространения света в них по сравнению с однородными прозрачными растворами. Доминирующим явлением становится рассеяние света, а не поглощение, поэтому для теоретического описания распределения поля излучения в такой среде необходимо использовать более сложные физико-математические модели и уравнения.

Одним из таких подходов является использование методов теории переноса и рассеяния света в мутных средах [40]. Теория переноса, как известно, оперирует модельным представлением среды, оптические свойства которой характеризуются не только коэффициентом поглощения  $\mu_a$ , но и коэффициентом рассеяния  $\mu_s$  (а также рядом других параметров рассеяния в зависимости от модельной постановки задачи [41–44]), которые являются детерминированными константами общего интегро-дифференциального уравнения переноса (транспортного уравнения), описывающего изменение поля излучения в среде по пути его распространения для выбранной длины волны (отдельно для  $\lambda_e$  и для  $\lambda_f$ ). Решение этого дифференциального уравнения (системы дифференциальных уравнений) в общем случае аналитически получить сложно, поэтому замкнутые точные решения известны сегодня лишь для ряда простейших случаев [40–42]. Например,

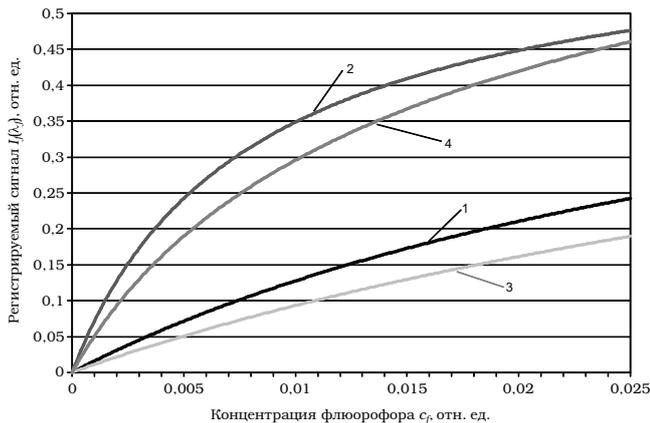
для случая простейшей одномерной задачи (1D) решение системы 2 транспортных уравнений в условиях многократного рассеяния хорошо известно как решение двухпоточковой модели Кубелки–Мунка [40], хотя аналогичное решение было независимо получено и нашим соотечественником Гуревичем [45]. На основе этих базовых решений для общего случая полубесконечной светорассеивающей среды можно получить аналогичное уравнению (1) точное аналитическое выражение для регистрируемой на отражение (обратно рассеянной) интенсивности флюоресценции  $I_f(\lambda_f)$ . Это выражение выглядит следующим образом [39]:

$$I_f(\lambda_f) = I_0(\lambda_e) \cdot \varphi(\lambda_e, \lambda_f) \cdot \mu_{af}(\lambda_e) \cdot \gamma(\lambda_e, \lambda_f). \quad (3)$$

Однако, в отличие от уравнения (1), в этом выражении параметр  $\gamma(\lambda_e, \lambda_f)$  зависит не от  $d$  (рассматриваемое приближение полубесконечного слоя подразумевает предел  $d \rightarrow \infty$ , а является сложной нелинейной функцией всех учитываемых в модели оптических свойств и компонентов среды, причем как для длины волны возбуждения  $\lambda_e$ , так и для рассматриваемой  $\lambda_f$ . Он определяет, видимо, с физической точки зрения некую эффективную длину пути луча света в светорассеивающей среде при измерении обратно рассеянного излучения (с передней поверхности среды) в зависимости от  $\lambda$ .

Поскольку для разных длин волн из-за наличия рассеяния и многокомпонентности состава биоткани он будет разным, то в результате формируются отличия и искажения спектра флюоресценции вещества *in vivo* в ткани от спектра флюоресценции этого же вещества в прозрачном растворе в кювете по (1). Более того, рассматривая подробно физические основы флюоресцентной спектроскопии светорассеивающих сред, необходимо ясно понимать, что параметр  $\gamma(\lambda_e, \lambda_f)$  является сложной функцией  $\mu_{af}(\lambda_e)$ , что означает общую нелинейную зависимость  $I_f(\lambda_f)$  от  $c_f$  для оптически мутных сред, причем вне зависимости от малости концентрации.

Для любых малых концентраций эта зависимость может оказаться существенно нелинейной или близкой к линейной в зависимости от сочетания оптических свойств флюорофора и обследуемой биоткани. Часто эта нелинейность обнаруживается исследователями в эксперименте (например, [46]). Рис. 6 демонстрирует поясняющий модельный теоретический пример из [47]. Видно, как увеличение  $\epsilon_f(\lambda_e)$



**Рис. 6.** Теоретическая нелинейная зависимость регистрируемого сигнала  $I_f(\lambda_f)$  от концентрации флюорофора в среде [47]. Коэффициент поглощения флюорофора  $\mu_{af}(\lambda_e)$ : 1, 3 –  $100 \cdot c_f \text{ см}^{-1}$ ; 2, 4 –  $500 \cdot c_f \text{ см}^{-1}$ . Коэффициент рассеяния ткани в упрощающем предположении  $\mu_s(\lambda_e) = \mu_s(\lambda_f)$ : 1, 2 –  $1 \text{ см}^{-1}$ ; 3, 4 –  $10 \text{ см}^{-1}$ . Суммарный коэффициент поглощения ткани без флюорофора  $\mu_{at}(\lambda_e) = 2 \text{ см}^{-1}$ . В диапазоне флюоресценции  $\mu_{af}(\lambda_f) = 0$  и  $\mu_{at}(\lambda_f) = 1 \text{ см}^{-1}$

приводит не только к росту амплитуды  $I_f(\lambda_f)$ , но и к увеличению нелинейности зависимости  $I_f(\lambda_f)$  от  $c_f$ . Увеличение же  $\mu_s$  немного снижает амплитуду  $I_f(\lambda_f)$  за счет просветления среды в условиях многократного рассеяния [38, 41], но не сказывается сильно на характере этой зависимости в целом.

Как следствие, обратные задачи даже для одного флюорофора в таком простейшем 1D случае для вычисления его концентрации в толще биоткани по зарегистрированному спектру флюоресценции решаются очень плохо, не говоря уже о многокомпонентной флюоресцирующей среде. Поэтому надежных, стандартизованных и общепринятых алгоритмов для обратных задач флюоресцентной спектроскопии *in vivo* сегодня пока нет.

