

ПРИБОРЫ, БИОТЕХНИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 535.37+615.471

Е.В. ПОТАПОВА, В.В. ДРЁМИН, Е.А. ЖЕРЕБЦОВ,
К.В. ПОДМАСТЕРЬЕВ, А.В. ДУНАЕВ

РАЗРАБОТКА ЖИДКОГО ОПТИЧЕСКОГО ФАНТОМА ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Аннотация. Регистрация параметров эндогенной флуоресценции *in vivo* имеет доказанный потенциал для обеспечения важного понимания изменений в ткани при диагностике патологий различного типа. Оценка параметров интенсивности эндогенной флуоресценции при наличии различного количества рассеивателей и поглотителей создает большие трудности для внедрения таких методов в клиническую практику. Изготовление оптического фантома на основе интралипида, красителя фуксина основного и рибофлавин мононуклеотида, имитирующих спектральные свойства биоткани, может помочь в разработке методики корректировки спектра эндогенной флуоресценции биологической ткани пациента. В работе проведена оценка эффективности изготовленного жидкостного фантома с использованием метода флуоресцентной спектроскопии с длинами волн возбуждения 365 нм и 450 нм.

Ключевые слова: оптическая неинвазивная диагностика, флуоресцентная спектроскопия, оптический фантом.

Введение

Флуоресцентная спектроскопия занимает важное место в оптической биомедицинской диагностике для выявления ранних изменений в биологических тканях человека, позволяя проводить раннюю диагностику различных заболеваний [1–3]. При прогрессировании заболевания ткань претерпевает изменения от нормальной до патологической, которые отражаются в биохимическом и морфологическом составе, различиях в скорости тканевого метаболизма. Эти изменения отражаются на спектрах эндогенной флуоресценции [4, 5], что можно регистрировать с помощью спектроскопических методов или методов визуализации.

Биологическая ткань – это мутная среда, содержащая большое количество флуорофоров, рассеивателей и поглощающих молекул. Флуоресцентный анализ биологических тканей сопряжен с трудностью интерпретации спектральных зависимостей флуоресценции, так как свет, падающий на ткань подвергается в среде как поглощению, так и многократному рассеянию [6]. Проводимые исследования показывают большую вариабельность параметров интенсивности эндогенной флуоресценции как по группе добровольцев, так и индивидуально, у отдельного пациента в одной и той же области исследования в течение времени [7]. Одной из причин появления повышенной дисперсии получаемых значений является влияние поглощения крови на регистрируемые значения интенсивности флуоресценции [8], так как изменение перфузии и оксигенации крови в биоткани является параметром с большой вариабельностью собственных значений, на которые влияют многие физиологические процессы [9, 10].

В настоящее время известна группа методик компенсации кровенаполнения в флуоресцентной диагностике, самым простым из которых является использование нормирования полученных значений спектра на амплитуду обратно–отраженного сигнала [11, 12]. Перспективным является разработка новых, а также адаптация известных методик под конкретные исследовательские задачи.

Распространение света в оптически неоднородной среде, такой как большинство биологических тканей, описывается теорией переноса излучения, учитывающей оптические свойства ткани в форме коэффициентов поглощения и рассеяния [4, 13]. Эти физические величины положены в основу моделирования с помощью тест–объектов (фантомов), имитирующих оптические характеристики реальной ткани. Оптические фантомы обладают близкими к биологическим тканям оптическими свойствами и имитируют спектральные

характеристики для моделирования типичного взаимодействия биологической ткани с оптическим излучением. Фантомы играют важную роль в разработке, стандартизации и калибровке устройств биомедицинской оптики в лабораторных и клинических условиях и служат стандартами для тестирования, калибровки и поверки устройств.

Большинство спектроскопических исследований на основе фантомов, доступных в литературе, основаны на жидких фантомах [14–16]. Жидкий фантом имеет много преимуществ, поскольку его оптические свойства могут быть легко изменены путем добавления небольших количеств калиброванных рассеивающих или поглощающих веществ. Использование таких фантомов позволяет регистрировать отклик оптической системы, даже когда речь идет о небольших изменениях оптических свойств. Жидкие фантомы флуоресценции биологических тканей получают путем смешивания требуемых количеств флуоресцирующего вещества, поглощающей и рассеивающей среды в разбавленных растворах.

Целью данной работы является создание жидкого фантома флуоресценции, имитирующего оптические свойства кожи, который может быть использован для разработки методик корректировки спектра эндогенной флуоресценции биологической ткани. Ожидается, что такой фантом будет способствовать улучшению качества флуоресцентной спектроскопии.

Материалы и методы

Предложены фантомные модели биоткани на основе смеси коллоидного раствора интралипида (моделирование рассеяния), пигментов фуксина (моделирование поглощения) и рибофлавина мононуклеотида (моделирование флуоресценции FAD).

