

УДК 535.37:681.2.08

В.В. ДРЁМИН, Е.А. ЖЕРЕБЦОВ, А.В. ДУНАЕВ
V.V. DREMIN, E.A. ZHEREBTSOV, A.V. DUNAEV

ВОПРОСЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЛАЗЕРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ

QUESTIONS OF METROLOGICAL ASSURANCE OF LASER FLUORESCENCE DIAGNOSTICS

В данной работе рассмотрены основные проблемы метрологического обеспечения в методе лазерной флуоресцентной диагностики. Приведены примеры зарегистрированных спектров флуоресценции с тестовых объектов исследования (включая биомаркеры) на двух приборах ЛФД одной серии. Обоснована актуальность разработки методики метрологического контроля состояния для приборов ЛФД.

Ключевые слова: лазерная флуоресцентная диагностика, метрологическое обеспечение, метрологический контроль состояния, калибровка, биомаркеры

This paper provides the basic problems of the metrological assurance in the method of laser fluorescence di-agnostics. It considers the examples of fluorescence spectra recorded with some objects (including biomarkers) on two different LFD devices. Authors substantiate to develop methods of metrological status control for LFD devices.

Keywords: laser fluorescence diagnostics, metrological support, metrological status control, calibration, biomarkers

К настоящему времени в области лазерной медицинской техники сложилась неоднозначная ситуация. Она характеризуется с одной стороны широким распространением в медицинской практике высокоэффективных лазерных технологий и соответствующего аппаратного обеспечения, а, с другой стороны, недостаточным развитием и несовершенством необходимого метрологического обеспечения и обслуживания указанной медицинской аппаратуры [1]. В настоящий момент не существует никаких документальных стандартов в области неинвазивной спектроскопии, развитие справочных материалов в данной области также находится на недостаточном уровне. В результате сложившейся ситуации разработанные передовые технологии оптической неинвазивной диагностики (ОНД) широкого круга заболеваний используются с меньшей эффективностью.

К одному из таких направлений относится флуоресцентная спектроскопия, в частности, лазерная флуоресцентная диагностика (ЛФД). Метод базируется на регистрации спектров флуоресценции эндогенных биомаркеров. Известно, что новообразования кожи, слизистых оболочек полости рта, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы имеют ряд специфических аутофлуоресцентных спектров, которые могут быть дополнительным диагностическим параметром для врача. Данный метод также применяется в качестве инструмента для мониторинга динамики процессов, происходящих в тканях, например, при лучевой терапии [2, 3, 4]. Вместе с тем, на сегодняшний день метод ЛФД 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 [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 ЛФД. Кроме того, флуоресценция тканей – сложный механизм, зависящий также от температуры, топологической неоднородности, различия свойств каждого исследуемого образца и т.д. Поэтому на достоверность результатов ЛФД может также влиять степень наличия априорной информации о рассеивающих и поглощающих свойствах конкретного места исследования у конкретного пациента [6].

Кроме того, отсутствие образцовых и аттестованных средств измерения (СИ) в области ОНД не позволяет сегодня в полной мере грамотно выполнить все классические требования к проведению подобных исследований, особенно требования по равноточности и однородности проводимых измерений в разных сериях [5, 7].

Следует также подчеркнуть, что кроме физических имеется ряд технических источников погрешностей данного метода. Так, при использовании лазерного флуоресцентного спектроанализатора незначительные изменения параметров лазерного излучения, приемных устройств и отдельных узлов оптической системы могут заметно влиять на форму спектральных кривых флуоресценции, а, следовательно, и на конечный диагностический результат. Изменение параметров может быть вызвано приборными погрешностями, которые представлены как нестабильностью и качеством источника возбуждающего излучения, так и погрешностями фотоприемной части (светофильтры, дифракционная решетка, ПЗС-матрица и т.д.), загрязнением рабочего конца волоконного световода и т.п. [8].

Для оценки работоспособности 2-х идентичных ЛФД-каналов проведены тестовые эксперименты с использованием многофункциональных лазерных неинвазивных диагностических комплексов (МЛНДК) «ЛАКК-М» [9]. Измерения проводились на разных биомаркерах, таких как флавин (FAD) и порфирин в физическом растворе (PBS), коллаген исследовался в чешуе рыбы. Кювета с биомаркером помещалась на фторопластовый эталон отражения (рис. 1), для флавина и порфирина использовались концентрации 1 и 0.25 мг соответственно, глубина погружения волокон в кювету была одинаковой (около 5 мм).