В других модельных постановках, более сложных (2D и др.), точное решение задачи в замкнутом аналитическом виде, как правило, не известно даже для прямой задачи, поэтому для численных оценочных расчетов в большинстве случаев на практике приходится использовать метод статистического моделирования Монте-Карло [48, 49]\*. Однако, с его помо-

щью очень сложно анализировать поведение различных решений по типу рис. 6. Требуется огромный объем и время вычислений. Более того, в отличие от диапазона высокоэнергетических ионизирующих излучений, где метод Монте-Карло достаточно точен и повсеместно используется в расчетных задачах радиационной медицинской физики, в оптическом диапазоне вследствие явления многократного рассеяния он теряет свою точность, т.к. сложно определить средний вероятный пробег фотона в среде между соударениями и фазовую функцию рассеяния в каждом конкретном случае. Использование средней вероятной длины пробега фотона в простейшем виде  $l = 1/(\mu_a + \mu_s)$ , к чему часто прибегают авторы многих публикаций, вообще говоря, в оптическом диапазоне длин волн для мутных сред верно только в приближении однократного рассеяния [38, 41]. Но метод, все же, позволяет получать точечные оценки ожидаемых решений и как-то анализировать результат.

Тем не менее, несмотря на сложности вычислений концентраций, большое разнообразие природных флюоресцирующих органических веществ, присутствующих в живых клеточных тканях, открывает большие возможности для проведения методом флюоресцентной спектроскопии *in vivo* для доступных тканей и органов достаточно многоплановой и тонкой дифференциальной, функциональной и мониторинговой диагностики [33]. В ультрафиолетовой области спектра (260–350 нм), например, флюоресценция живых биологических тканей обусловлена, главным образом, свечением белков, содержащих ароматические аминокислоты триптофан и тирозин [5, 6]. В синей и сине-зеленой области спектра (420–490 нм) большая доля флюоресценции приходится на связанную ( $\text{NAD(p)}^+$ ,  $\text{NAD}^+$ ) и восстановленную ( $\text{NADH}$ ,  $\text{NAD(p)H}$ ) формы кофермента никотинамид-аденин-динуклеотид с максимумами спектра флюоресценции на длинах волн 435 и 460 нм соответственно\*, причем восстановленная форма кофермента  $\text{NADH}$  имеет существенно более высокий квантовый выход флюоресценции, т.е. вносит в сигнал флюоресцен-

\* Вопреки часто высказываемому мнению, например [49], методом Монте-Карло не решается уравнение переноса излучения. Это самостоятельный метод статистических испытаний (блужданий фотонов), не связанный напрямую с решением уравнения переноса. Связь можно проследить только в общей феноменологической постановке задачи

\* Как известно из курса физики, в зависимости от кислотности среды, ее температуры, наличия рядом тушащих флюоресценцию агентов, например, молекул кислорода, а также в зависимости от ряда других факторов, максимумы спектров флюоресценции могут немного (до 10–20 нм) смещаться от указанных значений в ту или иную сторону

ции в этом диапазоне наибольший вклад [6, 9, 35]. Сильный вклад в сигнал флюоресценции здесь вносит и эпидермальный кератин с максимумом спектра флюоресценции в районе 450 нм. Часто он даже забивает сигнал от NADH, делая последний невидимым на своем фоне [50].

Нельзя не отметить на левом краю этого спектрального диапазона и вклад в суммарную флюоресценцию основных белков соединительной ткани – эластина и коллагена, максимум спектра излучения которых приходится на длины волн 390 и 440 нм соответственно. Они иногда даже претендуют на роль основных флюорофоров дермы кожи [36], т.к. на коллаген иногда приходится до 90 % всех белков дермы (коллаген типа I и III). Коллаген и эластин в большинстве случаев хорошо видны на спектрах *in vivo*, поэтому задача поиска медицинских приложений, для которых их прижизненное определение может иметь смысл, весьма актуальна [51]. Но и спектр коллагена и эластина, вообще говоря, может быть плохо различим на фоне флюоресценции кератина [50], поэтому интерпретация результатов флюоресцентной спектроскопии *in vivo* в синей и сине-зеленых областях спектра не так проста.

В зеленой области спектра (520–540 нм) сильной вынужденной флюоресценцией обладают рибофлавин и его производные – коферменты FAD и FMN (флавино-аденин-динуклеотид и флавино-мононуклеотид). В отличие от NADH эти вещества ярко флюоресцируют в окисленном состоянии, а восстановленная форма, например, FADH<sub>2</sub>, практически не флюоресцирует. Совместно с NADH молекулы FAD и FMN функционируют как коферменты дегидрогеназ в окислительно-восстановительных реакциях в тканях, выступая акцептором электрона субстрата при реакции. Большинство нарушений клеточного метаболизма и клеточного дыхания заметно отражаются в динамике различных форм этих молекул, что может представлять особый интерес для диагностики *in situ* дыхательных и обменных процессов в живых биологических тканях [5, 9, 10, 17, 33–36].

В желто-красной области спектра начинает доминировать флюоресценция гранул липофусцина (пигмент старения) и различных порфириновых соединений. Природные порфирины [6, 52, 53], входящие во многие биологически важные молекулы, отличаются очень сильной фотоактивностью и флюоресценцией,

что и послужило причиной их применения для целей ФДТ в качестве первых фотосенсибилизаторов. У насыщенных порфирином тканей можно часто наблюдать характерную для порфирина яркую «двухгорбную» флюоресценцию (рис. 7) в красной области спектра (>600 нм) с характерным расположением двух максимумов в районе 640 и 710 нм [6].

Из класса порфириновых соединений самыми легко определяемыми и наиболее представленными в мягких тканях организма являются, видимо, гематопорфирины, в частности протопорфирин IX, с которых и началось исследование эндогенной флюоресценции порфиринов *in vivo* в биологии и онкологии [4, 26, 34, 52, 53]. Эндогенные порфирины в организме участвуют в реакциях катализа и полимеризации, входят в состав ферментов класса оксиредуктаз, витамина B12, и ряда других веществ [54–56], так что их роль в организме весьма высока. Нарушение порфиринового обмена приводит к анемии, ряду нейропсихических и кожных заболеваний – красной волчанке, фотодерматозу, язвам и т.п. [6, 52, 55, 57]. По данным ряда авторов, гематопорфирин может накапливаться в злокачественных опухолях, в некротических, лимфоидных и других патологически измененных тканях [6, 52, 54, 56]. Определенной порфириновой флюоресценцией обладают различные клеточные инфильтраты, ткани, поврежденные грибковыми и анаэробными инфекциями [58], что может позволить отслеживать методами лазерной флюоресцентной диагностики по флюоресценции порфирина динамику злокачественных и доброкачественных процессов в тканях, областей воспалений,