При изготовлении оптических фантомов для имитации рассеяния часто используют интралипид, как хорошо исследованную высокостабильную светорассеивающую среду с известными свойствами рассеяния и поглощения [17]. Интралипид представляет собой эмульсию глицерина, яичного лецитина, соевого масла и воды. Также на предварительном этапе было установлено, что раствор интралипида имеет собственный спектр флуоресценции с одним из пиков (470 нм) близким к пику NADH (470–490 нм). Эти результаты близки к полученным в [18], где был зарегистрирован пик флуоресценции раствора интралипида на длине волны 500 нм. Для приготовления оптического фантома использовался 20% раствор интралипида (Фрезениус Каби, США).

Исследование стабильности рассеивающих свойств интралипида проведено методом лазерной доплеровской флоуметрии путем регистрации сигнала на протяжении 40 мин. Предварительно раствор интралипида взбалтывался, оптическое волокно прибора «ЛАКК–М» (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия) фиксировалось вплотную к флакону. Результат исследования приведен на рисунке 1. На протяжении 35 мин уровень сигнала (регистрируемая перфузия ПМ) оставался неизменным, подтверждая высокостабильные рассеивающие свойства интралипида.

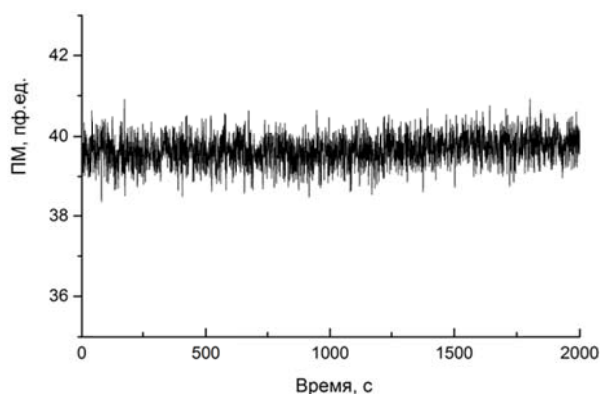


Рисунок 1 – Исследование стабильности рассеивающих свойств интралипида методом лазерной доплеровской флоуметрии

На этапе подбора поглощающего пигмента к нейтральному красителю сформулированы следующие требования: пигмент не должен вступать в химические реакции с другими компонентами разрабатываемого фантома и не должен обладать собственной флуоресценцией высокой интенсивности. Отсутствие собственной флуоресценции красителей проверено с помощью канала флуоресцентной спектроскопии прибора «ЛАКК–М». Проверка изменения оптических свойств в растворе вследствие произошедшей химической реакции осуществлялась следующим образом. Измерена оптическая плотность растворов исходных веществ (пигмента и рибофлавина), а затем оптическая плотность смеси этих веществ на спектрофотометре UNICO 1200 (United Products & Instruments, США). Если аддитивность сохранялась – считалось, что изменением поглощения за счет химического взаимодействия можно пренебречь.

В результате проведенных предварительных исследований было установлено, что заявленным требованиям отвечает фуксин основной и генциан фиолетовый. Максимум поглощения основного фуксина (550 нм) близок к локальному максимуму гемоглобина, в этой связи именно фуксин основной (ООО «НеваРеактив», Россия) был выбран для дальнейших исследований.

Для моделирования спектра флуоресценции FAD использовался рибофлавин мононуклеотид (РФМН) (АО «Фармстандарт», Россия). Этот препарат имеет аналогичный FAD спектр, однако чуть более высокий квантовый выход, при этом в отличие от FAD его квантовый выход в пределах pH 4–8 не зависит от кислотности [19, 20].

Таким образом, подготовленный фантом может воспроизводить некоторые важные свойства биоткани с точки зрения флуоресцентной спектроскопии, такие как поглощение света, рассеяние и флуоресценция.

Измерения флуоресценции оптических фантомов проводились с использованием вышеописанного спектроскопического устройства с длинами волн возбуждения флуоресценции 365 нм и 450 нм. Все составляющие фантома смешивались в лабораторном стеклянном стакане, регистрируемые спектры излучения наблюдались в диапазоне длин волн от 350 до 800 нм.

Результаты и обсуждение

При исследовании оптических флуоресцентных свойств изучаемого оптического фантома были проведены последовательно ряд экспериментов.

