

УДК 535.3; 535.37; 53.072.4; 53.082.534; 53.082.56

## КОМБИНИРОВАННЫЙ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЛУОРОФОРОВ В СИЛЬНОРАССЕИВАЮЩИХ СРЕДАХ

Т. А. Савельева, А. В. Рябова, И. В. Андреева, Н. А. Калягина,  
В. И. Конов, В. Б. Лощенов

*Спектроскопический анализ состава сильнорассеивающих сред, в частности биологических тканей, сопряжен с трудностью интерпретации спектра излучения, подвергшегося в среде как поглощению, так и многократному рассеянию. Предложенная методика комбинированного анализа спектров флуоресценции и диффузного отражения лазерного излучения сильнорассеивающими биологическими средами позволяет проводить количественный анализ содержания в тканях основных хромофоров и флуорофоров с одновременной оценкой структурных изменений изучаемых объектов. Для определения влияния структурных параметров на интенсивность рассеянного назад лазерного и флуоресцентного излучения было проведено численное и физическое моделирование взаимодействия возбуждающего и флуоресцентного излучения с сильнорассеивающими средами. Были получены зависимости регистрируемого сигнала от концентрации рассеивателей и исследуемого флуорофора (протопорфирин IX).*

**Ключевые слова:** мутные среды, многократное рассеяние, флуоресцентный анализ, лазерная спектроскопия, спектроскопия обратного рассеяния, флуорофоры, протопорфирин IX.

*Введение.* Распространенность мутных сред и сложность их изучения обуславливают научный интерес к этому объекту. Одним из классических примеров мутных сред

---

Учреждение Российской академии наук Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: savelevat@gmail.com, andirina@gmail.com.

являются биологические ткани [1], для характеристики которых широко используется измерение спектра излучения, подвергнувшегося в тканях обратному диффузному отражению (ОДО), при этом результирующий сигнал содержит в себе информацию как о рассеивающих центрах, так и о содержании в ткани различных хромофоров и флуорофоров. Информация, которую несет сигнал ОДО, зависит от геометрии проведения измерений. В работе [2] на основе имитационного моделирования измерений с использованием световодного щупа [3] было показано, что на малом расстоянии между осветительным и приёмным волокнами основной вклад в сигнал ОДО вносит рассеяние под большими углами ( $> 125^\circ$ ), что свидетельствует о необходимости учёта светорассеяния клеточными органеллами, размеры которых сравнимы с длиной волны падающего излучения. Также из этого следует, что изменение расстояния между осветительным и приёмным волокнами приводит к изменению вклада различных по размеру структурных элементов в результирующий сигнал ОДО. Высокая информативность сигнала ОДО компенсируется сложностью ее извлечения; интерпретация спектроскопического сигнала возможна либо после принятия сильных теоретических предположений о составе образцов [4], либо после проведения серии последовательных линейно независимых измерений [5–7]. Для описания биологических тканей также используют спектры поглощения или флуоресценции, с помощью которых можно получить данные о концентрации веществ, входящих в состав биологических тканей, и ее изменении во времени [8].

Для корректной интерпретации спектроскопических экспериментальных данных о структурных изменениях на клеточном и субклеточном уровнях требуется теория рассеяния, удовлетворяющая условиям измерений. Для решения этой проблемы используют имитационное моделирование распространения света в сильно рассеивающих средах, однако для биологических тканей до сих пор не выяснен вклад ее различных компонентов. Структурная единица биологической ткани, клетка, может быть описана в рамках теории аномальной дифракции, поскольку её размеры значительно превышают длину волны используемого в оптических измерениях излучения, но её субъединицы могут рассматриваться как малые частицы. Так при исследовании ткани печени с помощью фазово-контрастной микроскопии была предложена модель ткани, содержащей дискретные частицы, имеющие широкое распределение по размеру [9, 10]. В работе [11] по результатам измерений углового рассеяния света биологическими клетками был проведен анализ распределения по размерам составляющих их частиц на основе решения уравнений Максвелла для взаимодействия электромагнитного излучения со

сферическими рассеивателями, предложенного Густавом Ми [12], и показано наилучшее соответствие для логнормального распределения с максимумом, соответствующим сферическим частицам с диаметром 2 мкм (с учетом сечения рассеяния). Следуя заключению, что наибольший вклад в рассеяние вносят клеточные субъединицы малого порядка, вкладом в светорассеяние формы клетки и межклеточных структур можно пренебречь [13].