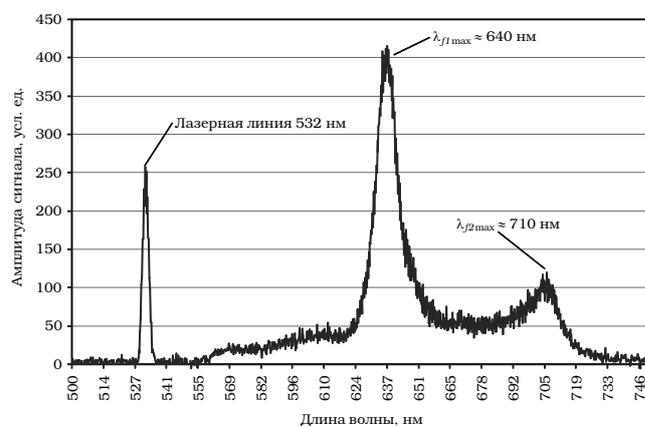


Рис. 7. Пример «двухгорбой» флюоресценции эндогенного порфирина в тканях

скорость заживления послеоперационных ран, ожоговых, гнойных и других процессов. Не исключено также, что повышенное содержание порфириновых соединений в тканях с нарушенной жизнедеятельностью связано с изменением кровообращения в зонах патологии [59]. Соответственно, регистрация эндогенных порфиринов методами флюоресцентной спектроскопии *in vivo* оказывается очень актуальна для самых различных областей и приложений медицины [16, 17, 20, 32, 33, 46, 55, 60, 61].

В частности, в последнее время появились серьезные основания полагать, что повышенное накопление в тканях эндогенных порфиринов может быть связано с состоянием воспаления и хронической гипоксии в тканях [61, 62]. Это заставляет по-новому посмотреть на проблему интраоперационного контрастирования опухолей и ФДТ. Хотя воспаление и гипоксия всегда сопровождают рост злокачественных новообразований [56, 63], накопление фотосенсибилизатора в гипоксических клетках и в злокачественных клетках – не тождественные понятия. Контуры злокачественного пула живых клеток в опухоли, особенно хорошо оксигенированных, и гипоксического пула могут не совпадать [8, 63]. Соответственно, распределение концентрации фотосенсибилизатора в опухоли может неточно отражать карту распространения растущего злокачественного пула клеток. Как следствие, возможны ошибки интраоперационной навигации и не эффективность (или слабая эффективность) процедур ФДТ. Такие данные встречаются в литературе.

В [28], например, говорится о том, что ряд глиом головного мозга в группе испытуемых не имел повышенного контраста флюоресценции. Не исключено, что это были хорошо оксигенированные опухоли со слабо выраженным местным воспалением. Аналогичные замечания для рака почки и мочевого пузыря содержатся в [20]. Данные группы радиологического отделения МОНКИ также подтверждают возможность ошибок флюоресцентной навигации по причине накопления фотосенсибилизаторов преимущественно в гипоксических клетках и областях воспаления, а не в перерожденных злокачественных клетках, особенно молодых [33, 61]. На одном из этапов работ наша группа исходила из предположения, что если экзогенные порфирины повышено накапливаются в опухоли, а в организме есть много и эндогенных порфиринов, то при достаточной чувствительности аппаратуры увидеть контраст опухо-

ли можно и без использования экзогенных фотосенсибилизаторов, регистрируя только эндогенную флюоресценцию порфиринов *in situ*. Увы, результаты исследований показали, что около 50 % опухолей головы и шеи (рак кожи головы и шеи, а также органов полости рта) не имеют выраженного контраста эндогенной флюоресценции, т.е. фактически не накапливают сверх нормальных тканей эндогенных порфиринов и не флюоресцируют сильнее их [33, 59]. И наоборот, ряд доброкачественных процессов имеет повышенную порфириновую флюоресценцию, подобно злокачественным [59, 60]. Таким образом, злокачественные процессы, скорее всего, вообще не дифференцируются от некоторых доброкачественных по уровню накопления эндогенных порфиринов. Это, видимо, не специфический признак злокачественности, а признак измененного метаболизма – гипоксии, понижения pH, интоксикации и т.п. [59, 61]. В зарубежной литературе тоже есть этому подтверждение [20, 50, 58 и др.].

Тем не менее, как мы видим, если отойти от проблемы дифференциальной диагностики в онкологии, то во всей области видимого спектра разнообразная эндогенная флюоресценция весьма широко представлена в живых биотканях. Поскольку существуют различия в  $I(\lambda)$  для разных длин волн, разных областей обследования, разных тканей, разных больных и разных стадий заболевания у одного и того же пациента, то, безусловно,  $I(\lambda)$  несет в себе определенную объективную медицинскую информацию, которую было бы важно использовать. Вопрос в том, как ее расшифровать, как количественно оценить и правильно интерпретировать. Амплитуда сигнала на экране монитора компьютера, которую видит врач, сильно зависит не только от медико-биологических параметров объекта обследования, от концентрации и глубины залегания в тканях искомым флюорофоров, но и от мощности источника возбуждения флюоресценции, от коэффициентов потерь и усиления в системе регистрации излучения, от аппаратной функции прибора и т.д. [37]. Поэтому анализ только одной величины регистрируемой амплитуды  $I(\lambda)$  чреват большими ошибками. Как уже обсуждалось, идеальной была бы возможность оценки по  $I(\lambda)$  факта присутствия и величины концентрации всех флюорофоров в ткани, ответственных за ее появление. Но это пока за гранью возможного ввиду нелинейного характера зависимости и множественности эн-

догенных флюорофоров в живой биоткани. Пока в клинической практике приходится использовать более простые методы количественной оценки результата.

Попыткой устранить влияние мощности исходного (возбуждающего) излучения на результат диагностики является, например, предложение [13] оценивать для разных длин волн так называемый коэффициент флюоресценции (КФ), равный отношению максимумов амплитуд  $I_f(\lambda)$  и  $I_t(\lambda)$ :

$$\text{КФ} = I_f(\lambda) / I_t(\lambda). \quad (4)$$

Однако, как было показано в работе [64], более метрологически надежным диагностическим критерием является приведенный коэффициент флюоресцентной контрастности  $K_f$ , определяемый соотношением:

$$K_f = 1 + (I_{f \max} \cdot \beta - I_{t \max}) / (I_{f \max} \cdot \beta + I_{t \max}), \quad (5)$$

где  $\beta$  – коэффициент ослабления порогового фильтра 8 (рис. 1) для длины волны возбуждения флюоресценции ( $\beta \approx 1000$ )\*. Коэффициент  $K_f$  оказывается более устойчивым, чем КФ, к случайным погрешностям измерений, которые могут доходить до 30–40 % от измеряемой величины [37, 64]. Он лежит в ограниченном диапазоне 0...2, что является гораздо более удобным при классификации наблюдаемых различий в клинике, чем неограниченная сверху величина КФ.

