

УДК 577.3

М.А.КАРАВАЕВ, В.В. ДРЁМИН, А.И. ЖЕРЕБЦОВА, И.Н. НОВИКОВА, Е.В. ЖАРКИХ,
Е.А. ЖЕРЕБЦОВ, А.В. ДУНАЕВ
M.A. KARAVAEV, V.V. DREMIN, A.I. ZHEREBTSOVA, I.N. NOVIKOVA, E.V. ZHARKIKH,
E.A. ZHEREBTSOV, A.V. DUNAEV

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ КРОВОТОКА И СИГНАЛОВ
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БИОТКАНИ
RESEARCH OF INTERRELATIONS OF BLOOD FLOW AND FLUORESCENCE
SIGNALS OF BIOLOGICAL TISSUES**

В данной статье проведена попытка исследования влияния интенсивности кровотока на регистрируемые спектры флуоресценции флуорофоров (NADH и FAD) кожи пальцев условно здоровых добровольцев. Полученные предварительные данные необходимо учитывать при интерпретации диагностических данных в методе флуоресцентной спектроскопии, а также при обосновании медико-технических требованиям к устройствам, реализующим представленный метод.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, лазерная доплеровская флоуметрия, кровоток, флуорофоры биоткани, коэффициент корреляции, функциональные пробы.

This article made an attempt to study the influence of the intensity of the blood flow in the recorded fluorescence spectra of fluorophores (NADH and FAD) skin of the fingers of healthy volunteers. The preliminary data should be considered when interpreting the diagnostic data in the method of fluorescence spectroscopy, as well as the justification of medical and technical requirements for devices implementing the method presented.

Keywords: fluorescence spectroscopy, laser Doppler flowmetry, blood flow, fluorophores of biological tissue, correlation coefficient, functional tests.

В настоящее время все более широкое применение в химии, биологии, различных областях медицинской техники и медицины в целом находят флуоресцентные методы исследования. Так, одним из наиболее ярких и широко применяемых на практике флуоресцентных методов исследования является метод флуоресцентной спектроскопии (ФС), в основу которого положен принцип регистрации спектров нетепловых квантов света, испускаемых возбужденными атомами и/или молекулами различных флуорофоров при облучении их внешним целенаправленным оптическим излучением. Данные методы обладают высокой чувствительностью и дают уникальные возможности изучить возбужденные состояния молекул, фотохимические реакции, динамику быстрых молекулярных процессов, структуру и свойства сложных химических и биологических объектов [1-2]. Также важнейшим достоинством данного метода является проведение исследований *in vivo*, что значительно расширяет границы применимости ФС в медико-биологической практике. В настоящее время одним из наиболее актуальных направлений использования ФС является применение данного метода в качестве источника дополнительных диагностических параметров. Это обусловлено тем, что в организме человека содержится ряд клеточных структур, таких как новообразования кожи, слизистые оболочки полости рта, желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы, которые содержат в своем составе различные биологические флуорофоры, испускающие специфические аутофлуоресцентные спектры при облучении их светом определенной длины волны [3]. При этом по характеру регистрируемого спектра можно с определенной долей вероятности судить о наличии и концентрации тех или иных веществ в исследуемой структуре. Так как концентрация биологических флуорофоров в ткани при различных ее патологиях может меняться, то данные ФС в дальнейшем могут быть использованы при постановке диагноза и назначении соответствующего лечения [4]. Ввиду этого на

сегодняшний день наиболее перспективным и целесообразным является применение метода ФС в областях онкологии, косметологии, трансплантологии, хирургии и т.д. [5].

Несмотря на все достоинства и перспективы ФС, данный метод имеет ряд нерешенных проблем, которые не позволяют на сегодняшний день широко использовать его в качестве стандартной диагностической технологии. Одной из сложностей является то, что на характер флуоресценции тканей влияет множество различных параметров, таких как температура, топологические неоднородности, различие свойств каждого исследуемого образца, погрешность измерений и др., влияние которых необходимо учитывать при интерпретации данных ФС. Так, одним из важнейших факторов, влияющих на флуоресценцию таких биологических флуорофоров, как NADH и FAD, является активность метаболических процессов, которая в свою очередь характеризуется интенсивностью кровотока [6]. Отсюда становится актуальным вопрос об исследовании влияния интенсивности кровотока на интенсивность флуоресценции данных коферментов.