Для физического моделирования рассеивающих свойств биологических тканей используются растворы жировых эмульсий [14–16]. В [17–19] были исследованы пределы использования линейной концентрационной зависимости рассеивающих свойств жировой эмульсии, раствора Интралипида, от объёмной концентрации. Коэффициент поглощения жировых эмульсий в видимом диапазоне спектра на длинах волн, превышающих 550 нм, пренебрежимо мал [15]. Таким образом, жировые эмульсии являются корректной и удобной физической моделью рассеивающих свойств биологических сред.

В данной работе предложен комбинированный анализ спектров флуоресценции и диффузного отражения сильнорассеивающих биологических сред и разработан алгоритм на основе метода Монте-Карло с дополнительной возможностью анализа возбуждения и распространения в среде флуоресцентного излучения.

*Материалы и методы.* Для моделирования рассеивающих свойств биологических сред был использован водный раствор Липофундина МСТ/ЛСТ 20% (Lipofundin МСТ/ЛСТ 20%) в диапазоне концентраций 0.5–4% (об.). В качестве флуорофора был использован протопорфирин IX (Frontier Scientific) (в концентрациях от 0 до 10 мг/л). Выбор флуорофора определялся тем, что он активно используется в клинической практике для диагностики и терапии опухолей, в том числе опухолей мозга.

Для возбуждения флуоресцентного излучения был использован He-Ne лазер (632.8 нм). Для доставки и приёма излучения был использован оптоволоконный зонд с центральным осветительным волокном и шестью периферийными, собирающими излучение. Диаметр каждого волокна составил 125 мкм, что определило расстояние между центрами волокон, расположенных вплотную друг к другу, использованное для расчета в диффузионном приближении. Для регистрации спектрального сигнала использовался лазерный спектроанализатор ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Обработка спектров осуществлялась в специализированном программном обеспечении Uno Momento (ЗАО “БИОСПЕК”).

Источником данных об оптических свойствах жировой эмульсии послужили работы [15–17]. Имитационное математическое моделирование было реализовано в специально

разработанном программном обеспечении на основе метода Монте-Карло. Полное описание метода в приложении к сильнорассеивающим многослойным средам можно найти в [20].

Т а б л и ц а 1

*Морфологические изменения, происходящие при развитии опухолевого процесса*

Степень озлокачествления	Размер ядер, мкм	Концентрация ядер, шт/мкм <sup>3</sup>	Вариабельность площади ядер, %	Размер митохондрий, мкм	Концентрация митохондрий, шт/мкм <sup>3</sup>
I	2.5	0.006	<20	0.5	0.18
II	3.5	0.03	20–40	0.5	0.3
III	3.5–4	0.03	40–60	0.3	0.3
IV	5	0.03	>60	0.3	0.3

Т а б л и ц а 2

*Оптические характеристики (ядра/митохондрии), полученные на основании расчёта в соответствии с решением Ми для сферических рассеивателей, размеры которых соответствуют субклеточным структурам, и эффективность обратного диффузного отражения, полученная в результате имитационного моделирования распространения лазерного излучения методом Монте-Карло*

Степень озлокачествления	$g = \langle \cos \theta \rangle$	$\mu_s / \text{cm}^{-1}$	$\mu_a / \text{cm}^{-1}$	$R_d$	$R$ (125 мкм)
I	0.988/0.945	56/204	0.6	0.4119	1.99E-03
II	0.994/0.881	69/17.5	6	0.057	7.21E-04
III-IV	0.994/0.881	69/17.5	8.1	0.0404	6.24E-04

*Результаты.* Согласно проведённым *ex vivo* измерениям оптических свойств нормальных и опухолевых тканей [21–24] можно говорить о критических отличиях как рассеивающих, так и поглощающих свойств среды в зависимости от степени развития опухолевого процесса. Авторами на основе [25–27] был сделан ряд предположений о физической природе этих изменений (табл. 1), определены соответствующие оптические параметры модельных сред в соответствии с решением уравнений Ми [12]. Они послужили входными данными для имитационного моделирования распространения лазерного излучения в сильнорассеивающих средах, состав которых имитирует состав основных рассеивателей биологического прототипа (табл. 2). В табл. 2 также приведены значения общего коэффициента ОДО и эффективности обратного диффузного

отражения на расстояния 125 мкм от источника (что соответствует положению приёмного волокна) для указанного ряда значений оптических свойств.

