

УДК 535.37:681.2.08

Д.С. СЕМИН, В.В. ДРЁМИН, А.И. ЖЕРЕБЦОВА, И.Н. НОВИКОВА, Е.В. ЖАРКИХ,
Е.А. ЖЕРЕБЦОВ, А.В. ДУНАЕВ
D.S. SEMIN, V.V. DREMIN, A.I. ZHEREBTSOVA, I.N. NOVIKOVA, E.V. ZHARKIKH,
E.A. ZHEREBTSOV, A.V. DUNAEV

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КРОВИ НА СПЕКТР ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОЖИ ПРИ
ВОЗБУЖДЕНИИ СВЕТОМ ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 450 НМ
RESEARCH OF THE EFFECT OF BLOOD ON THE FLUORESCENCE SPECTRA OF
SKIN UNDER LIGHT EXCITATION WAVELENGTH OF 450 NM**

В данной статье рассмотрены проблемы обработки и интерпретации данных, полученных в результате флуоресцентной спектроскопии (ФС). В частности, авторами рассматривается проблема влияния оптических свойств крови на регистрируемый спектр флуоресценции кожи человека при возбуждении светом длиной волны 450 нм. Приведены примеры экспериментально полученных и теоретически рассчитанных спектров флуоресценции кожи. Полученные данные необходимо учитывать при интерпретации регистрируемых спектров в клинической практике, а также при обосновании медико-технических требований к приборам ФС.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, кровь, оптика крови, коэффициент поглощения, гемоглобин, биомаркеры.

This paper provided the basic problems of the processing and interpretation of data derived from fluorescence spectroscopy. In particular the authors raise the problem of the effect of blood on the fluorescence spectra of human skin under light excitation wavelength of 450 nm. It considers the examples of experimentally obtained and theoretically calculated fluorescence spectra. The findings should be considered when interpreting the spectra recorded in clinical practice, as well as the justification of medical and technical requirements for devices FS.

Keywords: fluorescence spectroscopy, blood, optics blood, absorption coefficient, hemoglobin, biomarkers.

В последние десятилетия широкое распространение получили различные методы неинвазивной оптической диагностики, в том числе и флуоресцентной спектроскопии (ФС). Данный диагностический метод основан на возбуждении флуорофоров, содержащихся в биотканях. Регистрация флуоресценции является надежным методом для дифференцирования доброкачественных и злокачественных опухолей различного происхождения [1], а также при исследованиях различных кардиососудистых заболеваний [2]. Данный диагностический метод имеет некоторые преимущества перед традиционными диагностическими технологиями. Как известно, поражения кожи, слизистых оболочек полости рта, желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы имеют ряд конкретных автофлуоресцентных спектров. Многие гнойные раны, ожоги и воспалительные процессы сопровождаются изменениями флуоресценции тканей, которые происходят из-за дисбаланса в накоплениях природных флуорофоров [3]. Также, флуоресцентная спектроскопия позволяет количественно определить индексы эритемы и пигментации кожи, оценивать изменение цвета кожи, проводить диагностику состояния кожного покрова в процессе лечения, изучать биофизику кожи [4].

Вместе с тем, на сегодняшний день метод ФС имеет ряд нерешенных проблем. Так, многие биомаркеры характеризуются близкими или перекрывающимися областями поглощения и флуоресценции, в результате выходящее из ткани излучение имеет сложный спектральный состав. Сигнал представляет собой суперпозицию спектров флуоресценции разных природных компонент биоткани, таких как коллаген, эластин, никотинамид (NADH) и т.д., имеющих разные интенсивности флуоресценции на разных длинах волн (рис.1) [5]. В этой связи существует неопределенность как с длиной волны возбуждения для каждого

конкретного биомаркера, так и с длиной волны флуоресценции, что сегодня является одной из основных проблем метода ФС. [6]