Таким образом, целью работы явился поиск корреляционных зависимостей между интенсивностью кровотока и флуоресценцией кожных флуорофоров NADH и FAD.

Для оценки интенсивности кровотока регистрировалась перфузия в зондируемом участке биоткани испытуемого. Измерение показателя микроциркуляции (индекс микроциркуляции – I_m) осуществлялось методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), который основывается на регистрации доплеровского сдвига частоты лазерного излучения при его отражении от форменных элементов крови, движущихся по сосудам в исследуемом участке биоткани [7]. Измерение перфузии производилось при помощи лазерного доплеровского анализатора крови «ЛАКК-02». Интенсивность флуоресценции измерялась соответственно методом ФС при помощи многофункционального лазерного диагностического комплекса «ЛАКК-М» (ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва) при 2-х длинах волн возбуждения флуоресценции NADH ($\lambda=365$ нм) и FAD ($\lambda=450$ нм).

Эксперименты проводились на коже ладонной поверхности среднего и безымянного пальцев правой руки условно здоровых добровольцев. В качестве функциональных (провокационных) проб, посредством которых оказывалось влияние на интенсивность кровотока, применялись тепловые и холодные пресорные пробы, а также плечевая окклюзия с давлением в манжете 200-220 мм рт.ст. Температура изменялась помещением одетой в резиновую перчатку руки добровольца, на которой размещались оптические волокна каналов ЛДФ и ФС, а также датчик малоинерционного измерителя накожной температуры [8], в воду с разной температурой. За одно исследование регистрировали флуоресценцию либо NADH, либо FAD.

Исследование состояло из 6 стадий, представленных в таблице 1, общей длительностью 40 мин, во время которых одновременно происходила регистрация перфузии и спектров флуоресценции биоткани.

Таблица 1 – Параметры этапов эксперимента

№ п/п	Название этапа	Температура окружающей среды, °С	Длительность, мин
1	Фоновая запись при температуре окружающей среды	24-25	2
2	Тепловая проба	42	4
3	Холодовая проба	15-20	10
4	Окклюзионная и холодная пробы	15-20	3
5	Стадия релаксации	15-20	10
6	Финальная тепловая проба (отогрев)	42	11

Экспериментальную базу исследования составили 37 экспериментов, проведенные на 10 добровольцах.

На основе полученных в результате экспериментов данных по каждому из добровольцев подсчитывались коэффициенты корреляции между перфузией и интенсивностью флуоресценции NADH и FAD. Также для доказательства адекватности тепловых и холодных прессорных проб были рассчитаны корреляционные коэффициенты перфузии и температуры кожи ладонной поверхности пальца добровольца. Характерные коэффициенты корреляции, полученные для 4 добровольцев, представлены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Результаты исследований также были представлены в виде графических зависимостей величин интенсивности перфузии I_m обратно отраженного излучения I_{bs} и интенсивности флуоресценции I_f . Пример графиков представлен на рисунках 1 и 2.

Таблица 2 – Зависимость перфузии и интенсивности флуоресценции NADH

№ добровольца	Коэффициент корреляции перфузии и интенсивности флуоресценции	Коэффициент корреляции перфузии и температуры кожи ладонной поверхности пальца добровольца
1	-0,63	0,63
2	-0,53	0,45
3	-0,47	0,86
4	-0,39	0,64