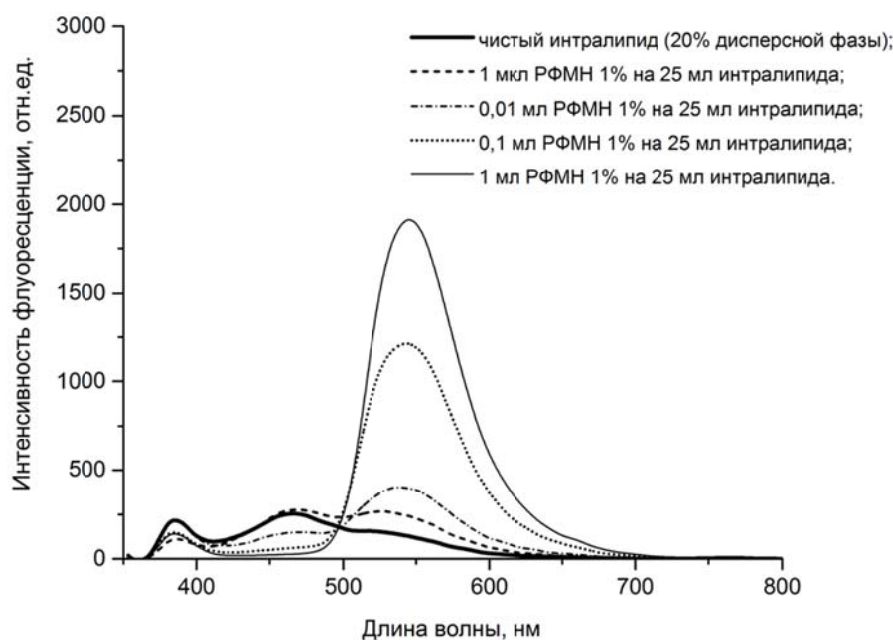


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции при разных концентрациях РФМН (1 мл, 0,1 мл, 0,01 мл, 1 мкл РФМН 1% на 25 мл интралипида) при возбуждении на длине волны 365 нм

Для изучения зависимости оптических свойств фантома от содержания флуоресцирующего агента была измерена флуоресценция раствора со следующими концентрациями РФМН в интралипиде: 1 мл, 0,1 мл, 0,01 мл, 1 мкл РФМН 1% на 25 мл интралипиде. Спектры флуоресценции полученных растворов при возбуждении на длине волны 365 нм и 450 нм приведены на рисунках 2 и 3, соответственно.

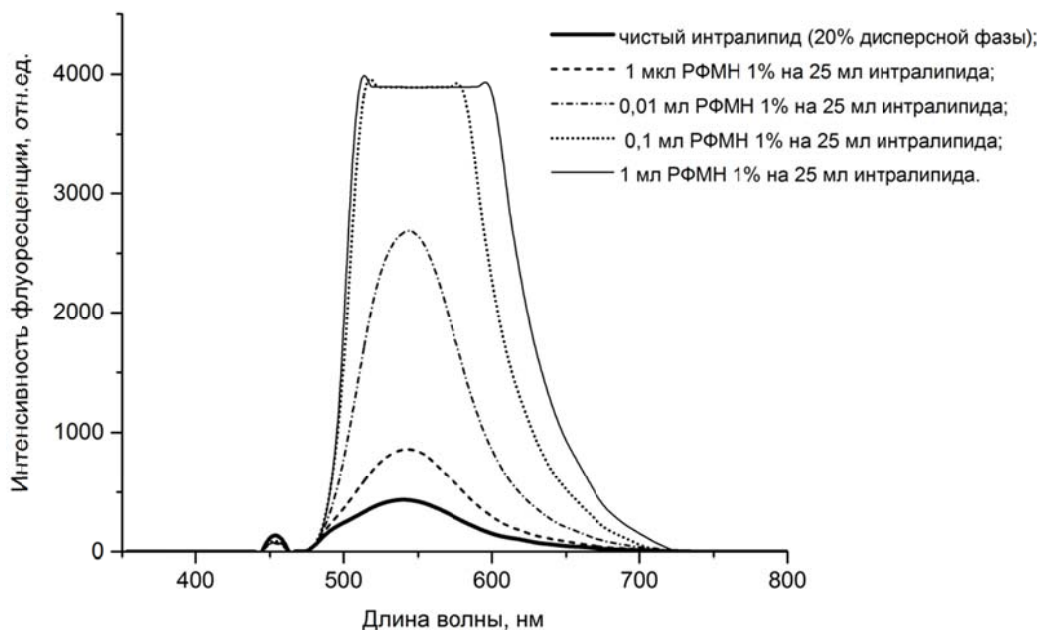


Рисунок 3 – Спектры флуоресценции при разных концентрациях РФМН (1 мл, 0,1 мл, 0,01 мл, 1 мкл РФМН 1% на 25 мл интралипиде) при возбуждении на длине волны 450 нм

Анализируя рисунки 2 и 3, можно сказать, что все спектры имели доминирующие пики, соответствующие выходу FAD. Выявлена обратная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации РФМН в интралипиде. При этом концентрация более 0,01 мл РФМН 1 % на 25 мл интралипиде вызвала насыщение фотоприемника и большую интенсивность сигнала при возбуждении длиной волны 450 нм. Для основной части экспериментов была выбрана следующая концентрация РФМН в интралипиде: 0.001:25 – 1 мкл 1 % РФМН на 25 мл интралипиде 20 %. Это обусловлено тем, что уровень сигнала при такой концентрации на возбуждении длинами волн 365 нм и 450 нм соответствует среднему уровню сигнала, полученному с помощью прибора «ЛАКК–М» на коже человека [7].

Далее экспериментально подбиралась необходимая концентрация пигмента. Изменение спектра флуоресценции регистрировалось при добавлении разных количеств насыщенного при 25 °С раствора фуксина (10; 20; 30 мкл на смесь 25 мл интралипиде и 1 мкл РФМН). Спектры флуоресценции полученных растворов при возбуждении длинами волн 365 нм и 450 нм приведены на рисунках 4 и 5, соответственно.