В ряде случаев можно на одном и том же спектре при одной и той же длине волны возбуждения флюоресценции  $\lambda_e$  оценивать отношения  $I_f$  для разных  $\lambda_f$  (разных максимумов в спектре флюоресценции). Так, В.Н. Карнаузов в [9] для оценки внутриклеточных энергетических и обменных процессов предлагал оценивать отношения  $I_f$  для длин волн  $\lambda_f = 460$  и  $\lambda_f = 530$  нм ( $I_f(460) / I_f(530)$ ) – так называемый *редокс-статус*, определяемый отношением флюоресценции восстановленного никотинамида (NADH) к флюорес-

ценции окисленных форм FAD и FMN. Отношение интенсивностей флюоресценции на длинах волн 600 и 580 нм использовалось при диагностике атеросклеротических бляшек [65]. При таком подходе все эти отношения (для не искаженных прибором спектров) в первом приближении можно считать прямо пропорциональными отношениям концентраций регистрируемых веществ в области обследования, особенно для оптически «серых» биотканей [39].

Между тем, международные рекомендации в ситуации, когда нельзя непосредственно использовать классические размерные величины для измеряемого параметра, а измерения проводятся, например, через кожу, предлагают использовать понятия *транскутаных* (тканевых) индексов “чего-то”, например, транскутанный индекс напряжения кислорода или транскутанный билирубиновый индекс [66, 67].

Представляется целесообразным этот подход использовать и в лазерной флюоресцентной спектроскопии *in vivo*. Действительно, все относительные параметры содержания флюоресцирующих веществ в тканях по (4), (5) или другим аналогичным соотношениям определяются в сложных условиях сильного светорассеяния и наличия других поглощающих свет веществ, например, меланина в коже или гемоглобина в крови. Кроме того, все они определяются не прямыми измерениями, а косвенно, через вычисление отношений интенсивностей регистрируемого оптического излучения. Поэтому говорить здесь сегодня можно лишь об условных единицах содержания вещества в том или ином диагностическом объеме [19], что в полной мере может быть поименовано в целях унификации диагностической терминологии как *индекс транскутанного* (или *индекс тканевого*) содержания вещества в зоне обследования (индекс тканевого меланина, индекс транскутанного протопорфирина IX и т.д.). В этом случае, если известен из результатов диагностики неискаженный спектр флюоресценции какого-то отдельного конкретного вещества в ткани, можно говорить о вычислении *индекса тканевого содержания* (ИТС) этого вещества по характерному наблюдаемому на экране монитора максимуму его интенсивности флюоресценции по отношению к интенсивности обратно рассеянного лазерного излучения с использованием формулы [68]:

$$I_{\text{вещество}}^{\lambda_e / \lambda_f} = \frac{\beta \cdot I_f^{\lambda_f}}{I_t^{\lambda_e} + \beta \cdot I_f^{\lambda_f}}, \quad (6)$$

\* Строго говоря, в формуле (4) также должен стоять аналогичный коэффициент перед  $I_t$ , т.к. во всех приборах такого типа содержатся пороговые фильтры 8, а интенсивность в лазерной линии  $I_t$  в нормальных условиях минимум на три порядка больше интенсивности флюоресценции  $I_f$ . Однако авторы [13] обычно не упоминают приборный коэффициент в своих публикациях, видимо, по той причине, что при считывании врачом спектра с экрана монитора компьютера он уже автоматически учитывается в ослабленном представлении линии  $I_t$ . Т.е. в их формуле (4)  $I_t$  надо понимать как  $I_t / \beta$ .

где:  $I_{\text{вещество}}^{\lambda_e/\lambda_f}$  – определяемый ИТС вещества. При одних и тех же длинах волн ИТС в точности будет равен 1/2 коэффициента  $K_f$  по (5). Таким образом, ИТС любого вещества всегда будет меняться в компактном и понятном диапазоне от 0 до 1, и он сочетает в себе такие достоинства перед другими диагностическими параметрами как понятную физическую интерпретацию и достаточно высокую метрологическую надежность, аналогичную  $K_f$ .

В качестве примера можно рассмотреть процедуру вычисления значения ИТС для NADH по спектру рис. 4. Если отвлечься от проблемы искажения спектра и наличия сложного состава веществ в ткани, ИТС NADH в данном примере мог бы быть вычислен на основе (6) как:

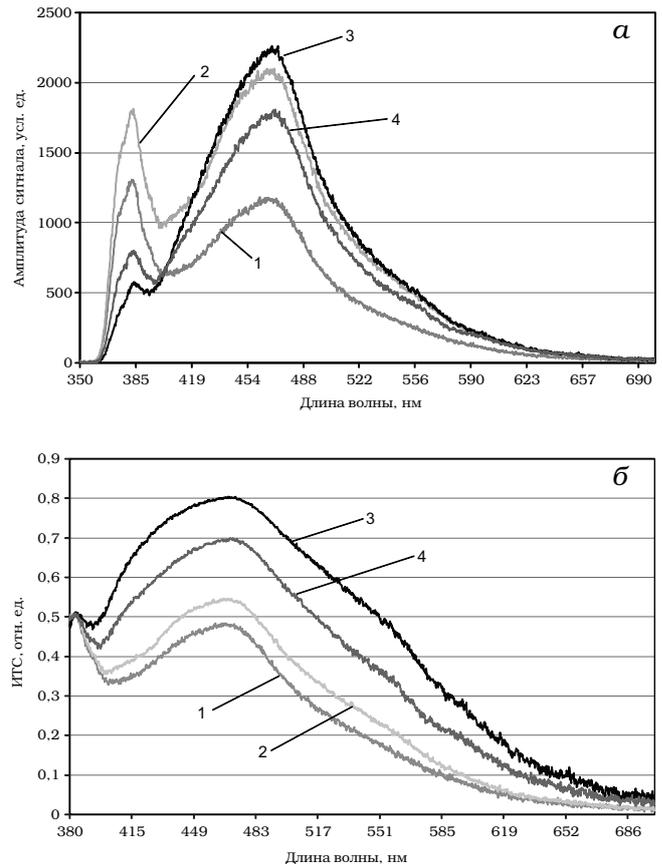
$$I_{\text{NADH}}^{375/465} = \frac{\beta \cdot I_f^{465}}{I_l^{375} + \beta \cdot I_f^{465}} \quad (7)$$

Подставляя сюда значения амплитуд сигналов обратно рассеянного и флуоресцентного излучений, показанных на графике, получим:

$$I_{\text{NADH}}^{375/465} \approx \frac{150}{100+150} = 0,6. \quad (8)$$

В этой записи наглядно представлено и числовое значение показателя, и определяемое вещество, и длины волн, с помощью которых этот показатель определен.