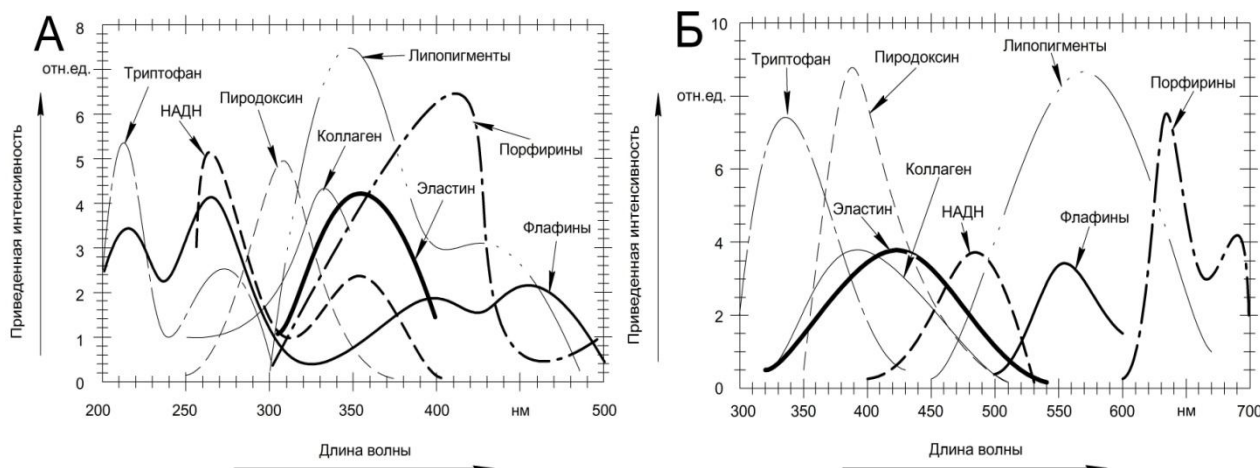


Рисунок 1 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) некоторых кожных биомаркеров

Как известно, кожа человека (дерма) пронизана артериолами, венулами и капиллярами. Следовательно, кровь вносит свою составляющую в регистрируемый спектр флуоресценции, поглощая зондирующее излучение (рис.2) [7]. Более того, в зависимости от процента оксигемоглобина (HbO_2) в общем объеме гемоглобина, содержащегося в крови, кровь имеет различные спектры поглощения.