При увеличении концентрации фуксина сигнал флуоресценции уменьшается. Для последующего эксперимента выбрана смесь 30 мкл насыщенного раствора фуксина на 25 мл интралипиде 20% и 1 мкл РФМН 1%, так как именно этот состав фантома обеспечивает пик флуоресценции возбужденной длиной волны 365 нм, на длине 450 нм, что соответствует доминирующему пику выхода FAD. А также эта концентрация обеспечивает уровень сигнала возбужденной флуоресценции кожи человека.

Следующей задачей экспериментальных исследований была оценка изменения спектра флуоресценции предложенного фантома при разбавлении водой. Для этого полученный состав разбавлялся в 2 и 10 раз. Результаты экспериментальных исследований на длинах волн 365 нм и 450 нм приведены на рисунках 6 и 7, соответственно.

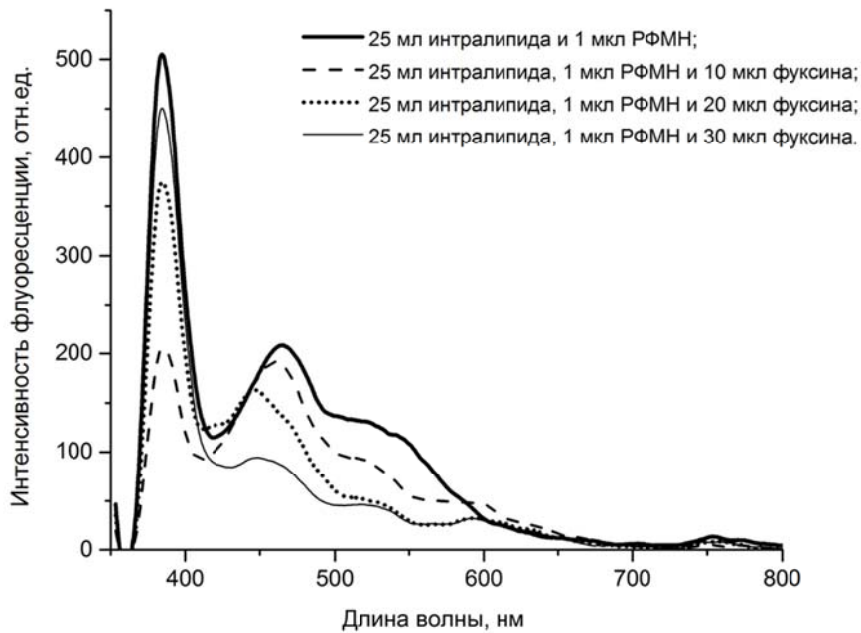


Рисунок 4 – Спектры флуоресценции при добавлении разных количеств насыщенного при 25 °С раствора фуксина (10; 20; 30 мкл на смесь 25 мл интралипида и 1 мкл РФМН) при возбуждении на длине волны 365 нм

Разбавление фантома водой вызвало изменение интенсивности сигнала, что позволяет подготовить оптический фантом для исследований на спектрометрах с разным диапазоном измеряемых значений, оптимально подбирая концентрацию к каждому конкретному прибору.

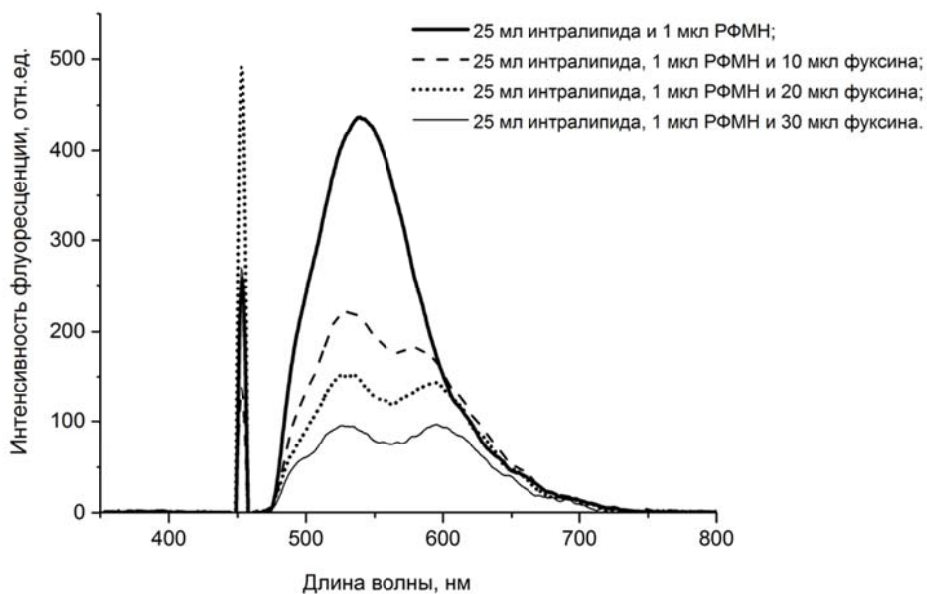


Рисунок 5 – Спектры флуоресценции при добавлении разных количеств насыщенного при 25 °С раствора фуксина (10; 20; 30 мкл на смесь 25 мл интралипида и 1 мкл РФМН) при возбуждении на длине волны 450 нм

На заключительном этапе исследований свойств предложенного фантома было проведено измерение глубины зондирования на длине волны 365 нм. Для исследования глубины рассеяния волоконный зонд погружался в смесь и, находясь в ней, подносился к черной поглощающей нефлуоресцирующей поверхности (рисунок 8). При этом сигнал флуоресценции падал практически до 0. Затем волоконный зонд приподнимался над поглощающей поверхностью контролировалось расстояние, на котором сигнал

флуоресценции на данной длине волны переставал увеличиваться. Таким образом глубина зондирования была оценена на уровне 2 мм.