Какие преимущества на практике дает такой подход? Наглядно иллюстрирует это рис. 8\*. На рис. 8а приведены зарегистрированные и скорректированные на приборные искажения спектры флуоресценции *in vivo* ногтей пальцев ног при возбуждении флуоресценции УФ-светодиодом с  $\lambda_e=360-390$  нм для случаев нормы и сосудистых осложнений (диабетическая стопа) при сахарном диабете. Эти исходные спектры мало информативны в таком виде и не позволяют врачу быстро сделать какие-либо выводы. Пересчет же всех спектров по формуле (6) при фиксации линии возбуждения на длине волны  $\lambda_e=375$  нм дает наглядную картину распределения ИТС веществ как функции длины волны флуоресценции (функции  $\lambda_f$ ). Отчетливо проявляется (рис. 8б), что практически во всем регистрируемом спектре ИТС веществ выше для ногтей



**Рис. 8.** Флуоресценция ногтей пальцев ног в норме (1, 2) и при сахарном диабете (3, 4) с осложнением в виде “диабетической стопы”: а – исходные спектры; б – индекс тканевого содержания вещества по спектру, 3 – более выраженные осложнения, 4 – менее выраженные

“диабетической стопы” (здесь флуоресцируют, главным образом, коллаген, NADH и кератин). Более того, наглядно различаются случаи более выраженных осложнений (график 3) и менее выраженных осложнений (график 4), подтвержденных клинически. Т.е. степень сосудистых поражений при “диабетической стопе”, скорее всего, пропорционально отражается на увеличении флуоресценции веществ по всему регистрируемому спектру [60]. Таким образом, удачно выбранная методика количественной обработки данных по (6), даже в условиях отсутствия возможности вычислить реальные концентрации флуорофоров в тканях, может сегодня в ряде случаев приводить к клинически значимому результату.

Другой (альтернативный) подход к количественной обработке данных флуоресцентной спектроскопии *in vivo* был в свое время

\* Данные получены и предоставлены к.м.н. Д.А. Куликовым

предложен в [20]. Автор предложил оценивать ситуацию не в терминах ИТС веществ, а в терминах относительного отклонения их содержания от нормы. В его работе регистрировался интегральный сигнал флюоресценции  $I_{\Sigma}$  (интеграл по спектру) в используемом диапазоне длин волн  $\lambda_f$  (в описываемой статье – диапазон флюоресценции порфирина интервале 700–1000 нм). Флюоресценция измерялась с области патологии (опухоли) –  $I_{\Sigma\_cancer}$  и с нормальных интактных тканей –  $I_{\Sigma\_normal}$ , после чего вычислялась относительная разница интенсивностей  $\Delta I_{ca}$  по формуле:

$$\Delta I_{ca} = (I_{\Sigma\_cancer} - I_{\Sigma\_normal}) / I_{\Sigma\_normal} \quad (9)$$

Физически это означает отход от оценки абсолютных значений уровней накопления веществ в ткани и переход на более простую оценку шкалы относительного отклонения ситуации от нормы (к сожалению, вопрос линейности такой шкалы в работе не обсуждается).

Однако еще раз подчеркнем, что такие подходы в общем случае эффективны только в ситуации неискаженных спектров флюоресценции и при наличии одного единственного флюорофора в ткани для рассматриваемого диапазона длин волн. Во всех других случаях необходима корректировка спектра и его разбиение на парциальные вклады от спектров флюоресценции всех отдельных детектируемых в ткани флюорофоров. Иначе возможны ошибки интерпретации [68].

Поэтому, в последнее время в области флюоресцентной спектроскопии *in vivo* наметились тенденции интенсификации исследований в этом направлении. Много работ встречается сегодня по алгоритмам корректировки спектров и определения исходных спектров флюоресценции путем учета их искажений от поглощения света кровью и другими хромофорами тканей [69, 70]. Разрабатываются различные методы многокомпонентного анализа спектров для определения наиболее вероятного состава флюорофоров в ткани [71, 72 и т.д.]. Но все эти работы пока носят чисто исследовательский характер. Случаи эффективного использования этих алгоритмов в коммерческих диагностических приборах пока не известны.

Дело в том, что метрологически эти процедуры проработаны весьма слабо. Как известно, чем сложнее вычислительная процедура, тем больше вероятности накопления ошибки вычислений, особенно для приближенных и

косвенных методов. Методические погрешности даже несложных базовых вычислительных алгоритмов в неинвазивной медицинской спектрофотометрии весьма ощутимы и часто превышают инструментальные погрешности метода, существенно увеличивая общую погрешность и неопределенность результата измерений [19, 37, 59, 73]. И описываемые дополнительные корректирующие вычисления, очевидно, их не уменьшают. Поэтому метрологическую состоятельность таких вычислительных процедур и измерений в целом в области флюоресцентной спектроскопии *in vivo* еще предстоит определить.

В области флюоресцентной спектроскопии *in vivo* метрологические аспекты измерений, вообще говоря, в целом исследованы и отражены в литературе пока очень слабо [19, 37, 64]. Вместе с тем, очевидно, что любые количественные измерения должны характеризоваться еще и с точки зрения метрологии: точности, воспроизводимости, сличимости результатов измерений и т.д. (особенно для разных приборов и лабораторий). Иначе невозможно количественно сравнивать разные клинические данные и случаи. Был бы получен спектр рис. 2, например, с этого же объекта измерений на другом аналогичном приборе этого же производителя или на аналогичном приборе другого производителя? Наш опыт показывает, что сегодня спектр выглядел бы в деталях во многом по-другому. Был бы зарегистрирован несколько иной контур спектра и другое соотношение  $I_{f\_max}$  и  $I_{l\_max}$ . Мы сравнивали спектры флюоресценции с одного и того же объекта измерений для двух разных приборов серии ЛАКК-М одного производителя и одного прибора другого российского производителя – ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Частично результаты этих исследований отражены в [37]. Без корректирующих пересчетов непосредственно зарегистрированные спектры различались сильно даже для двух однотипных приборов ЛАКК-М. Физико-техническими объективными причинами таких различий являются разные спектральные характеристики используемых оптических фильтров, оптических волокон, полихроматоров и фотоприемников. Другой причиной, методической или организационной, является отсутствие системы унификации и стандартизации измерений в этой новой области медицинской диагностики. Производители данного оборудования и надзорные органы (Росздравнадзор, в частности, в нашей стране) пока не озадачились единством

измерений в области клинической флуоресцентной спектроскопии *in vivo*, ввиду отсутствия необходимых эталонных средств измерений, включая единые и аттестованные имитационные меры (фантомы), хранящие и воспроизводящие непосредственно измеряемые спектрометрами *in vivo* первичные физические величины – спектральные плотности мощности излучения флуоресценции на разные длины волн возбуждения  $\lambda_e$  [73].