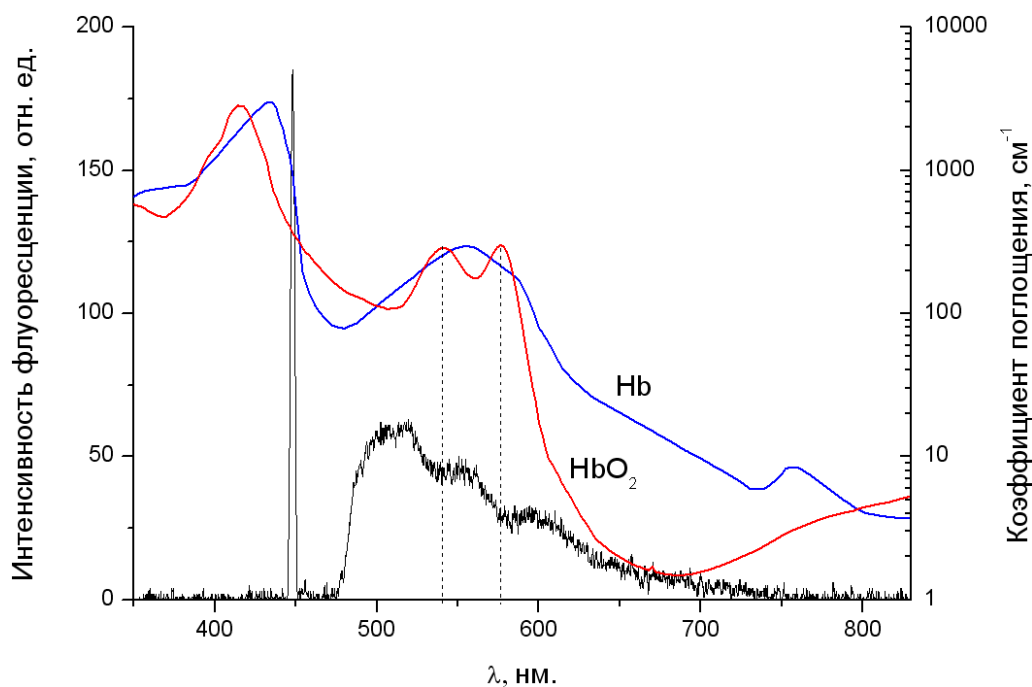


Рисунок 2 – Спектры поглощения крови (гемоглобина (Hb) и оксигемоглобина (HbO_2)) и экспериментально зарегистрированный спектр флуоресценции кожи при возбуждении светом длиной волны 450 нм

Таким образом, очевидно, что уровень кровенаполнения зоны исследования вносит вклад в спектр флуоресценции и не позволяет в полной мере оценить содержание какого-либо биомаркера в коже. В результате возникает необходимость корректировки спектра флуоресценции с целью исключения данного влияния, а также более точной калибровки приборов ФС.

Таким образом, становится ясно, что метод флуоресцентной спектроскопии имеет ряд нерешенных проблем, одной из которых является оценка и учёт влияния различных хромофоров (в том числе гемоглобина и оксигемоглобина) на регистрируемые спектры флуоресценции. Целью данной работы явилось выявить и проанализировать влияние крови на регистрируемые спектры флуоресценции кожи человека при возбуждении светом длиной волны 450 нм.

Для экспериментальных исследований применяли многофункциональный лазерный неинвазивный диагностический комплекс (МЛНДК) «ЛАКК-М» (ООО НПП «ЛАЗМА», г. Москва) [8]. Данный МЛНДК позволяет проводить исследования с помощью нескольких различных диагностических методов: лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ), оптическая тканевая оксиметрия (ОТО), пульсоксиметрия и ФС. Возбуждение эндогенной флуоресценции осуществлялось на длине волны 450 нм.

Экспериментальные исследования проводились с участием 19 условно-здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 22 лет. Исследования проводились на подушечке безымянного пальца правой руки. Измерения проводились преимущественно в первой половине дня. Все добровольцы находились в состоянии покоя. Оптическое волокно устанавливалось в одно и то же место, без оказания на него какого-либо давления, отсутствовали засветки и иные факторы, которые могли бы повлиять на точность измерений. Спектры флуоресценции регистрировались во время применения артериальной плечевой окклюзии (окклюзионная проба) с давлением в манжете 200-220 мм рт.ст. (3 мин) а также в течении 3-х мин до и после окклюзионной пробы. Всего было зарегистрировано 298 спектров.

На основе закона Бугера-Ламберта-Бера были экспериментально и теоретически определены коэффициенты пропускания (T). В общем виде упомянутый закон выглядит так:

$$I = I_0 \cdot T, \quad (1)$$

где I_0 – интенсивность входящего пучка света;

I – интенсивность, после прохождения светом среды;

T – коэффициент пропускания.

Экспериментально данный коэффициент был рассчитан делением спектра флуоресценции до окклюзии на спектр флуоресценции во время окклюзии. Во время окклюзии кровенаполнение исследуемой области существенно уменьшалось, а, следовательно, мы исключали влияние данного ослабления на интенсивность регистрируемой флуоресценции. Теоретический коэффициент пропускания рассчитывался по следующей формуле:

$$T = 10^{-I[C(HbO_2) \cdot 0.0054 \cdot \varepsilon(HbO_2) + (1 - C(HbO_2)) \cdot 0.0054 \cdot \varepsilon(Hb)]}, \quad (2)$$

где $C(HbO_2)$ – процент оксигемоглобина;
 $\varepsilon(Hb)$ и $\varepsilon(HbO_2)$ – коэффициенты экстинкции;
 l – глубина зондирующего излучения.

При расчете теоретического значения коэффициента пропускания такие параметры как глубина зондирующего излучения и процент гемоглобина, связанного с кислородом, подбирались эмпирически для каждого эксперимента. Таким образом, добивались максимального сходства теоретически рассчитанного коэффициента пропускания с экспериментальным значением (таблица 1).