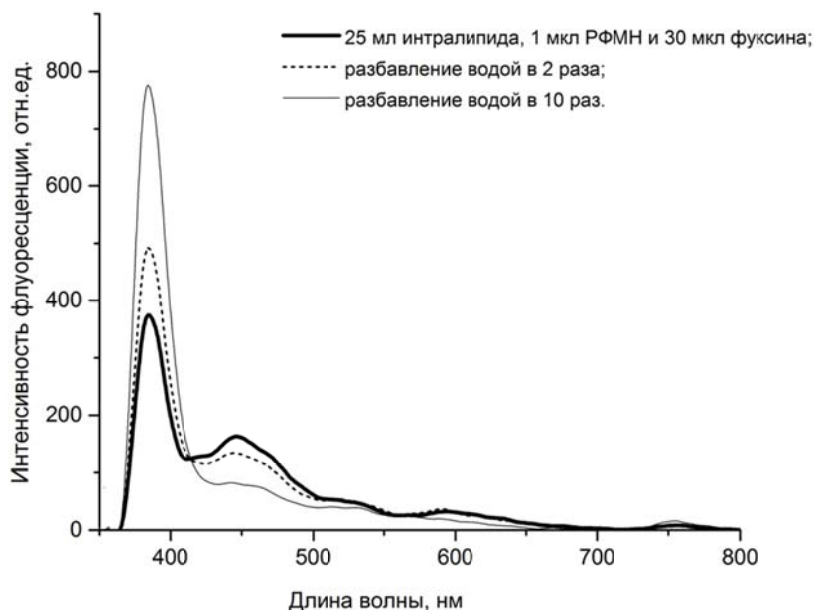


Рисунок 6 – Спектры флуоресценции оптического фантома при разбавлении водой (разбавление в 2 и 10 раз) при возбуждении на 365 нм

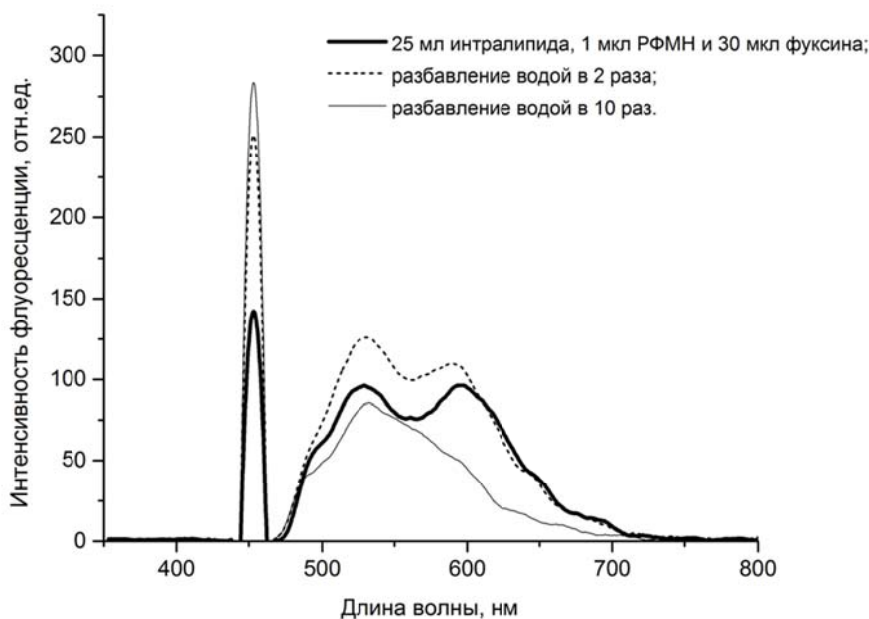


Рисунок 7 – Спектры флуоресценции оптического фантома при разбавлении водой (разбавление в 2 и 10 раз) при возбуждении на 450 нм

Заключение

Верификацию теоретических моделей распространения света в биологической ткани, а также тестирование и оценку рабочих характеристик измерительных устройств чрезвычайно трудно осуществить в экспериментах *in vivo* на реальных биологических объектах, так как при этом приходится сталкиваться с широким разбросом морфологических и биохимических параметров, находящихся вне контроля экспериментатора. Также, в области медицинской биофотоники существует необходимость создания стабильных и воспроизводимых методик калибровки и контроля эксплуатационных параметров приборов и систем, что, в свою очередь, обосновывает потребность в разработке стабильных во

времени и воспроизводимых тест-объектов, имитирующих оптические характеристики реальной ткани (фантомов).