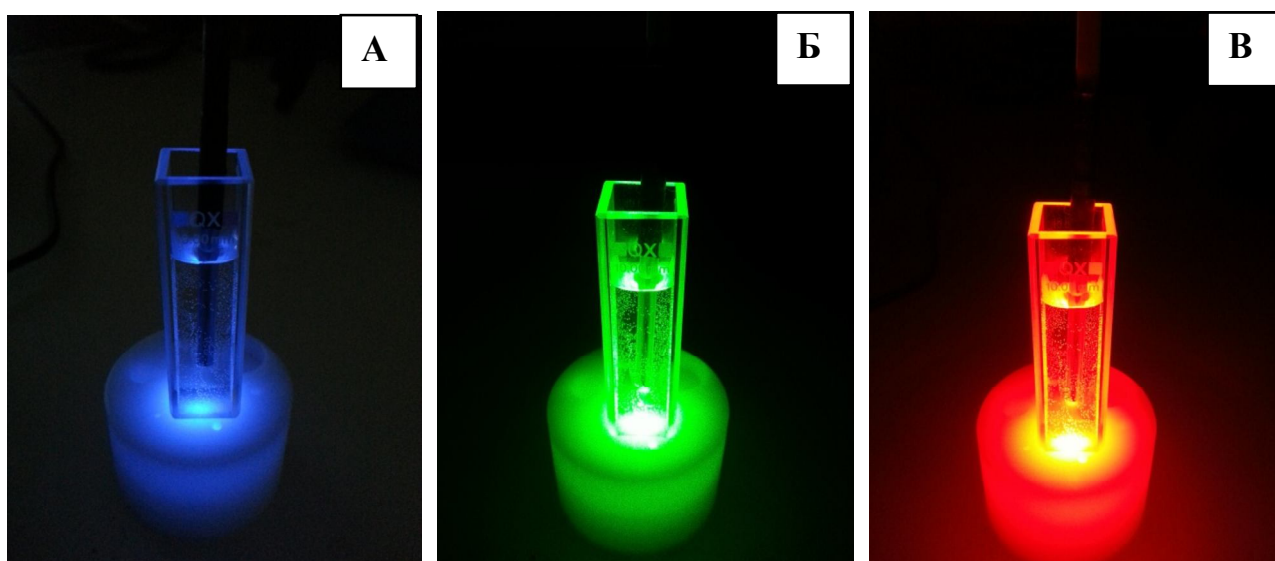
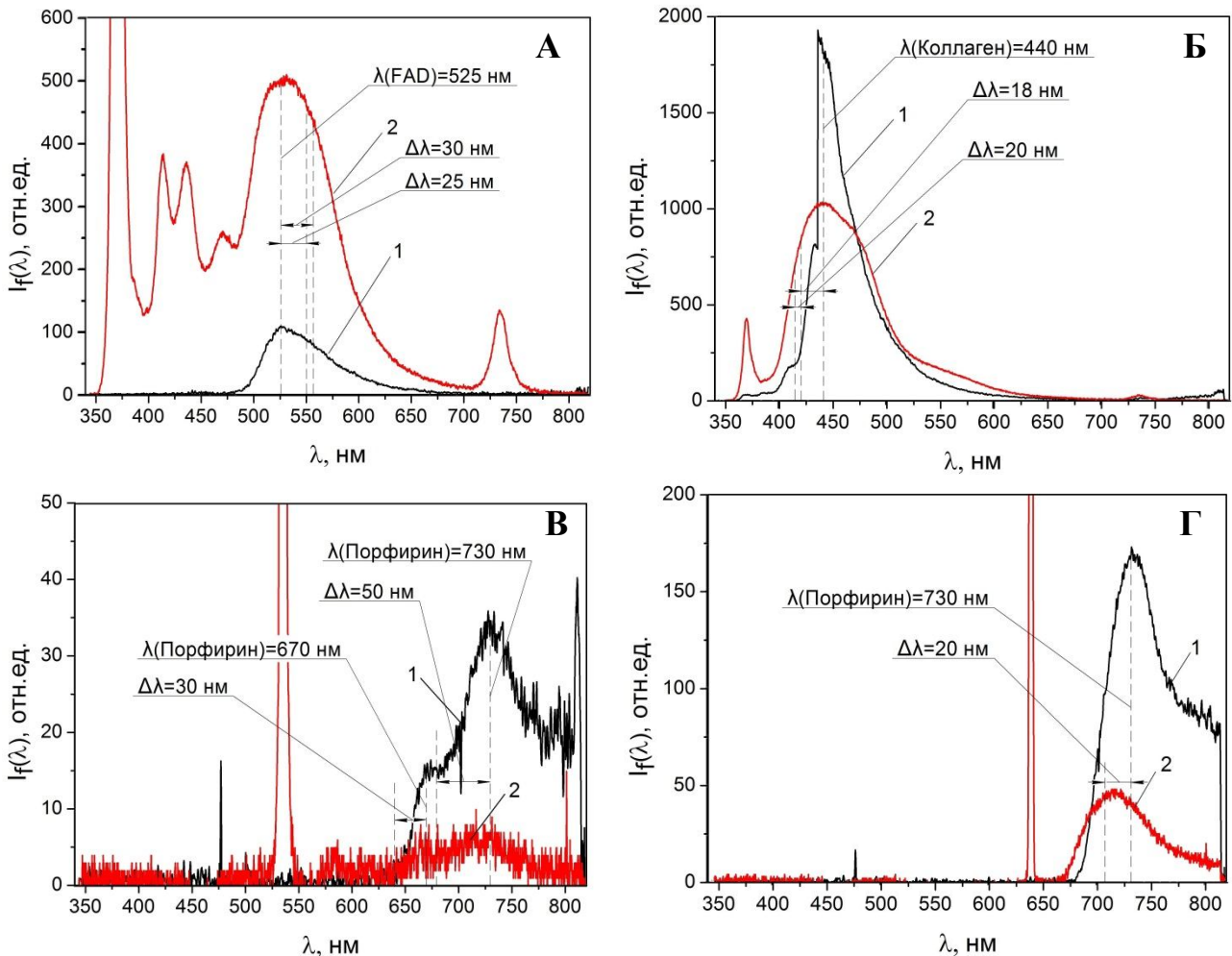


