

Столбов Александр Николаевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА УСТРОЙСТВА ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ МЕТОДОМ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ**

Направление 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии»

Направленность «Фотоника и электроника в
медико-биологической практике»

АВТОРЕФЕРАТ

магистерской выпускной квалификационной работы

Орёл, 2022 г.

Работа выполнена на кафедре «Приборостроение, метрология и сертификация»
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

Научный руководитель:

кандидат технических наук, доцент,
с.н.с. НТЦ биомедицинской фотоники
Дрёмин Виктор Владимирович

Официальный рецензент:

кандидат технических наук,
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный
исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики»,
старший преподаватель,
факультет прикладной оптики, (г. Санкт-Петербург)
Маргарянц Никита Борисович

Защита состоится 8 июля 2022 г. в 10 часов на заседании Государственной аттеста-
ционной комиссии по адресу: 302020, РФ, г. Орёл, Наугорское шоссе, 29, ауд. 308л.

С диссертацией можно ознакомиться на кафедре ПМиС ФГБОУ ВО «Орловский гос-
ударственный университет имени И.С.Тургенева».

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания остаются второй ведущей причиной смертности во всем мире. Примерно 18,1 миллионов новых случаев рака было выявлено в 2018 году и 9,6 миллиона человек умерли от рака.

Хирургия – это основной метод лечения многих злокачественных новообразований. Хотя в области хирургии в последнее время произошли огромные успехи во внедрении технологий визуализации опухолей и робототехники, остаются проблемы разработки доступных, чувствительных и имеющих высокую разрешающую способность методов диагностики.

Степень удаления рака тесно связана с прогнозом. Однако в настоящее время возможность резекции опухоли зависит от визуальной локализации опухоли или способности ее пальпировать. Первое ограничено низким контрастом между опухолями и фоновой тканью, и многие небольшие опухоли могут быть не диагностированы. Более того, определение границ опухоли часто должно проводиться вслепую с последующим гистологическим анализом образцов.

Использование в медицине методов флуоресцентной визуализации открывает новые возможности выявления метастазов и определения края резекции в режиме реального времени во время проведения операций. Таким образом, на сегодняшний день актуальными задачами диагностики злокачественных новообразований биологических тканей являются поиск и внедрение новых диагностических технологий, базирующихся на использовании различных оптических технологий, в частности на регистрации флуоресцентного излучения.

Цель и задачи исследований: Целью выпускной квалификационной работы является повышение качества диагностики злокачественных новообразований за счет разработки устройства, основанного на регистрации флуоресцентного излучения биологических тканей.

Задачи выпускной квалификационной работы:

1) выполнить анализ научно-технической литературы по разработке систем и технологий флуоресцентной визуализации;

2) разработать структурную и принципиальную схемы устройства устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации;

3) разработать корпус устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации;

4) составить методику применения устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации;

5) провести научно-исследовательскую работу по реализации экспериментальной системы флуоресцентной визуализации, провести экспериментальные исследования;

б) разработать методику контроля технического состояния и составить технологический регламент технического обслуживания устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации.

Объектом исследования является устройство для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации.

Предметом исследования является флуоресценция биологических тканей.

Методы исследования. При проведении исследования применялись экспериментальные и аналитические методы, основы математического анализа и статистики, а также методы обработки изображения.

Математические расчеты и обработка экспериментальных данных проводились по унифицированным, усовершенствованным и оригинальным алгоритмам в Microsoft Excel, MathCAD, MATLAB.

Научная новизна заключается в том, что при решении поставленных задач исследования предложены:

1) принцип построения устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации, отличающийся блоком контроля температуры ПЗС матрицы при помощи канала измерения температуры и

наличия элемента Пельтье, который обеспечивает защиту от перегрева ПЗС матрицы и высокое значение отношения сигнал/шум;

2) метод диагностики злокачественных новообразований при проведении хирургических операций, основанный на технологии визуализации эндогенной флуоресценции, позволяющий выявить метастазы и определить края резекции в режиме реального времени;

3) новые знания, основанные на проведённых экспериментальных исследованиях, о зависимости изменения интенсивности флуоресценции от времени воздействия возбуждающего излучения, от концентрации флуорофоров, а также о зависимости концентрации флуорофоров кожных покровов от анатомических особенностей области исследования.