Рисунок 8 – Эксперимент по измерению глубины зондирования

В этом исследовании разработан состав жидкого оптического фантома с подобными коже свойствами рассеяния, поглощения и флуоресценции и подтверждена его эффективность с помощью флуоресцентной спектроскопии. Было проанализировано влияние на оптические свойства тест-объекта различных концентраций флуоресцирующего агента и красителя. Предложенный фантом воспроизводимый, стабильный, простой в приготовлении и имитирует оптические свойства нормальной кожи человека. Такой фантом может быть полезным в разработке методики корректировки спектра эндогенной флуоресценции биологической ткани пациента, а также при оценке чувствительности и разрешения разрабатываемых приборов флуоресцентной спектроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18-02-00669).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shahzad, A. Fluorescence spectroscopy: an emerging excellent diagnostic tool in medical sciences / A. Shahzad, M. Edetsberger, G. Koehler // *Applied Spectroscopy Reviews*, 2010. – 45 (1). P. 1–11.
2. Дрёмин, В.В. Возможности применения сочетанных методов оптической неинвазивной диагностики при исследовании жизнеспособности тканей нижних конечностей пациентов с сахарным диабетом / В.В. Дрёмин, Е.В. Дрёмина, Е.В. Жарких, Е.В. Потапова, Е.А. Алимичева, Г.И. Масалыгина, А.В. Дунаев // *Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии*, 2016. – № 1 (315). – С. 136–142.
3. Shahzad, A. Diagnostic application of fluorescence spectroscopy in oncology field: hopes and challenges / A. Shahzad, M. Knapp, M. Edetsberger, M. Puchinger, E. Gaubitzer, G. Koehler // *Applied Spectroscopy Reviews*, 2010. – 45 (1). – P. 92–99.
4. Тучин, В.В. Оптическая биомедицинская диагностика: в 2-х т.: учебное издание / В.В. Тучин. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 559 с.
5. Kandurova, K. Application of the fluorescence spectroscopy for the analysis of the state of abdominal cavity organs tissues in mini-invasive surgery / K. Kandurova, V.V. Dremin, E.A. Zharebtsov, E.V. Potapova, A.V. Dunaev, A.V. Mamoshin, A.L. Alyanov, V.F. Muradyan // *Proceedings Volume 10685, Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI*, 2018. – P. 171.
6. Muller, M.G. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: Disentangling effects of scattering and absorption / M.G. Muller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, M.S. Feld // *Applied Optics*, 2001. – 40 (25). – P. 4633–4646.
7. Dunaev, A.V. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow / A.V. Dunaev, V.V. Dremin, E.A. Zharebtsov, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova, S.G. Palmer, N. A. Stewart, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // *Medical Engineering & Physics*, 2015. – 37 (6). – P. 574–583.
8. Lim, L. Probe pressure effects on human skin diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy

measurements / L. Lim, B. Nichols, N. Rajaram, J.W. Tunnell // *Journal of Biomedical Optics*, 2011. – 16 (1). – P. 011012.

9. Дунаев, А.В. Анализ индивидуальной variability параметров в лазерной флуоресцентной диагностике / А.В. Дунаев, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов, С.Г. Палмер, С.Г. Соколовский, Э.У. Рафаилов // *Биотехносфера*, 2013. – № 2 (26). – С. 39–47.

10. Dunaev, A.V. Laser reflectance oximetry and Doppler flowmetry in assessment of complex physiological parameters of cutaneous blood microcirculation / A.V. Dunaev; V.V. Sidorov; N.A. Stewart; S.G. Sokolovski; E.U. Rafailov // *Proceedings Volume 8572, Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems XI*, 2013. – P. 857205.

11. de Veld, D.C. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology / D.C. de Veld, M. Skurichina, M.J. Witjes, R.P. Duin, H.J. Sterenberg, J.L. Roodenburg // *Lasers in Surgery and Medicine*, 2005. – 36 (5). – P. 356–364.

12. Bradley, R.S. A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence / R.S. Bradley, M.S. Thorniley // *Journal of The Royal Society Interface*, 2006. – 3 (6). – P. 1.

13. Ishimaru, A. Wave propagation and scattering in random media / A. Ishimaru. – New York: Academic Press, 1978. – 600 p.

14. Wang, D. A liquid optical phantom with tissue-like heterogeneities for confocal microscopy / D. Wang, Y. Chen, J.T.C. Liu // *Biomedical Optics Express*, 2012. – 3 (12). – P. 3153.

15. Loginova, D.A. Liquid optical phantoms mimicking spectral characteristics of laboratory mouse biotissues / D.A. Loginova, E.A. Sergeeva, A.D. Krainov, P.D. Agrba and M.Yu. Kirillin // *Quantum Electronics*, 2016. – 46 (6). – P. 528–533.

16. Kleiser, S. Comparison of near-infrared oximeters in a liquid optical phantom with varying intralipid and blood content / S. Kleiser, S. Hyttel-Sorensen, G. Greisen, M. Wolf // *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016. – 876. – P. 413–418.

17. Ninni, P. Di. Intralipid: towards a diffusive reference standard for optical tissue phantoms / P.Di. Ninni, F. Martelli, G. Zaccanti // *Physics in Medicine & Biology*, 2011. – 56 (2). – P. N21–N28.