Как известно, источниками, на которых базируется система единства измерений, являются: строгая и однозначная терминология, стандартизация методов и средств измерений, единая система мероприятий по градуировке, калибровке и поверке средств измерений и т.д. [19]. Практически ничего этого в области клинической лазерной флуоресцентной спектроскопии *in vivo* нигде в мире пока нет. Однако очевидно, что проблема единства и стандартизации измерений, в частности – передаточных функций приборов, уже давно здесь назрела. Все выпускаемые диагностические приборы должны быть настроены единым образом по какому-либо эталонному источнику излучения с известной и стандартизованной спектральной плотностью мощности. По высокотемпературному планковскому “абсолютно черному” телу, например. Также для правильного, единообразного и унифицированного выполнения измерений необходимо соблюдать ряд единых методических требований, т.к. метод флуоресцентной спектроскопии *in vivo* является очень чувствительным к некоторым помеховым факторам [37, 74].

В отличие, скажем, от лазерной доплеровской флоуметрии [68] или оптической тканевой оксиметрии [38], флуоресцентная спектроскопия *in vivo* по эндогенной флуоресценции имеет дело с регистрацией таких компонентов биоткани, накопление которых в тканях происходит достаточно медленно: часы, сутки, недели. Изменяемые *in vivo* спектры флуоресценции в ней в течение процедуры проведения измерений могут считаться статическими, неизменными, не меняющими свои значения. Только уровни кровенаполнения и интерактивная составляющая погрешности могут сказываться на флуктуациях сигнала на малых отрезках времени (секунды, минуты) [59, 74]. Поэтому здесь достаточно выполнения нескольких разовых, одномоментных измерений с небольшим усреднением сигнала во времени в течение нескольких секунд или десятков секунд. Для этого

на существующих приборах достаточно выполнить подряд 5–10 измерений и далее усреднить результат. Однако часто накопление флуорофоров в тканях отличается очень сильной неоднородностью по поверхности биоткани, особенно в области патологий. Весьма близкие анатомо-топографические точки на теле пациента, скажем центр и край даже небольшой, менее сантиметра в диаметре опухоли, могут иметь очень разные спектры флуоресценции. Поэтому методически наиболее правильным и метрологически наиболее надежным в лазерной флуоресцентной диагностике *in vivo* будет проведение измерений по массиву точек в центре, по границам и вокруг области патологии (области измерений) с их последующим усреднением и/или с последующим анализом результатов каждого измерения и построением карты распределения ИТС флуоресцирующих веществ по всей обследуемой поверхности. Возможно, конечно, использование и систем визуализации, если они позволяют проводить количественные спектральные измерения.

Дополнительно, поскольку измерения эндогенной флуоресценции имеют дело с очень маленькими потоками света, метод оказывается очень чувствителен к наличию в помещении для проведения измерений внешнего освещения. Лучше всего использовать слегка затемненное помещение и не проводить измерения при ярком внешнем искусственном или естественном освещении (прямые солнечные лучи, мощные лампы). Влияние внешнего освещения перед началом измерений желательно проверить на белой светорассеивающей и не флуоресцирующей рабочей мере, которая должна входить в комплект поставки диагностических систем в клиники. Также в комплект поставки желательно включать рабочие имитационные меры, моделирующие спектры флуоресценции. Только в этом случае перед проведением измерений врач сможет точно убедиться в работоспособности прибора и проверить его функцию преобразования. Часто, например, для оптоволоконных систем загрязнение торца световода (оптоволоконного датчика) или его поломка являются источниками дополнительных погрешностей и ошибок измерений. Одним словом, детальная проработка метрологических аспектов диагностики в лазерной флуоресцентной спектроскопии *in vivo* сегодня крайне актуальна [19]. Только при решении всех этих вопросов стандартизации и унификации измерений эта технология сможет дей-

ствительно претендовать на роль одной из ведущих перспективных неинвазивных медико-физических диагностических технологий для клинической медицины будущего [75].

### Список литературы

1. Физический энциклопедический словарь. Под ред. А.М. Прохорова. – М.: Советская энциклопедия, 1984, 943 с.
2. Лазерная аналитическая спектроскопия. Под ред. В.С. Летохова. – М.: Наука, 1986, 238 с.
3. Стенхольм С. Основы лазерной спектроскопии. – М.: Мир, 1987, 312 с.
4. Tarpeiner H., Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. // Muench Med. Wochenschr, 1903, **50**, P. 2041–2051.
5. Гладков А.А. Люминесцентный анализ в медицине. – Кишинев: КГУ, 1958, 389 с.
6. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. – М.: Мир, 1965, 484 с.
7. Каралис В.Н., Корнеева Э.А. Аппаратура для флуоресцентного анализа. – М.: Изд-во Стандартов, 1970, 208 с.
8. Автандилов Г.Г. Компьютерная микротелефотометрия в диагностической гистопатологии. – М.: РМАПО, 1996, 256 с.
9. Карнаухова В.Н. Люминесцентный анализ клеток. Учебное пособие. – Пущино: ИБК РАН, 2002, 131 с.
10. Карнаухова В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. – М.: Наука, 1978, 208 с.
11. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. – М.: Техносфера, 2007, 368 с.
12. Lin K., Zheng W., Huang Z. Integrated autofluorescence endoscopic imaging and point-wise spectroscopy for real-time *in vivo* tissue measurements. // J. Biomed. Optics, 2010, **15**, No. 4, P. 040507.
13. Лощенов В.В., Волкова А.И., Прохоров А.М., Стратонников А.А. Портативная спектроскопическая система для флюоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией. // Росс. хим. журнал, 1998, **XLII**, № 5, С. 50–53.
14. Горенков Р.В., Казаков А.А., Назаренко М.М. и соавт. Способ определения функционального состояния биологической ткани (варианты) и диагностическая система для его реализации. Патент РФ №2234242 от 19.03.2002, Бюл. №23/04.
15. Даниелян Г.Л., Шилов И.П., Кочмарев Л.Ю. и соавт. Волоконно-оптические зонды на основе кварцевых световодов повышенной числовой апертуры для люминесцентной диагностики опухолей. // Мед. физика, 2014, № 1(61), С. 51–58.
16. Bulgakova N.N., Kazachkina N.I., Sokolov V.V., Smirnov V.V. Local fluorescence spectroscopy and detection of malignancies using laser excitation at various wavelength. // Laser Physics, 2006, **16**, No. 5, P. 889–895.
17. Самойлов В.О., Барский И.Я., Буздай Е.В. и соавт. Прижизненная флуориметрия в физиологии и клинике. // Мед. техника, 1997, № 3, С. 3–7.
18. Конов В.И., Осико В.В., Щербаков И.А. Фундаментальные достижения оптики и лазерной физики для медицины. // Вестник РАН, 2004, **74**, № 2, С. 99–124.
19. Рогаткин Д.А., Дунаев А.В., Лапаева Л.Г. Метрологическое обеспечение методов и приборов неинвазивной медицинской спектрофотометрии. // Мед. техника, 2010, **260**, № 2, С. 30–37.
20. Demos S.G. Near-infrared autofluorescence imaging for detection of cancer. // J. Biomed. Optics, 2004, **9**, No. 3, P. 587–592.
21. Sharma V., Olweny E.O., Kapur P. et al. Prostate cancer detection using combined autofluorescence and light reflectance spectroscopy: *ex vivo* study of human prostates. // Biomed. Optics Express, 2014, **5**, No. 5, P. 207541.
22. Liang S., Saidi A., Jing J. et al. Intravascular atherosclerotic imaging with combined fluorescence and optical coherence tomography probe based on a double-clad fiber combiner. // J. Biomed. Optics, 2012, **17**, No. 7, P. 070501.
23. Gaiнд V., Tsai H-R., Webb K.J. et al. Small animal optical diffusion tomography with targeted fluorescence. // J. Opt. Soc. Am. A., 2013, **30**, No. 6, P. 1146–1154.
24. Пасс Х.И. Фотодинамическая терапия в онкологии: Механизмы и клиническое применение. // Физ. медицина, 1993, **3**, № 3–4, С. 5–22.
25. Странадко Е.Ф. Современные возможности, проблемы и перспективы фотодинамической терапии в онкологии. // Лазермаркет, 1993, № 7–8, С. 22–23.

26. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. и соавт. Клиническая флюоресцентная диагностика опухолей с фотосенсибилизатором фотогемом. // Хирургия, 1995, № 5, С. 37–41.
27. Kato H., Aizawa K., Ono J. Clinical measurement of tumor fluorescence using a new diagnostic system with hematoporphyrin derivative, laser photoradiation and spectroscopy. // *Lasers Surg. Med.*, 1984, **4**, No. 1, P. 49–58.
28. Горяйнов С.А., Потапов А.А., Гольбин Д.А. и соавт. Флуоресцентная диагностика и лазерная биоспектрофотометрия как один из методов мультимодальной нейронавигации в нейрохирургии. // *Вопр. нейрохирургии*, 2012, № 6, С. 57–65.
29. Потапов А.А., Гаврилов А.Г., Горяйнов С.А. и соавт. Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия в хирургии глиальных опухолей мозга. // *Вопр. нейрохирургии*, 2012, № 5, С. 3–12.
30. Соколов В.В., Жаркова Н.Н., Фабелинский В.И. и соавт. Диагностика злокачественных опухолей на основе феноменов экзогенной и эндогенной флюоресценции. Пособие для врачей. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2001, 16 с.
31. Finlay J.C., Mitra S., Patterson M.S., Foster T.H. Photobleaching kinetics of Photofrin *in vivo* and in multicell tumour spheroids indicates two simultaneous bleaching mechanisms. // *Phys. Med. Biol.*, 2004, **49**, P. 4837–4860.
32. Кузин М.И., Кузин Н.М., Шкроб О.С. и соавт. Спектроскопическая диагностика заболеваний желудка на основе флюоресценции эндогенных порфиринов, индуцированной лазером. // *Хирургия*, 1995, № 5, С. 35–37.
33. Рогаткин Д.А. Неинвазивная лазерная флуоресцентная диагностика в медицине. // *Лазерная медицина*, 2000, **4**, № 1, С. 30–35.
34. Дадвани С.А., Харнас С.С., Чилингарида К.Е. и соавт. Лазерная аутофлуоресцентная спектроскопия – новый метод экспресс-диагностики в хирургии. // *Хирургия*, 1999, № 10, С. 75–79.
35. Синичкин Ю.П., Утц С.Р., Меглинский И.В., Пилипенко Е.А. Спектроскопия кожи человека *in vivo*. II. Спектры флюоресценции. // *Оптика и спектроскопия*, 1996, **80**, № 3, С. 431–438.
36. Синичкин Ю.П., Утц С.Р. *In vivo* отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека. – Саратов: СГУ, 2001, 92 с.
37. Рогаткин Д.А., Лапаева Л.Г., Быченков О.А. и соавт. Основные источники погрешностей в неинвазивной медицинской спектрофотометрии. Ч. 1. Физико-технические факторы погрешностей. // *Измерительная техника*, 2013, № 2, С. 61–67.
38. Рогаткин Д.А. Физические основы оптической оксиметрии. Лекция. // *Мед. физика*, 2012, № 2, С. 97–114.
39. Рогаткин Д.А., Смирнова О.Д. Математическое моделирование регистрируемых сигналов в медицинской лазерной неинвазивной флюоресцентной диагностике. // *Оптический журнал*, 2013, **80**, № 9, С. 54–60.
40. Исимару А. Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. Т. 1. – М.: Мир, 1981, 280 с.
41. Рогаткин Д.А. Об особенностях в определении оптических свойств мутных биологических тканей и сред в расчетных задачах медицинской неинвазивной спектрофотометрии. // *Мед. техника*, 2007, № 2, С. 10–16.
42. Хачатурян Г.В., Рогаткин Д.А. Метод моментов в решении задач расчета аутофлуоресценции биологических тканей. // *Оптика и спектроскопия*, 1999, **87**, № 2, С. 258–265.
43. Rogatkin D.A., Tchernyi V.V. Mathematical simulation as a key point of the laser fluorescence diagnostic technique in oncology. // *Proc. SPIE*, 2000, **4059**, P. 73–78.
44. Rogatkin D.A., Svirin V.N., Tchernyi V.V. Some problems of theoretical calculation of the laser light distribution in biological tissues. // *Proc. SPIE*, 2000, **4162**, P. 189–193.
45. Гуревич М.М. Введение в фотометрию. – Л.: Энергия, 1968, 272 с.
46. Смирнова О.Д. Флуоресцентная методика неинвазивного экспресс-контроля за приемом лекарственных средств. // *Мед. физика*, 2012, № 3(55), С. 79–84.
47. Rogatkin D., Lapaeva L., Guseva I. Nonlinear and nonmonotonic nature of the intensity of fluorescence emission on a surface of turbid fluorescing biotissues. // *Proc. SPIE*, 2014, **9129**, P. 91292H.
48. Valentine R.M., Wood K., Brown C.T.A. et al. Monte Carlo simulations for optimal light delivery in photodynamic therapy of non-melanoma skin cancer. // *Phys. Med. Biol.*, 2012, **57**, P. 6327.