Спектр флуоресценции, зарегистрированный во время окклюзионного теста (рис. 3 А), был умножен на теоретически рассчитанный коэффициент пропускания. Таким образом, были получены идентичные теоретически рассчитанный (рис. 3 Б) и экспериментальный спектры флуоресценции (рис. 3 В), на которых присутствуют два характерных провала на длинах волн 540 и 580 нм.

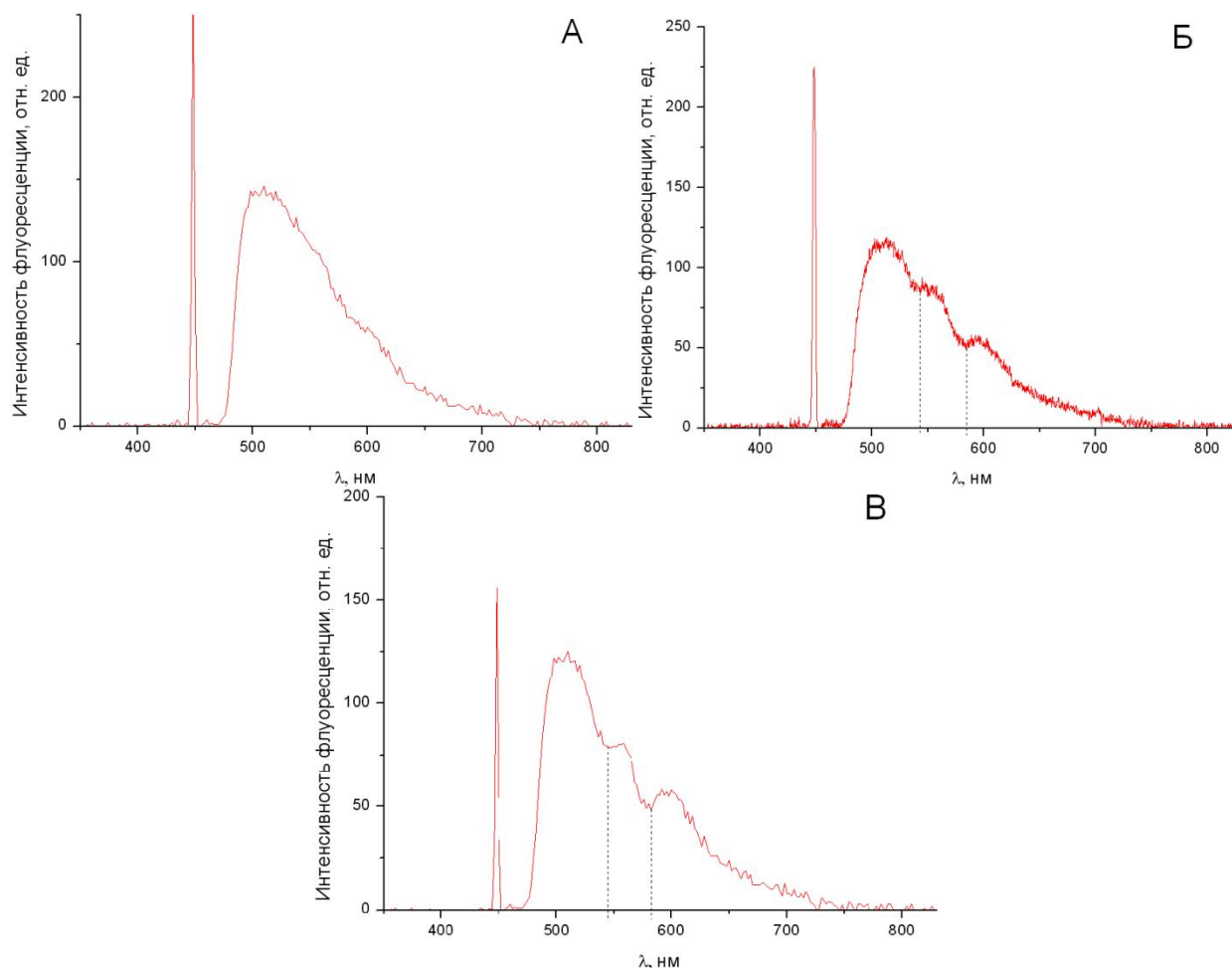


Рисунок 3 – Спектр флуоресценции во время окклюзии (А), экспериментальный (Б) и теоретически рассчитанный (В) спектры флуоресценции при нормальном кровенаполнении зоны исследования