Результаты имитационного моделирования показали существенное изменение сигнала ОДО при развитии изменений, свойственных опухолевому процессу – полная интенсивность диффузно отраженного света снизилась в среднем в 10 раз для модели злокачественных опухолей по сравнению с моделью доброкачественного новообразования, эффективность ОДО (отношение интенсивностей детектируемого и возбуждающего излучений) уменьшилась в среднем в 3 раза.

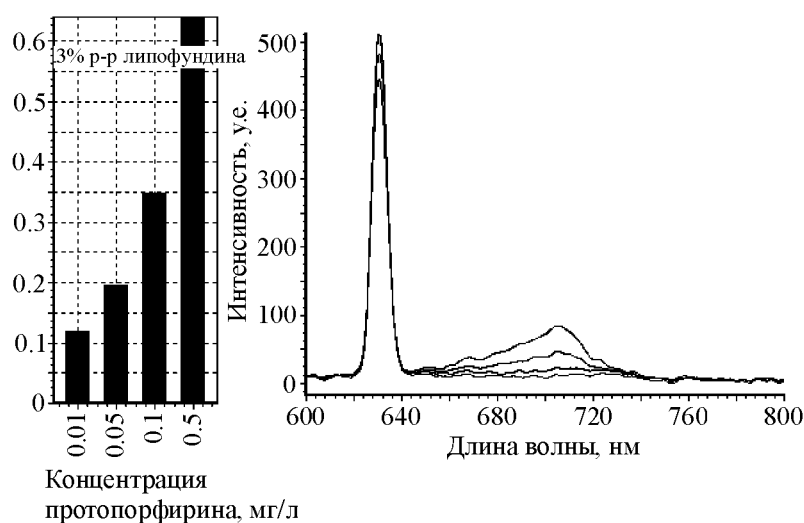


Рис. 1: Изменение отношения уровня флуоресцентного сигнала к уровню рассеянной назад лазерной компоненты в зависимости от концентрации флуорофора (протопорфирина IX) (слева) и соответствующие спектры флуоресценции протопорфирина IX и диффузного отражения лазерного излучения (справа).

Метод определения концентрации флуорофора по индексу флуоресценции (отношению интенсивности флуоресцентного сигнала к интенсивности рассеянного назад лазерного излучения) был разработан авторами [3], но ввиду различий рассеивающих свойств среды на длине волны возбуждения и эмиссии индекс флуоресценции зависит от рассеивающих свойств среды при неизменной концентрации флуорофора (рис. 1, 2). Для элиминации этой погрешности метода была проведена серия спектроскопических измерений на фантомах тканей головного мозга, содержащих рассеивающую среду и флуорофор (протопорфирин IX) в различных концентрациях.

Как было указано в [17–19], с увеличением концентрации жировой эмульсии эффективность рассеяния спадает, что приводит к необходимости включения квадратичного

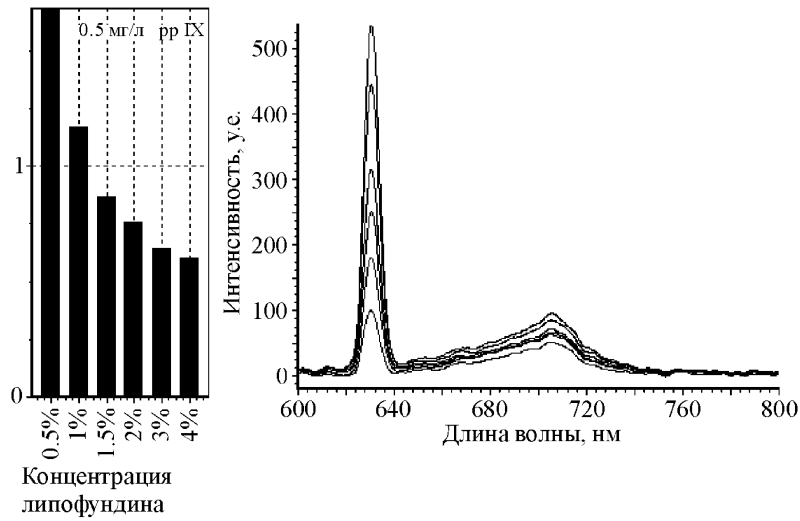


Рис. 2: Изменение отношения уровня флуоресцентного сигнала к уровню рассеянной назад лазерной компоненты в зависимости от концентрации рассеивателя (Липофундина) (слева) и соответствующие спектры флуоресценции протопорфирина IX и диффузного отражения лазерного излучения (справа).