18. Du Le, V.N. Measurements of extrinsic fluorescence in Intralipid and polystyrene microspheres / V.N. Du Le, Z. Nie, J.E. Hayward, T.J. Farrell, Q. Fang // *Biomedical Optics Express*, 2014. – 5 (8). – P. 2726.

19. Drössler, P. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution / P. Drössler, W. Holzer, A. Penzkofer, P. Hegemann // *Chemical Physics*, 2002. – 282 (3). – P. 429–439.

20. Galbán, J. The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review / J. Galbán, I. Sanz-Vicente, J. Navarro, S. de Marcos // *Methods and Applications in Fluorescence*, 2016. – 4 (4). – P. 042005.

Потапова Елена Владимировна

ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орёл,
Россия
Кандидат технических наук, доцент, старший научный
сотрудник Научно-технологического центра
биомедицинской фотоники
302020, г. Орел, Наугорское шоссе, 29
Тел.: +7-4862-41-98-37
E-mail: potapova_ev_ogu@mail.ru

Дрёмин Виктор Владимирович

ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орёл,
Россия
Кандидат технических наук, научный сотрудник
Научно-технологического центра биомедицинской
фотоники
302020, г. Орел, Наугорское шоссе, 29
Тел.: +7-4862-41-98-37
E-mail: dremin_viktor@mail.ru

Жеребцов Евгений Андреевич

ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орёл,
Россия
Кандидат технических наук, старший научный
сотрудник Научно-технологического центра
биомедицинской фотоники
302020, г. Орел, Наугорское шоссе, 29
Тел.: +7-4862-41-98-37
E-mail: zherebzow@gmail.com

Подмастерьев Константин Валентинович

ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орёл,
Россия
Доктор технических наук, профессор, директор
Института приборостроения, автоматизации и
информационных технологий
302020, г. Орел, Наугорское шоссе, 29
Тел.: +7-4862-41-98-76
E-mail: asms-orel@mail.ru

Дунаев Андрей Валерьевич

ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», г. Орёл, Россия
Кандидат технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Научно-технологического центра
биомедицинской фотоники
302020, г. Орел, Наугорское шоссе, 29
Тел.: +7-4862-41-98-37
E-mail: inohvat@yandex.ru

E.V. POTAPOVA, V.V. DREMIN, E.A. ZHEREBTSOV,
K.V. PODMASTERYEV, A.V. DUNAEV

LIQUID OPTICAL PHANTOM FOR FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Abstract. *Registration of endogenous fluorescence in vivo has a proven potential for providing important information for the diagnosis of a number of pathologies. Evaluation of the intensity of endogenous fluorescence in the presence of different scatterers and absorbers rises great difficulties in interpretation of the results as well as in the use of such methods in clinical practice. The preparation of a liquid optical phantom based on intralipid, fuchsin base and riboflavin mononucleotide dye simulating the spectral properties of the tissue, can help in the developing a methodology for the correction of the spectrum of endogenous fluorescence of biological tissue. The parameters of the prepared liquid phantoms were estimated using the fluorescence spectroscopy method with excitation wavelengths of 365 nm and 450 nm.*

Keywords: *optical non-invasive diagnostics, fluorescence spectroscopy, liquid optical phantom.*