49. Забенков И.В., Кочубей В.И. Моделирование методом Монте-Карло процессов регистрации флуоресцентных объектов в коже. // Оптика и спектроскопия, 2009, **107**, № 6, С. 948–952.
50. Sterenborg H.J.C.M., Motainedi M., Wagner R.F. et al. *In vivo* fluorescence spectroscopy for the diagnosis of skin diseases. // Proc. SPIE, 1995, **2324**, P. 32–38.
51. Smirnova O.D., Rogatkin D.A., Litvinova K.S. Collagen as *in vivo* quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes. // J. Innovative Optical Health Science, 2012, **5**, No. 2, P. 1250010.
52. Аскарлов К.А., Березин Б.Д., Евстигнеева Р.П. Порфирины: спектроскопия, электрохимия, применение. – М.: Наука, 1987, 384 с.
53. Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьев К.Н. Спектроскопия порфиринов. // Успехи физических наук, 1963, **LXXIX**, вып. 2, С. 173–234.
54. El-Sharabasy M.M.H., El-Wassel A.M., Hafez M.M., Salim S.A. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. // Brit. J. Cancer, 1992, **65**, P. 409–412.
55. Harris D.M., Werkhaven J. Endogenous porphyrin fluorescence in tumors. // Lasers Surg. Med., 1987, **7**, P. 467–472.
56. Кубатиев А.А. Порфирины, витамин В-12 и рак. – Тула: Приокское книжное изд-во, 1973, 222 с.
57. Кузнецова Н.П., Панков Б.С. Чубарова А.С. и соавт. Порфирии. – М.: Медицина, 1981, 192 с.
58. Seo I., Tseng S.H., Cula G.O et al. Fluorescence spectroscopy for endogenous porphyrins in human facial skin. // Proc. SPIE, 2009, **7161**, P. 716103.
59. Рогаткин Д.А., Быченков О.А., Лапаева Л.Г. Точность, достоверность и интерпретация результатов *in vivo* лазерной флюоресцентной диагностики в спектральном диапазоне флюоресценции эндогенных порфиринов. // Оптический журнал, 2009, **76**, № 11, С. 46–53.
60. Tchernyi V.V., Rogatkin D.A., Bychenkov O.A., Polyakov P.Yu. Some results of multiwave *in situ* autofluorescence diagnostics. // Proc. SPIE, 2005, **5693**, P. 336–343.
61. Горенков Р.В., Карпов В.Н., Рогаткин Д.А., Шумский В.И. Хроническая гипоксия как один из факторов повышенной флуоресценции эндогенных порфиринов в живых биологических тканях. // Биофизика, 2007, **52**, № 4, С. 711–717.
62. Смирнова О.Д., Гудович И.В., Рогаткин Д.А. Неинвазивная лазерная флюоресцентная диагностика патологических воспалительных процессов. // Функциональная диагностика, 2012, № 1, С. 125–126.
63. Крылова Н.В. Кровеносные сосуды опухолей. Учебное пособие. – М.: РУДН, 1974, 230 с.
64. Рогаткин Д.А., Приснякова О.А., Моисеева Л.Г., Черкасов А.С. Анализ точности лазерной клинической флюоресцентной диагностики. // Измерительная техника, 1998, № 7, С. 58–61.
65. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. – М.: Наука, 1989, 237 с.
66. Кешищян Е.С., Ованесов Е.Н., Прищепина М.И. Использование метода транскутанной билирубинометрии при гипербилирубинемии у новорожденных. // Клиническая лабораторная диагностика, 1994, № 5, С. 31–35.
67. Макаров Д.С., Петрицкая Е.Н., Рогаткин Д.А. Вопросы гармонизации и унификации понятийно-терминологического базиса в неинвазивной медицинской спектрофотометрии. // Материалы XI Международной научно-технической конференции “Измерение – контроль – информатизация” (ИКИ-2010). – Барнаул: АГТУ им. И.И.Ползунова, 2010, С. 126–129.
68. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность. Руководство для врачей. – М.: Книжный дом “ЛИБРОКОМ”, 2013, С. 448–465.
69. Kanick S.C., Robinson D.J., Sterenborg H.J.C.M., Amelink A. Extraction of intrinsic fluorescence from single fiber fluorescence measurements on a turbid medium. // Optics Letters, 2012, **37**, No. 5, P. 948–950.
70. Muller M.G., Georgakoudi I., Zhang Q. et al. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. // Applied Optics, 2001, **40**, No. 25, P. 4633–4646.
71. Paulia R., Betzb C., Havelb M. et al. Multiple fluorophore-analysis (MFA) for qualitative tissue diagnosis in the oral cavity. // Proc. SPIE, 2007, **6628**, P. 66280D.

72. Kamath S.D., Mahato K.K. Optical pathology using oral tissue fluorescent spectra: classification by principal component analysis and k-means nearest neighbor analysis. // J. Biomed. Optics, 2007, **12**, No. 1, P. 014028.
73. Rogatkin D.A., Lapaeva L.G., Petritskaya E.N. et al. Multifunctional laser noninvasive spectroscopic system for medical diagnostics and metrological provisions for that. // Proc. SPIE, 2009, **7368**, P. 73681Y.
74. Rogatkin Д.А., Лапаева Л.Г., Быченков О.А. и соавт. Основные источники погрешностей в неинвазивной медицинской спектрофотометрии. Ч. 2. Медико-биологические факторы погрешностей. // Измерительная техника, 2013, № 4, С. 66–71.
75. Наркевич Б.Я. Перспективы развития технологий и средств медицинской радиологии. // Мед. физика, 2014, № 1(61), С. 82–112.

### PHYSICAL FOUNDATIONS OF LASER CLINICAL FLUORESCENCE SPECTROSCOPY *IN VIVO*

D.A. Rogatkin

M.F. Vladimirskiy Moscow Regional Research and Clinical Institute "MONIKI",  
Moscow, Russia

The physical principles of the laser clinical fluorescent spectroscopy *in vivo* – the noninvasive optical diagnostic method intended for an assessment of the content in human tissues of various fluorophores of a natural and artificial origin are considered. All necessary terms and definitions are provided. Information on technical features of a design of the elementary optical spectral devices for the method realization is described. It is discussed about areas and problems of application of the method in medicine. Questions of metrology of such measurements, and also problems of creation of computing algorithms for processing and the analysis of results of measurements are discussed as well. Methodical recommendations about the method application in applied medicine are presented.

Key words: *biological tissue, diagnostics, fluorescence, spectroscopy, wavelength, absorption, scattering, fluorophores, concentration*

E-mail: [rogatkin@monikiweb.ru](mailto:rogatkin@monikiweb.ru)