члена в зависимость коэффициента  $\mu_s$  экстинкции, обусловленной рассеянием, от концентрации рассеивателя для корректной аппроксимации зависимости регистрируемого сигнала ОДО от концентрации рассеивателя с помощью диффузионного приближения теории переноса излучения, согласно которому световой поток  $\Phi(r)$  на расстоянии  $r$  от источника излучения определяется выражением:

$$\Phi(r) = \frac{3\mu'_s}{4\pi r} \exp(-\mu_{\text{eff}} \cdot r),$$

где  $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a\mu'_s}$  – эффективный коэффициент ослабления,  $\mu_a$  – коэффициент экстинкции, обусловленной поглощением,  $\mu'_s = \varepsilon_1 \cdot \rho_{lf} + \varepsilon_2 \cdot \rho_{lf}^2$  – редуцированный коэффициент рассеяния,  $\varepsilon_i$  – коэффициенты молярной экстинкции, обусловленной рассеянием,  $\rho_{lf}$  – объёмная плотность рассеивателя.

Результаты аппроксимации регистрируемого сигнала рассеянного назад лазерного излучения при взаимодействии с раствором Липофундина в диапазоне концентраций от 1 до 10% без поглотителя для используемой в эксперименте жировой эмульсии показали, что коэффициент при квадратичном члене  $\varepsilon_2 = -250 \text{ см}^{-1}$ . Это позволило провести аппроксимацию и для сигнала ОДО, усреднённого по массиву фантомов, содержащих различные концентрации поглотителя (протопорфирина IX), в диапазоне концентраций от 0.5 до 4%.

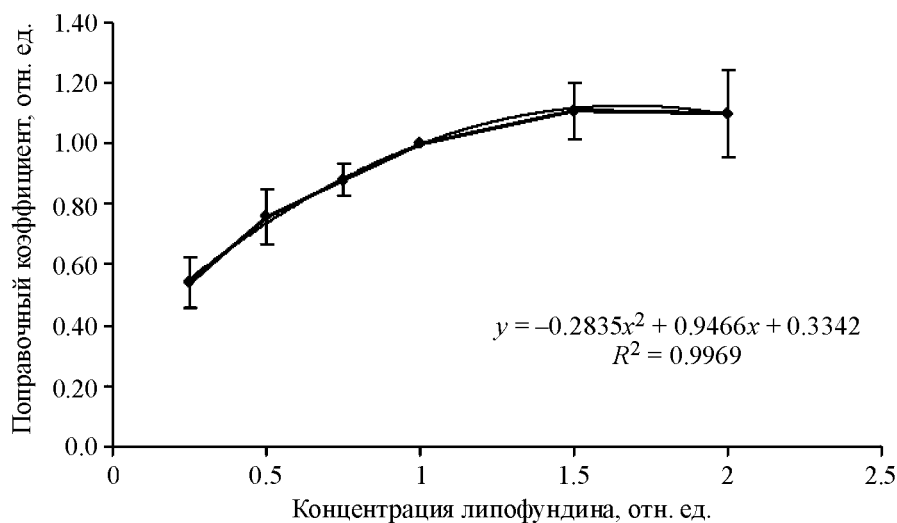


Рис. 3: Зависимость поправочного коэффициента от концентрации рассеивателя (выраженной в отн. ед. по отношению к концентрации 2% раствора Липофундина) при нормировке сигнала флуоресценции на уровень сигнала, обусловленный диффузным отражением лазерного излучения.

Поскольку различие рассеивающих и поглощающих свойств на длине волны возбуждения и длине волны флуоресценции приводит к нелинейности в оценке концентрации протопорфирина IX по уровню сигнала флуоресценции, нормированному на интенсивность рассеянного назад лазерного излучения [3], была рассчитана величина поправки для фантомов, содержащих различные концентрации рассеивателя. Кривые, оценивающие величину поправки на нелинейность, показаны на рис. 3. Поправка была рассчитана как зависимость сигнала ОДО с нормировкой на значение, соответствующее 2% раствору жировой эмульсии, усреднённая по исследуемому диапазону концентраций флуорофора (протопорфирина IX). Результирующая зависимость была аппроксимирована полиномом и имеет следующий вид:

$$y = -0.2835 \cdot x^2 + 0.9466 \cdot x + 0.3342,$$

где  $x$  – концентрация Липофундина с нормировкой на 2% раствор,  $y$  – величина поправки.