Практическая значимость:

1) предложен новый метод диагностики злокачественных новообразований в режиме реального времени с помощью устройства флуоресцентной визуализации;

2) демонстрация возможности проведения хирургических операций с использованием устройства флуоресцентной визуализации.

Личный вклад автора заключается в проведении обзора актуальных научных трудов, разработке экспериментальной установки флуоресцентной визуализации, планировании и проведении экспериментальных исследований, разработке метода осуществления метрологического контроля и организации процессов постпродажного обслуживания устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации.

Положения, выносимые на защиту:

1) метод диагностики злокачественных новообразований, основанный на регистрации флуоресценции биологических тканей;

2) устройство для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации с возможностью контроля температуры ПЗС матрицы;

3) методика КТС канала измерения температуры ПЗС матрицы, обеспечивающая защиту от перегрева ПЗС матрицы и высокие значения отношения сигнал/шум;

4) технологический регламент технического обслуживания устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации, устанавливающий минимально необходимые требования к безопасности в течении всего периода эксплуатации.

Апробация результатов. Результаты исследований были представлены на XI-м всероссийском конгрессе молодых учёных (Санкт-Петербург, 2022); Межрегиональной научно-практической конференции имени академика Е.В. Шмидта «Инженерные решения и компьютерные технологии в биологии и медицине» (Карачев, 2021), Неделя науки – 2021 (Орёл, 2021).

Публикации. По теме магистерской выпускной квалификационной работы опубликован 2 тезиса доклада.

Структура и объём выпускной квалификационной работы:

Работа состоит из введения, трёх глав, заключения, списка использованных источников, включающего 52 наименования, 12 приложений и изложена на 170 страницах машинописного текста, содержит 41 рисунок, 22 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении изложена актуальность темы выпускной квалификационной работы, сформулированы цели и задачи исследования, а также научная новизна и положения, выносимые на защиту и описана практическая значимость работы.

В первой главе был проведён анализ состояния проблемы, приводится медико-биологическое описание исследования и медико-технические требования, а также обзор и краткое описание аналогов разрабатываемого устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации.

Одним из наиболее распространенных тяжелых заболеваний являются злокачественные новообразования. В целом, по статистическим данным Всемирной организации здравоохранения онкологические заболевания являются второй ведущей причиной смерти от заболеваний в мире.

Хирургия под контролем флуоресценции в настоящее время используется для множества хирургических ситуаций, включая картирование лимфатических узлов, идентификацию опухолей, лимфографию, ангиографию и анатомическую визуализацию во время операции. Важно отметить, что флуоресцентную визуализацию можно использовать во время процедуры без прерывания рабочего процесса хирурга. Это интегрирует флуоресцентную визуализацию в хирургию, создавая многочисленные возможности для ее использования.