Рисунок 1 – Экспериментальная установка для проведения проверки работоспособности ЛФД-каналов МЛНДК:

при УФ (а), зеленой (б) и красной (в) длинах волн возбуждения

На рисунке 2 представлены некоторые зарегистрированные спектры флуоресценции с использованием 3-х длин волн возбуждения (365, 532 и 635 нм) на биомаркерах – FAD [10] (рис.2а), коллагене (рис.2б), а также порфирине [11] (рис.2в и 2г соответственно для зеленой и красной линий возбуждения флуоресценции).

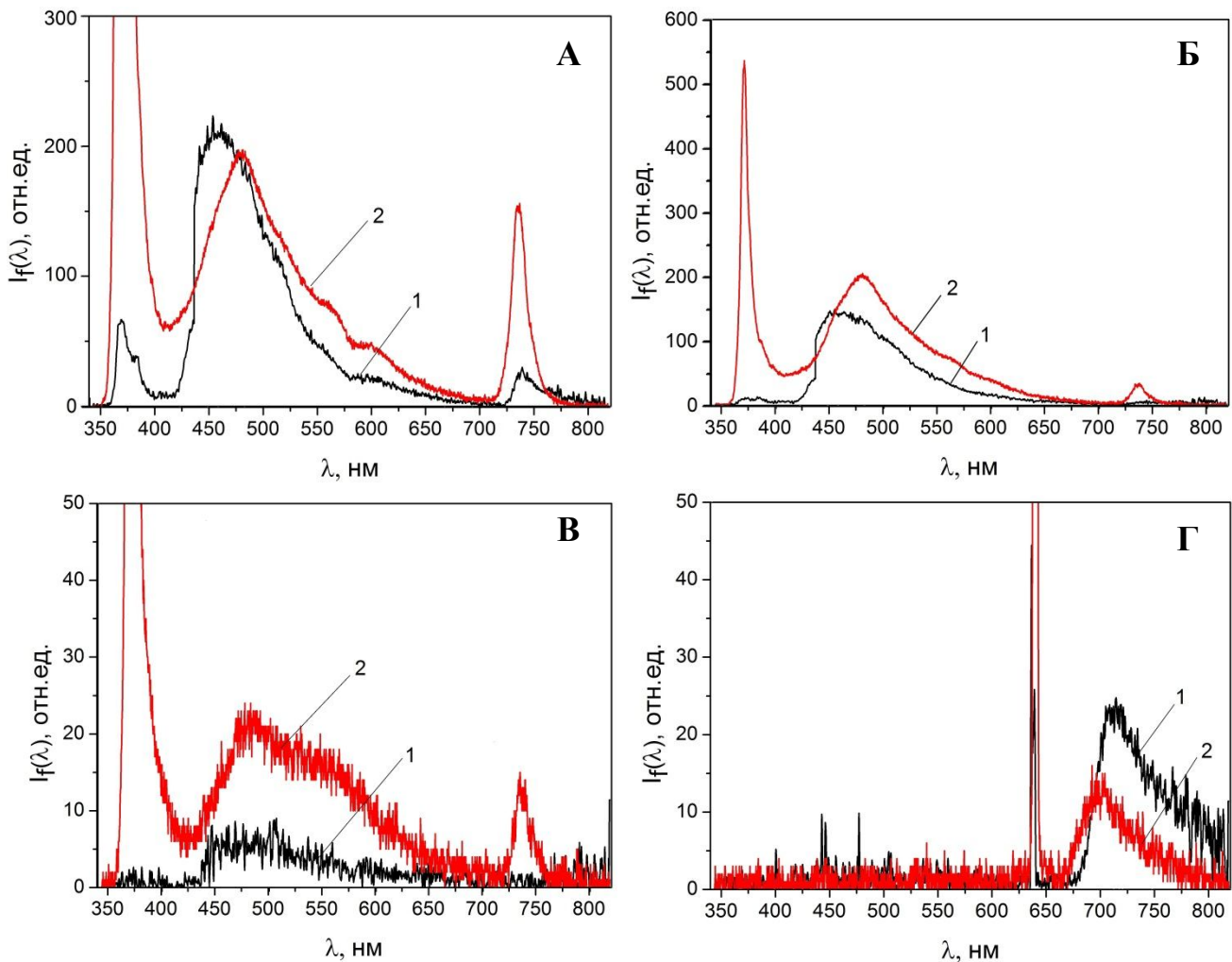


1 – МЛНДК №1; 2 – МЛНДК №2

Рисунок 2 – Примеры спектров флуоресценции:
на биомаркере FAD при УФ длине волны возбуждения (а), на коллагене при УФ линии возбуждения (б), на порфирине при зеленой (в) и красной (г) линиях возбуждения

На рисунках пунктирными линиями отмечены длины волн с ожидаемой флуоресценцией биомаркеров и длины волн, на которых наблюдаются пики флуоресценции. Так, в самом МЛНДК предлагается использовать для анализа наличия биомаркеров следующие длины волн: для FAD – 550 нм, для коллагена – 420 нм, для порфирина при зеленой линии возбуждения – 640 и 680 нм, для красной – 710 нм. Однако, для данного же МЛНДК в работе [12] предлагается анализировать FAD при УФ линии возбуждения на длине волны 555 нм, а коллаген – на 422 нм. Очевидно, что существующие различные подходы в определении длин волн флуоресценции для исследуемых флуорофоров не позволяют сравнивать полученные результаты в клинической практике, что также является препятствием в развитии данной технологии.