Таблица 1 – Наиболее типовые результаты построения экспериментальных спектров флуоресценции

Экспериментальный спектр			Теоретический спектр			Глубина зондирования l , мкм	HbO ₂ , %
Пик флуоресценции FAD, отн. ед.	$\lambda(540)$, отн. ед.	$\lambda(580)$, отн. ед.	Пик флуоресценции FAD, отн. ед.	$\lambda(540)$, отн. ед.	$\lambda(580)$, отн. ед.		
129,0	101,0	62,0	100,0	71,4	44,1	300	0,97
168,0	150,0	106,0	247,8	193,1	133,3	450	0,89
132,0	99,0	59,0	115,0	90,0	53,2	400	0,94
119,0	86,0	56,0	125,3	80,3	51,3	600	0,92
192,0	162,0	110,0	241,4	193,0	125,3	500	0,8

При расчете теоретических спектров флуоресценции такие параметры как процент оксигемоглобина и глубина зондирующего излучения подбирались эмпирически для каждого испытуемого. Следует отметить, что полного сходства теоретического и экспериментального спектра не всегда удавалось, что может быть вызвано индивидуальными особенностями кожного покрова каждого человека в отдельности.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кровь оказывает существенное влияние на регистрируемый спектр флуоресценции кожи при возбуждении длиной волны 450 нм, которое необходимо учитывать при обосновании медико-технических требований к приборам ФС. Также следует отметить, что анализ данных регистрируемых спектров возможно даст дополнительную информацию о степени оксигенации крови в зондируемом объеме кожи, что может расширить диагностическую ценность метода ФС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rafailov I., Palmer S., Litvinova K., Dremine V., Dunaev A., Nabi G. A novel excitation-emission wavelength model to facilitate the diagnosis of urinary bladder diseases // Proc. SPIE 9303, Photonic Therapeutics and Diagnostics XI, 93030W.
2. Akbar N, Sokolovski S, Dunaev A, Belch JF, Rafailov E, Khan F. In vivo noninvasive measurement of skin autofluorescence biomarkers relate to cardiovascular disease in mice. J Microscopy 2014;255:42–8.
3. Dunaev A., Dremine V., Zharebtsov E., Rafailov I., Litvinova K., Palmer S., Stewart N., Sokolovski S., Rafailov E. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow. J Medical Engineering and Physics 2015;37:574-83.
4. Долгушина Л.В., Жеребцов Е.А., Дунаев А.В. Современные тенденции развития многофункциональных комплексов: оптическая когерентная томография и лазерная флуоресцентная диагностика // ИСиТ- 2013. – Орел: Госуниверситет-УНПК, 2013.
5. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Kluwer Academic Publishers; 2006.

6. Дрёмин В.В., Дунаев А.В., Жеребцов Е.А. Вопросы метрологического обеспечения лазерной флуоресцентной диагностики // ИСиТ- 2013. – Орел: Госуниверситет-УНПК, 2013.

7. Tuchin, V.V. Handbook of optical biomedical diagnostics. Washington: SPIE Press, Bellingham; 2002.

8. Дунаев А.В., Дрёмин В.В., Жеребцов Е.А., Палмер С.Г., Соколовский С.Г., Рафаилов Э.У. Анализ индивидуальной вариабельности параметров в лазерной флуоресцентной диагностике // Биотехносфера, №2, 2013 – С. 39-47.

Дмитрий Сергеевич Семин

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

Дрёмин Виктор Владимирович

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

Жарких Елена Валерьевна

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

Жеребцов Евгений Андреевич

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