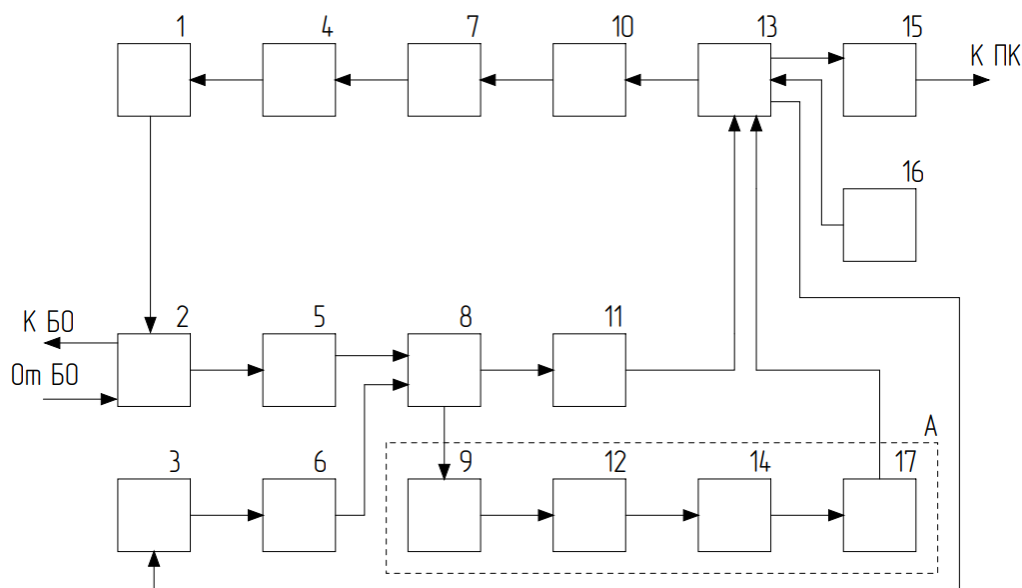
Изменения, происходящие в состоянии клеток и тканей во время физиологических и патологических процессов, приводят к модификации количества и распределения эндогенных флуорофоров и химико-физических свойств их микроокружения. Наиболее выражено собственно флуоресцирующими веществами в биологических системах являются NADH, флавины, коллаген и эластин, триптофан, тирозин, порфирин, липофусцины и меланин.

При развитии патологических процессов в клетках меняется относительное содержание ряда естественных флуорофоров. Их повышенное накоплением в тканях может свидетельствовать о развитии злокачественных новообразований.

Исходя из медико-технических требований разработано устройство для диагностики биологических тканей. Была предложена структурная схема устройства, включающая канал измерения температуры ПЗС матрицы (рисунок 1).

На основании данной структурной схемы разработана схема электрическая принципиальная устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации, составлено математическое описание канала измерения температуры матрицы, произведён расчёт точности канала

измерения, а также произведён расчёт надёжности электронного блока устройства. Была описана конструкция разрабатываемого устройства.



1 – источник излучения; 2 – дихроичный фильтр; 3 – токовый ключ; 4 – драйвер источника излучения; 5 – оптический фильтр; 6 – элемент Пельтье; 7 – потенциометр; 8 – ПЗС матрица; 9 – терморезистор; 10 – ЦАП; 11 – сигнальный процессор; 12 – ПСН; 13 – микроконтроллер; 14 – фильтр низких частот; 15 – интерфейс связи с ПК; 16 – блок ручного управления; 17 – АЦП; А – канал измерения температуры матрицы

Рисунок 1 – Структурная схема устройства флуоресцентной визуализации

Во второй главе представлены экспериментальные исследования. Исследования можно разделить на несколько этапов. Первый заключаются в изучении флуоресценции фантомов, отражающих изменение изучаемых свойств живых организмов. Второй этап направлен на неинвазивные испытания технологий на доступных биообъектах с целью оптимизации конструктивных особенностей объекта разработки и методологии проведения исследований. Третий этап подразумевает в исследования, проводимые на лабораторных животных с целью апробации разрабатываемой системы.

Оптические характеристики фантома изучались с помощью экспериментальной установки флуоресцентной визуализации и спектроскопии, показанной на рисунке 2.