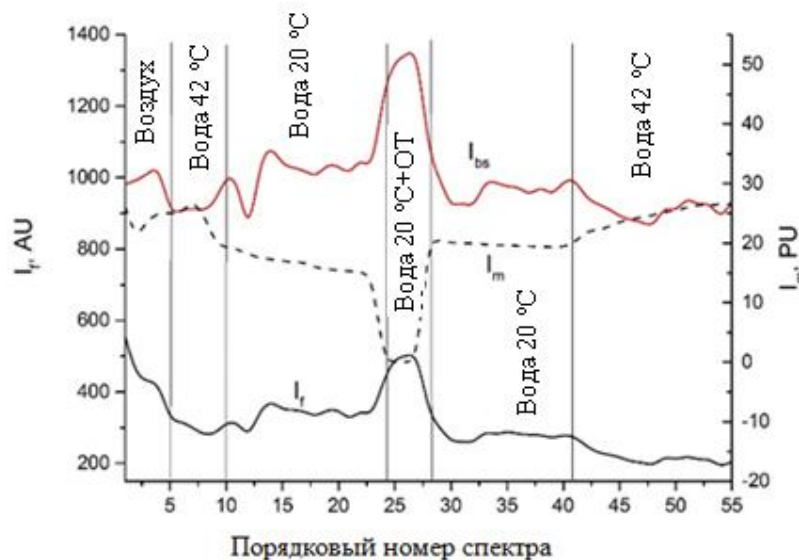


Рисунок 1 – Пример полученных в одном эксперименте графиков обратно отраженного излучения (I_{bs}), интенсивности флуоресценции для NADH (I_f) и перфузии (I_m)

Таблица 3 – Зависимость перфузии и интенсивности флуоресценции FAD

№ добровольца	Коэффициент корреляции перфузии и интенсивности флуоресценции	Коэффициент корреляции перфузии и температуры кожи ладонной поверхности пальца добровольца
1	0,44	0,45
2	-0,29	0,74
3	-0,67	0,86
4	-0,82	0,72

Согласно метаболической теории регуляции кровотока, при изменении его интенсивности, должна изменяться концентрация восстановленной формы NADH и окисленной формы FAD. Причём эти изменения находятся в обратной зависимости. Как следствие, благодаря изменению концентраций флуорофоров должна изменяться интенсивность их флуоресценции. Также достоверно известно, что кровь поглощает световое излучение в исследуемых диапазонах длин волн, что должно также сказываться на результатах эксперимента.

Обработка экспериментальной базы исследований показала, что для большей части испытуемых были получены отрицательные значения коэффициентов корреляции как для FAD, так и для NADH, что свидетельствует об уменьшении интенсивности флуоресценции у обоих коферментов при увеличении кровотока.

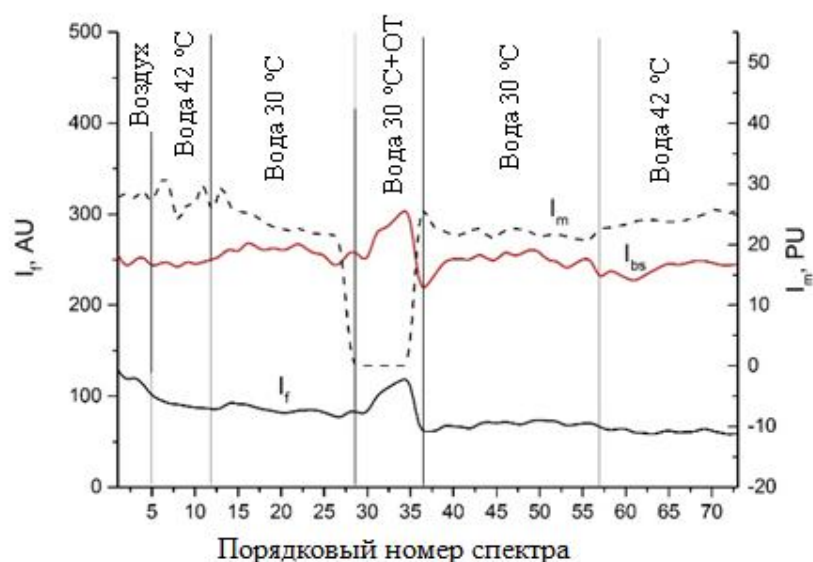


Рисунок 2 – Пример полученных в одном эксперименте графиков обратно отраженного излучения (I_{bs}), интенсивности флуоресценции для FAD (I_f) и перфузии (I_m)