BIBLIOGRAPHY

1. Shahzad, A. Fluorescence spectroscopy: an emerging excellent diagnostic tool in medical sciences / A. Shahzad, M. Edetsberger, G. Koehler // *Applied Spectroscopy Reviews*, 2010. – 45 (1). P. 1–11.
2. Dremin, V.V. Vozmozhnosti primeneniya sochetannyh metodov opticheskoy neinvazivnoj diagnostiki pri issledovanii zhiznesposobnosti tkanej nizhnih konechnostej pacientov s saharnym diabetom / V.V. Dremin, E.V. Dremina, E.V. Zharkih, E.V. Potapova, E.A. Alimicheva, G.I. Masalygina, A.V. Dunaev // *Fundamentalnye i prikladnye problemy tekhniki i tekhnologii*, 2016. – № 1 (315). – S. 136–142.
3. Shahzad, A. Diagnostic application of fluorescence spectroscopy in oncology field: hopes and challenges / A. Shahzad, M. Knapp, M. Edetsberger, M. Puchinger, E. Gaubitzer, G. Koehler // *Applied Spectroscopy Reviews*, 2010. – 45 (1). – P. 92–99.
4. Tuchin, V.V. Opticheskaya biomedicinskaya diagnostika: v 2–h t.: uchebnoe izdanie / V.V. Tuchin. – M.: FIZMATLIT, 2007. – 559 s.
5. Kandurova K. Application of the fluorescence spectroscopy for the analysis of the state of abdominal cavity organs tissues in mini-invasive surgery / K. Kandurova, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, E.V. Potapova, A.V. Dunaev, A.V. Mamoshin, A.L. Alyanov, V.F. Muradyan // *Proceedings Volume 10685, Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI*, 2018. – P. 171.
6. Muller, M.G. Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: Disentangling effects of scattering and absorption / M.G. Muller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, M.S. Feld // *Applied Optics*, 2001. – 40 (25). – P. 4633–4646.
7. Dunaev, A.V. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow / A.V. Dunaev, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, I.E. Rafailov, K.S. Litvinova, S.G. Palmer, N. A. Stewart, S.G. Sokolovski, E.U. Rafailov // *Medical Engineering & Physics*, 2015. – 37 (6). – P. 574–583.
8. Lim, L. Probe pressure effects on human skin diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy measurements / L. Lim, B. Nichols, N. Rajaram, J.W. Tunnell // *Journal of Biomedical Optics*, 2011. – 16 (1). – P. 011012.
9. Dunaev, A.V. Analiz individualnoj variabelnosti parametrov v lazernoj fluorescentnoj diagnostike / A.V. Dunaev, V.V. Dremin, E.A. Zherebcov, S.G. Palmer, S.G. Sokolovskij, E.H.U. Rafailov // *Biotekhnosfera*, 2013. – № 2 (26). – S. 39–47.
10. Dunaev, A.V. Laser reflectance oximetry and Doppler flowmetry in assessment of complex physiological parameters of cutaneous blood microcirculation / A.V. Dunaev; V.V. Sidorov; N.A. Stewart; S.G. Sokolovski; E.U. Rafailov // *Proceedings Volume 8572, Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems XI*, 2013. – P. 857205.
11. de Veld, D.C. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for oral oncology / D.C. de Veld, M. Skurichina, M.J. Witjes, R.P. Duin, H.J. Sterenborg, J.L. Roodenburg // *Lasers in Surgery and Medicine*, 2005. – 36 (5). – P. 356–364.
12. Bradley, R.S. A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence / R.S. Bradley, M.S. Thorniley // *Journal of The Royal Society Interface*, 2006. – 3 (6). – P. 1.
13. Ishimaru, A. Wave propagation and scattering in random media / A. Ishimaru. – New York: Academic Press, 1978. – 600 p.
14. Wang, D. A liquid optical phantom with tissue-like heterogeneities for confocal microscopy / D. Wang, Y. Chen, J.T.C. Liu // *Biomedical Optics Express*, 2012. – 3 (12). – P. 3153.

15. Loginova, D.A. Liquid optical phantoms mimicking spectral characteristics of laboratory mouse biotissues / D.A. Loginova, E.A. Sergeeva, A.D. Krainov, P.D. Agrba and M.Yu. Kirillin // *Quantum Electronics*, 2016. – 46 (6). – P. 528–533.

16. Kleiser, S. Comparison of near-infrared oximeters in a liquid optical phantom with varying intralipid and blood content / S. Kleiser, S. Hyttel-Sorensen, G. Greisen, M. Wolf // *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016. – 876. – P. 413–418.

17. Ninni, P. Di. Intralipid: towards a diffusive reference standard for optical tissue phantoms / P.Di. Ninni, F. Martelli, G. Zaccanti // *Physics in Medicine & Biology*, 2011. – 56 (2). – P. N21–N28.

18. Du Le, V.N. Measurements of extrinsic fluorescence in Intralipid and polystyrene microspheres / V.N. Du Le, Z. Nie, J.E. Hayward, T.J. Farrell, Q. Fang // *Biomedical Optics Express*, 2014. – 5 (8). – P. 2726.

19. Drössler, P. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution / P. Drössler, W. Holzer, A. Penzkofer, P. Hegemann // *Chemical Physics*, 2002. – 282 (3). – P. 429–439.

20. Galbán, J. The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review / J. Galbán, I. Sanz-Vicente, J. Navarro, S. de Marcos // *Methods and Applications in Fluorescence*, 2016. – 4 (4). – P. 042005.

Potapova Elena Vladimirovna

Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, Russia

Ph.D., senior researcher of Research and Development

Center of Biomedical Photonics

302020, Orel, Naugorskoe Shosse, 29

Ph.: +7-4862-41-98-37

E-mail: potapova_ev_ogu@mail.ru

Dremin Victor Vladimirovich

Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, Russia

Ph.D., researcher of Research and Development Center of Biomedical Photonics

302020, Orel, Naugorskoe Shosse, 29

Ph.: +7-4862-41-98-37

E-mail: dremin_viktor@mail.ru

Zherebtsov Evgeny Andreevich

Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, Russia

Ph.D., senior researcher of Research and Development

Center of Biomedical Photonics

302020, Orel, Naugorskoe Shosse, 29

Ph.: +7-4862-41-98-37

E-mail: zherebzow@gmail.com

Podmasteryev Konstantin Valentinovich

Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, Russia

Doctor of Technical Sciences, professor, director of Institute of Instrument Engineering, Automation and Information Technologies

302020, Orel, Naugorskoe Shosse, 29

Ph.: +7-4862-41-98-76

E-mail: asms-orel@mail.ru

Дунаев Андрей Валерьевич

Orel State University named after I.S. Turgenev, Orel, Russia

Ph.D., leading researcher of Research and Development Center of Biomedical Photonics

302020, Orel, Naugorskoe Shosse, 29

Ph.: +7-4862-41-98-37

E-mail: inohvat@yandex.ru