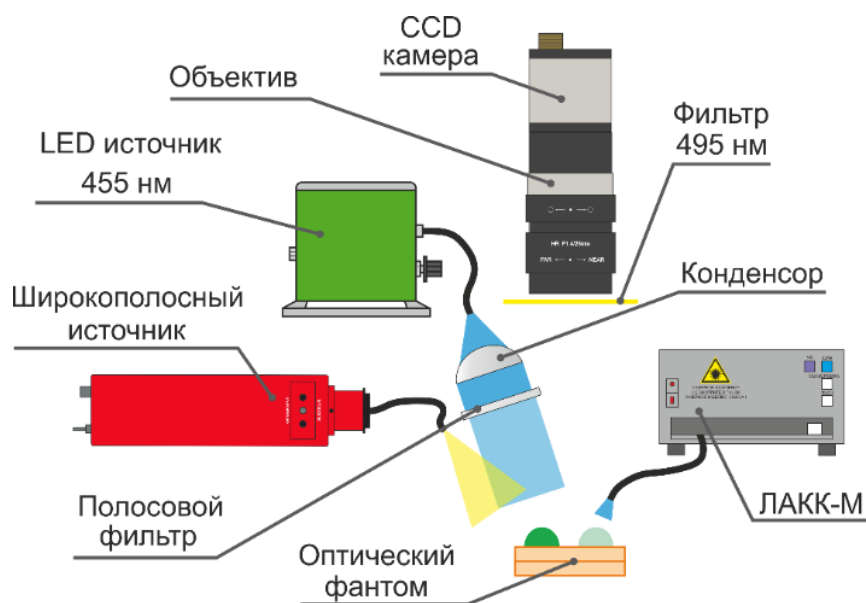


Рисунок 2 – Схема экспериментальной установки

Методика исследования включает попеременную регистрацию флуоресценции ПЗС камерой и спектрометром. Капли одинакового объема (20 мкл) с различными концентрациями рибофлавина наносили на желатиновые листы с помощью микропипетки. Фантом располагался на нефлуоресцирующей неотражающей поверхности.

На первом этапе исследования перед матрицей камеры устанавливался фильтр с длиной волны 495 нм и были записаны флуоресцентные изображения (измерения повторяли 3 раза). Затем отрезающий фильтр убирался и изображение оптического фантома записывалось в белом свете.

На втором этапе регистрировали спектры флуоресценции каждой из капель рибофлавина (измерения повторяли 3 раза). Полученные результаты были обработаны на ПК с использованием программного обеспечения в среде MATLAB.

Используя канал флуоресцентной визуализации, было получено монохромное изображение фантома с 16-битным разрешением, показанное на рисунке 3. Затем изображение было контрастировано псевдоцветом со шкалой интенсивности от 0 до 16000.

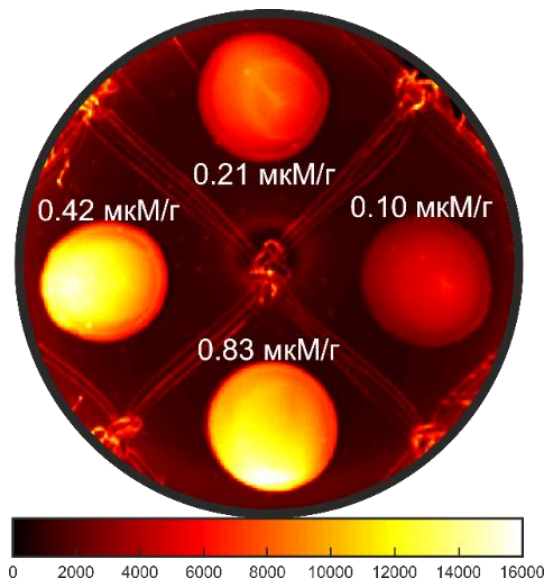


Рисунок 3 – Флуоресцентное изображение оптического фантома

Значения интенсивности флуоресценции, полученные методом флуоресцентной визуализации, сравнивались со значениями, полученными методом флуоресцентной спектроскопии.

При помощи установки флуоресцентной визуализации было выявлено, что интенсивность флуоресценции снижается пропорционально уменьшению концентрации рибофлавина, что подтверждается флуоресцентной спектроскопией. Полученные экспериментальные данные указывают на чувствительность собранного блока флуоресцентной визуализации к изменениям концентрации рибофлавина. Использование такого оптического фантома позволит провести валидацию устройств флуоресцентной визуализации для повышения качества технологии для дальнейших исследований в клинических условиях.

Для изучения кожных покровов использовалась экспериментальная установка гиперспектральной флуоресцентной визуализации, схема которой представлена на рисунке 4.