Дополнительно для оценки работоспособности ЛФД-каналов исследуемых 2-х МЛНДК одной серии были проведены измерения на биотканях – среднем пальце и предплечье правой руки условно-здорового добровольца – области кожи с большим количеством артериоло-венулярных шунтов (АВА) (рис.3а) и области кожи без АВА (рис.3б) соответственно при УФ линии возбуждения. На рис. 3в и 3г соответственно представлены результаты измерений спектров на невусе (родинке) данного добровольца при УФ и красной линиях возбуждения.



1 – МЛНДК №1; 2 – МЛНДК №2

Рисунок 3 – Примеры спектров флуоресценции:

в области кожи с АВА (а), в области кожи без АВА (б), на родинке при УФ (в) и красной (г) линиях возбуждения

Как видно из представленных рисунков 2 и 3 для двух сравниваемых ЛФД-каналов МЛНДК одной серии отличаются как значения амплитуды интенсивности флуоресценции, так и длины волн, на которых наблюдаются пики флуоресценции. Во многих известных нам публикациях данные по спектрам флуоресценции многих эндогенных биомаркеров весьма противоречивы. Причиной этому может быть как разная спектральная чувствительность, передаточная функция и разрешающая способность разных диагностических приборов,

используемых разными авторами, так и разное в каждом конкретном случае спектральное искажение, вызванное избирательным поглощением излучения основными биомаркерами эпидермиса, дермы и крови [13]. Так, например, в [14] показано, что в целом выпускаемая лазерная медицинская техника (в том числе диагностическая) в большинстве своем калибрована по произвольным методикам.