Следует также отметить, что для добровольца №1 коэффициент корреляции, между интенсивностью флуоресценции FAD и перфузией оказался положительным, в отличие от остальных результатов, что требует проведения дополнительных исследований.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о существенном воздействии крови на флуоресценцию как оптического фильтра, что

необходимо учитывать при интерпретации данных ФС, наряду с прочими параметрами, влияющими на флуоресценцию биоткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии // Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
2. Рогаткин Д.А. Физические основы лазерной клинической флуоресцентной спектроскопии in vivo. Лекция. // Медицинская физика. – 2014. – №4. – С. 78–96.
3. Стратонников А.А., Меерович Г.А., Рябова А.В. и др. Использование спектроскопии обратного диффузионного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии // Квант. электроника. – 2006. – Т.36, № 12. – С. 1103-1110.
4. [Дрёмин В.В. Исследование влияния содержания меланина в коже на регистрируемые методом флуоресцентной спектроскопии параметры // Труды III Всероссийского конгресса молодых ученых. – \(Санкт-Петербург, апрель 2014 г.\). – СПб: Университет ИТМО, 2014. – С. 235-237.](#)
5. Оптическая биомедицинская диагностика: В 2 т. / Пер. с англ. под ред. В.В. Тучина. М.: Физматлит, 2007. Т.2. 368 с.
6. Krupatkin A.I., Sidorov V.V., Dremin V.V., Dunaev A.V., Novikova I.N., Zhu S.; Nabi G., Litvinova K.S., Baklanova A.P., Bakshaliev R.M., Ravcheev S.A. Evaluating adaptation options of microcirculatory-tissue systems based on the physiological link of nutritive blood flow and redox ratio // Proc. SPIE 9448, Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics, 944803.
7. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность (Руководство для врачей) // М.: Книжный дом «Либроком», 2013. – 496 с.
8. Жеребцова А.И. Оценка взаимосвязи параметров микроциркуляции крови и кожной температуры при окклюзионной пробе // Биотехносфера. – 2015. – №2. – С. 15-21.

Михаил Алексеевич Караваяев

ФГБОУ ВПО «Государственный университет-УНПК», г. Орёл, Россия
Студент кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация»
E-mail: sema295@yandex.ru

Дрёмин Виктор Владимирович

ФГБОУ ВПО «Государственный университет-УНПК», г. Орёл, Россия
Аспирант кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация», стажер-исследователь НОЦ «Биомедицинская инженерия»
E-mail: dremin_viktor@mail.ru

Жеребцова Ангелина Ивановна

ФГБОУ ВПО «Государственный университет-УНПК», г. Орёл, Россия
Аспирант кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация», стажер-исследователь НОЦ «Биомедицинская инженерия»
E-mail: angelina.zherebtsova@bmecenter.ru

Новикова Ирина Николаевна

ФГБОУ ВПО «Государственный университет-УНПК», г. Орёл, Россия
Аспирант кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация», инженер-исследователь НОЦ «Биомедицинская инженерия»
E-mail: irina.novikova@bmecenter.ru

Международная научно-техническая интернет-конференция
«Информационные системы и технологии»,
1 апреля-31 мая 2015 г.

Жарких Елена Валерьевна

ФГБОУ ВПО «Госунiversитет-УНПК», г. Орёл, Россия
Студентка кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация»
E-mail: loread@mail.ru

Жеребцов Евгений Андреевич

ФГБОУ ВПО «Госунiversитет-УНПК», г. Орёл, Россия
Доцент кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация», к.т.н., научный сотрудник НОЦ
«Биомедицинская инженерия»
E-mail: zherebzow@gmail.com

Дунаев Андрей Валерьевич

ФГБОУ ВПО «Госунiversитет-УНПК», г. Орёл, Россия
Доцент кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация», к.т.н., ведущий научный сотрудник
НОЦ «Биомедицинская инженерия»
E-mail: dunaev@bmecenter.ru