- 1 – Гиперспектральная камера Specim IQ;
 2 – Длинноволновый светофильтр 500 нм FELH0500; 3 – Дихроичный фильтр MD480; 4 –
 Исследуемый объект; 5 – Светодиодный источник излучения 450 нм M450LP1; 6 – Поло-
 совой фильтр MF445-45

Рисунок 4 – Схема экспериментальной установки гиперспектральной флуоресцентной визуализации.

Оптическая схема представляет собой стандартную схему микроскопии отраженного света. Ключевым элементом для подобных оптических схем является вертикальный осветитель. Основным компонентом вертикального осветителя при флуоресцентных исследованиях является дихроичное зеркало (фильтр). Это зеркало отклоняет возбуждающее излучение, идущее из горизонтального осветителя, на 90° в вертикальную оптическую систему формирования изображения. Кроме того, расположенное под углом 45° к оптическим осям осветителя и канала формирования изображения дихроичное зеркало пропускает выходящее из объектива флуоресцентное излучение.

Исследования проводились на условно здоровых добровольцах мужского и женского пола. В качестве исследуемых областей были выбраны кожа среднего пальца правой руки, ладони правой руки и предплечья правой руки.

По результатам исследований были получены гиперспектральные флуоресцентные изображения кожных покровов в области среднего пальца правой руки, ладони правой руки и предплечья правой руки и соответствующие спектральные кривые областей интереса, представленные на рисунках 5. Обработка гиперспектральных изображений проводилась с помощью разработанного программного обеспечения в среде MATLAB.