Проведение измерений с рассеивающим эталоном позволяет использовать полученную эмпирическую зависимость для проведения перенормировки при вычислении отношения сигнала флуоресценции к уровню рассеянного назад лазерного излучения.

*Выводы.* Таким образом, основываясь на результатах моделирования и экспериментальных данных, был разработан комбинированный спектроскопический метод определения концентрации флуорофора (протопорфирина IX) в сильнорассеивающих средах. При этом учитываются как уровень диффузного отражения лазерного излучения (632.8 нм), так и уровень флуоресценции в диапазоне 690–730 нм с нормировкой на рассеянную лазерную компоненту с поправкой на нелинейность.

Работа выполнена в рамках государственного контракта № 16.512.11.2275 по теме “Разработка методики и создание макета устройства для детектирования опухолевой мишени (ALA-индуцированный протопорфирин IX) с помощью спектрального анализа и изучения эффекта фотодинамического воздействия”.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] *Оптическая биомедицинская диагностика*, под ред. В. В. Тучина (Москва, Физлит, 2007).
- [2] J. R. Mourant, J. Boyer, A. H. Hielscher, and I. J. Bigio, *Optics Letters* **21**(7), 546 (1996).
- [3] V. B. Loschenov, V. I. Konov, A. M. Prokhorov, *Laser physics* **10**(6), 1188 (2000).
- [4] S. Ottestad, T. Isaksson, W. Saeys, and J. P. Wold, *Applied Spectroscopy* **64**(7), 795 (2010).
- [5] M. G. Muller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, and M. S. Feld, *Appl. Optics* **40**(25), 4633 (2001).
- [6] P. Thueler et al., *Journal of Biomedical Optics* **8**(3), 495 (2003).
- [7] J. C. Finlay, T. H. Foster, *Appl. Optics* **44**(10), 1917 (2005).
- [8] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Plenum Press, New York, 1985).
- [9] J. M. Schmitt and G. Kumar, *Opt. Lett.* **21**, 1310 (1996).
- [10] J. M. Schmitt and G. Kumar, *Appl. Opt.* **37**, 2788 (1998).
- [11] J. D. Wilson, T. H. Foster, *Optics Letters* **30**(18), 2442 (2005).
- [12] G. Mie, *Ann. Phys.* **330**, 377 (1908).
- [13] J. R. Mourant, T. M. Johnson, and J. P. Freyer, *J. Biomed. Opt.* **7**, 93 (2002).
- [14] P. Di Ninni, F. Martelli, G. Zaccanti, *Phys. Med. Biol.* **56**(2), 21 (2011).
- [15] R. Michels, F. Foschum, A. Kienle, *Optics Express* **16**(8), 5907 (2008).



- [16] H. J. van Staveren, C. J. M. Moes, J. van Marie, et al., *Appl. Optics* **30**(31), 4507 (1991).
- [17] J. Kalkman, A. V. Bykov, D. J. Faber, and T. G. van Leeuwen, *Optics Express* **18**(4), 3883 (2010).
- [18] Fabrizio Martelli and Giovanni Zaccanti, *Optics Express* **15**(2), 486 (2007).
- [19] P. Di Ninni, F. Martelli, G. Zaccanti, *Biomed. Optics Express* **2**(8), 2265 (2011).
- [20] L. Wang, S. Jacques, and L. Zheng, *Comp. Meth. in Biomed.* **47**, 131 (1995).
- [21] V. V. Tuchin, *Tissue Optics – Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*, Tutorial Texts in Optical Engineering, Vol. TT38 (SPIE, Bellingham, WA, 2000).
- [22] S. Willmann, A. Terenji, I. V. Yaroslavsky, et al., *Proceedings of SPIE, Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications III, SPIE* (Bellingham, WA, 1999), pp. 233-239.
- [23] A. N. Yaroslavsky, P. C. Schulze, I. V. Yaroslavsky, et al., *Phys. Med. Biol.* **47**, 2059 (2002).
- [24] W. Gottschalk, *Doctoral thesis* (University of Karlsruhe, Karlsruhe, Germany, 1992).
- [25] D. Schiffer, *Brain Tumor Pathology: Current Diagnostic Hotspots and Pitfalls* (Springer, Dordrecht, 2006).
- [26] Gabriel Arismendi-Morillo, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, **1807**(6), 602 (2011).
- [27] B. Beauvoit, *Analytical Biochemistry* **226**, 167 (1995).

Поступила в редакцию 29 сентября 2011 г.