Исходя из полученных предварительных результатов, можно сделать вывод о необходимости разработки методики метрологического контроля состояния приборов ЛФД. Метрологическое обеспечение должно охватывать как спектральную калибровку показаний прибора, так и нормирование количественных показателей флуоресценции, базирующееся в том числе на моделировании эндогенной флуоресценции исследуемых флуорофоров. При создании приборов ЛФД кроме новых аппаратных решений требуются также новые подходы к разработке программного обеспечения обработки и анализа диагностической информации, разработки практических методик ее применения в прикладной клинической медицине. Следует подчеркнуть, что только решение рассмотренных вопросов метрологического обеспечения метода ЛФД может позволить вывести данную диагностическую технологию на новый качественный уровень.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глазов А.И., Тихомиров С.В., Ромашков А.П. Метрологическое обеспечение лазерной медицинской техники, Труды Международной конференции по биомедицинскому приборостроению Биомедприбор-2000, с.166.
2. Tchernyi V.V., Rogatkin D.A., Vyshenkov O.A., Polyakov P.Yu. Some results of multiwave in situ auto-fluorescence diagnostics // Proc. SPIE, vol. 5693, 2005. – pp. 336-343.
3. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostics. // La-ser Physics. 2000. V. 10. No.6. P. 1188-1207.
4. Стратонников А.А., Меерович Г.А., Рябова А.В., Савельева Т.А., Лощенов В.Б. Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии, Квант. электроника, 2006, 36 (12), 1103–1110.
5. Рогаткин Д. А., Лапаева, Л. Г., Быченков О. А., Терещенко С. Г., Шумский В. И. Основные источники погрешностей в неинвазивной медицинской спектрофотометрии. Часть 1. Физико-технические источники и факторы погрешностей. // Измерительная техника, 2013. - № 2. - с.61-67.
6. Lin Y., Gao H. et. al. Fluorescence diffuse optical tomography with functional and anatomical a priori information: feasibility study // Phys. Med. Biol., vol. 52, 2007. – p.5569-5585.
7. Рогаткин Д.А., Дунаев А.В., Лапаева Л.Г. Метрологическое обеспечение методов и приборов неинвазивной медицинской спектрофотометрии. // Медицинская техника, №2, 2010. - с.31-36.
8. Рогаткин Д.А., Терещенко С.Г., Петрицкая Е.Н., Лапаева Л.Г., Быченков О.А., Литвинова К.С., Макаров Д.С., Смирнова Н.В. Физические и медико-биологические основы метрологического обеспечения методов и приборов неинвазивной медицинской спектрофотометрии. Отчет о НИР (заключительный) в рамках со-глашения с РФФИ № 10-0634/04 от 25.03.2010 по гранту № 08-02-00769а / МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, рук. чл.-корр. РАМН, д.м.н., проф. Оноприенко Г.А. - № ГР 01201062215 (ФГНУ "ЦИТиС") – М.: МОНИКИ, 2011. – 83с.
9. Rogatkin D.A., Sokolovski S. G., Fedorova K. A., Stewart N. A., Sidorov V. V., Rafailov E. U. Basic principles of design and functioning of multifunctional laser diagnostic system for non-invasive medical spectrophotometry // SPIE Proc., vol. 7890, – 78901H, 2011.
10. Сайт фирмы Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f6625.pdf>

11. Сайт фирмы Sigma-Aldrich [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/252921.pdf>
12. Smirnova O.D., Rogatkin D.A. and Litvinova K.S. Collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes. // Journal of Innovative Optical Health Science, vol. 5, No.2, 2012. - 1250010 (9 pages).
13. Литвинова К.С., Рогаткин Д.А. Каталог спектральных характеристик основных флуорофоров тканей человека и животных // Сборник материалов III Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика-2010». М.: Изд-во МГУ, 2010. с.141-143.
14. Ромашков А.П., Тихомиров С.В. Состояние и перспективы метрологического обеспечения лазерной медицины и лазерной медицинской техники. // Измерительная техника, 1998, N 9. - с.41-46.

Дрёмин Виктор Владимирович

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс», г. Орёл
Студент кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация»
E-mail: dremin_viktor@mail.ru

Жеребцов Евгений Андреевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс», г. Орёл
Ассистент, аспирант кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация»
E-mail: zherebzow@gmail.com

Дунаев Андрей Валерьевич

Университет Данди, г. Данди, Великобритания
Научный сотрудник научной группы фотоники и наноисследований отделения физики
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс», г. Орёл.
Кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры «Приборостроение, метрология и сертификация», исполнительный директор научно-образовательного центра «Биомедицинская инженерия».
Тел.: +7 (4862) 41-98-76
E-mail: a.v.dunaev@dundee.ac.uk