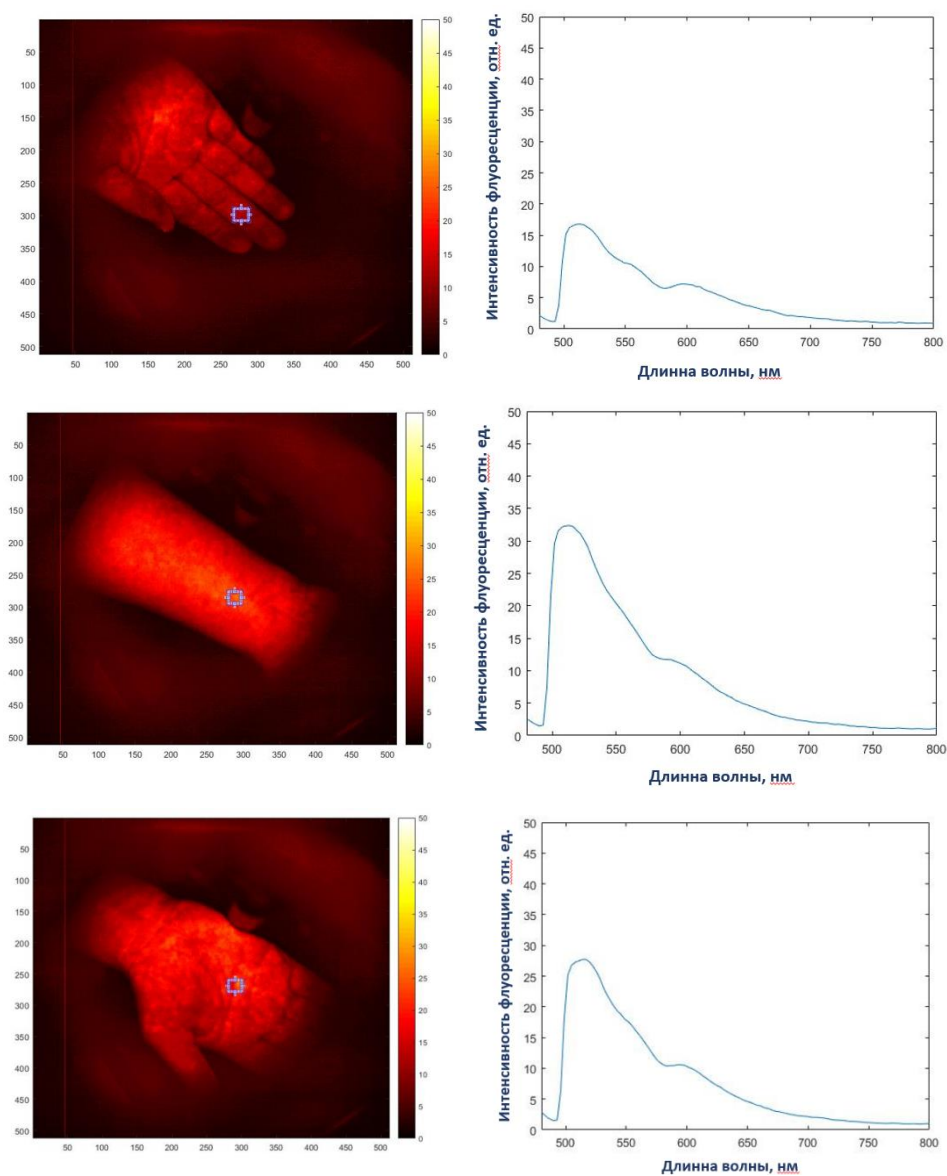


Рисунок 5 – Гиперспектральные флуоресцентные изображения и спектральные кривые кожных покровов

Концентрация флуорофороф (ФАД, коллагена и др.) в коже пальцев рук оказалась ниже, чем в коже ладони и предплечья, о чём свидетельствует различия в интенсивности флуоресценции на графиках спектральных кривых. Исходя из результатов проведённых исследований можно сделать вывод, что концентрация флуорофоров кожных покровов зависит от анатомических особенностей испытуемого, а интенсивность флуоресценции кожи изменяется пропорционально изменения концентрации флуорофоров.

Исследования влияния эффекта фотобликинга (фотообесцвечивания) проводились на условно здоровом добровольце мужского пола. В качестве исследуемой области была выбрана кожа ладони правой руки.

По результатам исследований были получены гиперспектральные флуоресцентные изображения кожных покровов в области ладони правой руки соответствующие спектральные кривые областей интереса и приведены на рисунке 6.

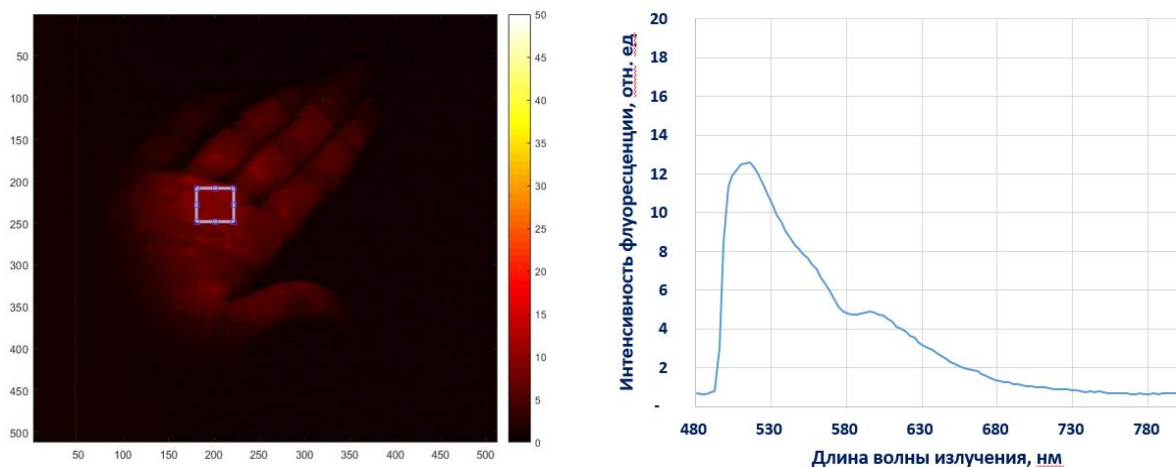


Рисунок 6 – Гиперспектральные флуоресцентные изображения и спектральные кривые кожных покровов ладони

Сравнение интенсивности флуоресценции в зависимости от времени проведения исследования приведено на рисунке 7. Спад интенсивности флуоресценции флуорофороф (ФАД, коллагена и др.) в коже ладони обусловлен эффектом фотобликинга.

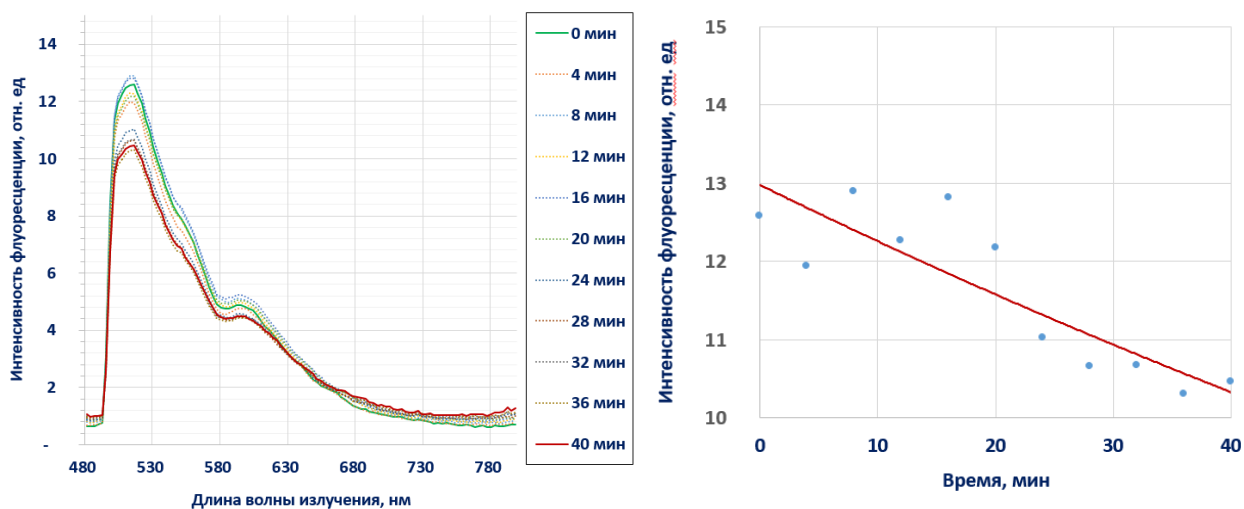


Рисунок 7 – График изменения интенсивности излучения в зависимости от времени проведения исследования

В результате исследования было выявлено снижение интенсивность флуоресценции при длительном воздействии возбуждающего излучения. На 24 минуте эксперимента был зафиксирован значительный спад интенсивности флуоресценции на 15 % от максимальной интенсивности. По завершению эксперимента, длительностью 40 минут, спад интенсивности флуоресценции составил 20 % от максимального уровня интенсивности флуоресценции. Данное изменение интенсивности флуоресценции флуорофороф (ФАД, коллагена и др.) в коже ладони обусловлено эффектом фотобличинга.

Проведенные исследования демонстрируют, что при длительном воздействии возбуждающего флуоресценцию излучения наблюдается эффект фотобличинга, который может привести к неправильной интерпретации результатов диагностики. Во избежание данного влияния следует минимизировать воздействие возбуждающего излучения.

Далее были проведены исследования опухолей печени мыши с использованием системы флуоресцентной визуализации. Экспериментальные исследования были проведены в соответствии с разработанным протоколом исследования. Исследования проводились на лабораторных мышах линии BDF

(C57Bl6xDBA) с введённым 100 мкл (50 тыс. клеток штамма ГЦР мыши H33) в правую часть средней доли печени.

Как результат, были получены флуоресцентные изображения области печени мыши с злокачественным новообразованием, изображенные на рисунке 8.

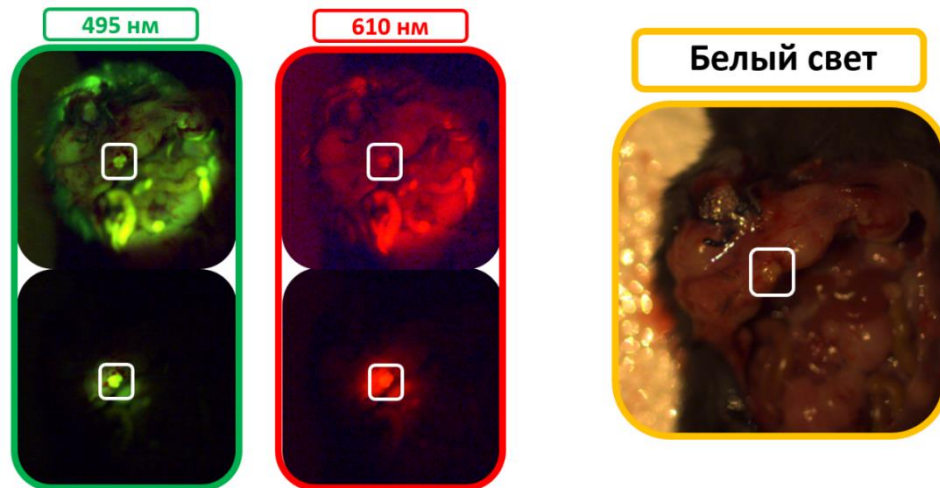


Рисунок 8 – Флуоресцентная визуализация раковой опухоли

Выделенная область соответствует флуоресценции опухоли и окружающих ее тканей при использовании различных фильтров. Так, при использовании фильтра на 495 нм возможна визуализация флуоресценции коферментов ФАД/НАДН, а при использовании фильтра на 610 нм происходит выделение флуоресценции порфиринов.

Проведенные исследования демонстрируют возможности проведения хирургических операций с использованием экспериментальной установки флуоресцентной визуализации для получения информации о наличии злокачественных клеток в крае резекции органа при опухолевом поражении в режиме реального времени.

В третьей главе приведено метрологическое обеспечение разрабатываемого устройства с указанием локальной поверочной схемы и методикой кон-

троля технического состояния. Также был составлен технологический регламент технического обслуживания устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации.

В заключении приведены основные результаты работы и перспективы дальнейшей разработки.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1) анализ состояния проблемы показал, что существующие методы диагностики злокачественных новообразований занимает длительное время, а результат напрямую зависит от квалификации врача и сопровождается вероятностью получения ложноотрицательного результата;

2) предложен принцип получения в реальном времени диагностической информации основан на регистрации флуоресценции раковых опухолей, возникающей из-за изменения концентрации эндогенных флуорофоров в тканях подверженных патологическим процессам;

3) в ходе проведённых экспериментальных исследований и анализа полученных данных была продемонстрирована чувствительность установки флуоресцентной визуализации, были учтены анатомические особенности испытуемых и физические явления возникающие в процессе исследования методом флуоресцентной визуализации, были проведены исследования опухолевых клеток мыши методом флуоресцентной визуализации, которые показали эффективность метода флуоресцентной визуализации;

4) предложен принцип построения устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации;

5) спроектировано устройство для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации;

6) разработана методика контроля технического состояния и составлен технологический регламент технического обслуживания устройства для диагностики биологических тканей методом флуоресцентной визуализации.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1) Столбов А.Н., Дрёмин В.В. Влияние эффекта фотобличинга при использовании метода гиперспектральной флуоресцентной визуализации // Сборник тезисов докладов конгресса молодых ученых. Электронное издание. – СПб: Университет ИТМО, 2022.

2) Столбов А.Н., Дрёмин В.В. Гиперспектральная флуоресцентная визуализация кожных покровов человека // Сборник научных трудов I международной научно-практической конференции «Инженерные решения и цифровые технологии в биологии, медицине и приборостроении» – Орёл: ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», 2021.