

РАЗРАБОТКА ОПТИЧЕСКОГО ФАНТОМА ДЛЯ ЗАДАЧ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

В.В. Шуплецов¹, К.Ю. Кандурова¹

*¹Научно-технологический центр биомедицинской фотоники,
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева
(302026, г. Орёл, ул. Комсомольская, 95)
e-mail: matoka_97@mail.ru*

В статье показаны возможности применения оптического фантома, имитирующего флуоресценцию флавиноадениндинуклеотида (ФАД) и коллагена кожи, а также результаты исследования с использованием установки флуоресцентной визуализации и флуоресцентной спектроскопии. Предлагается методика изготовления оптического фантома, который позволит производить калибровку устройств флуоресцентной визуализации для улучшения качества технологии.

Ключевые слова: оптический фантом, флуоресцентная визуализация, флуоресцентная спектроскопия.

1. ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания занимают второе место по смертности во всем мире [1]. Обнаружение и дифференцировка опухолей обычно осуществляется путем визуального осмотра с последующей биопсией подозрительных участков ткани. Гистологическое исследование взятых образцов занимает довольно длительное время, при этом в ходе самой операции обнаружить все участки опухолевой инфильтрации трудно.

В процессе канцерогенеза клетки претерпевают трансформации, что приводит к изменению морфологических и биохимических свойств биологических тканей, которые могут быть обнаружены флуоресцентными диагностическими методами. Методы флуоресцентной спектроскопии и флуоресцентной визуализации демонстрируют значительную чувствительность к присутствию патологических изменений в тканях, в частности злокачественных [2,3]. Активная пролиферация в условиях

гипоксии вынуждает опухолевые клетки переходить на гликолитический тип метаболизма. Характерной особенностью опухолевых клеток является увеличение концентрации никотинадениндинуклеотида (НАДН), изменение редокс соотношения (ФАД/НАДН), накопление порфиринов [4-6].

Для корректной интерпретации экспериментальных данных и определения влияния на общий сигнал каждого из флуорофоров необходимо создавать оптические фантомы. Оптические фантомы обладают близкими к биологическим тканям оптическими свойствами и имитируют спектральные характеристики для моделирования типичного взаимодействия биоткани с оптическим излучением, в частности флуоресценции.

Целью настоящей работы является создание оптического фантома, имитирующего флуоресценцию биологической ткани, который может быть использован для калибровки системы флуоресцентной визуализации.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Создание фантома

При изготовлении оптических фантомов, имитирующих флуоресценцию коллагена, возможно применение его гидролизованной формы – желатина. В представленной работе была создана многослойная модель, состоящая из листов желатина, толщиной не более 1 мм. Оптимальное количество листов желатина подбиралось экспериментально путем сравнения уровней интенсивности флуоресценции желатиновых листов и коллагена кожи.

Для моделирования спектра флуоресценции ФАД использовался 1% раствор (26,57 мкМ/г) рибофлавин-мононуклеотида. Это вещество так же относится к флавионам и имеет аналогичный ФАД спектр флуоресценции, но более высокий квантовый выход, при этом в отличие от ФАД его квантовый выход в пределах рН 4-8 не зависит от кислотности [7]. Известно, что в норме, в организме человека концентрация ФАД варьируется от 0,1 до 1 мкМ/г [8]. В соответствии с этим были выбраны четыре концентрации рибофлавина, близкие к реальным концентрациям ФАД. Однако

необходимо учитывать, что молярная масса ФАД (785 г/моль) примерно в два раза больше, чем у рибофлавина (376 г/моль), соответственно необходимо использовать приближение 26,57 мкМ/г рибофлавина к 13,29 мкМ/г ФАД. Раствор рибофлавин-моноклеотида разбавлялся дистиллированной водой, в кратных соотношениях 1:32, 1:64, 1:128 и 1:256 (таблица 1).

Таблица 1. Концентрации рибофлавина

Соотношение рибофлавин/дистиллированная вода, г	1:1	1:32	1:64	1:128	1:256
Рибофлавин, мкМ/г	26,57	0,83	0,42	0,21	0,1
ФАД, мкМ/г	13,29	0,42	0,21	0,1	0,05

Таким образом, был изготовлен оптический фантом, состоящий из 2 листов желатина, на которые в 4 разные области распределялись растворы четырех различных концентраций рибофлавина: 0,83; 0,42; 0,21; 0,1 мкМ/г.

2.2. Экспериментальная установка

Оптические характеристики фантома были изучены с помощью экспериментальной установки флуоресцентной спектроскопии и визуализации (рис. 1).

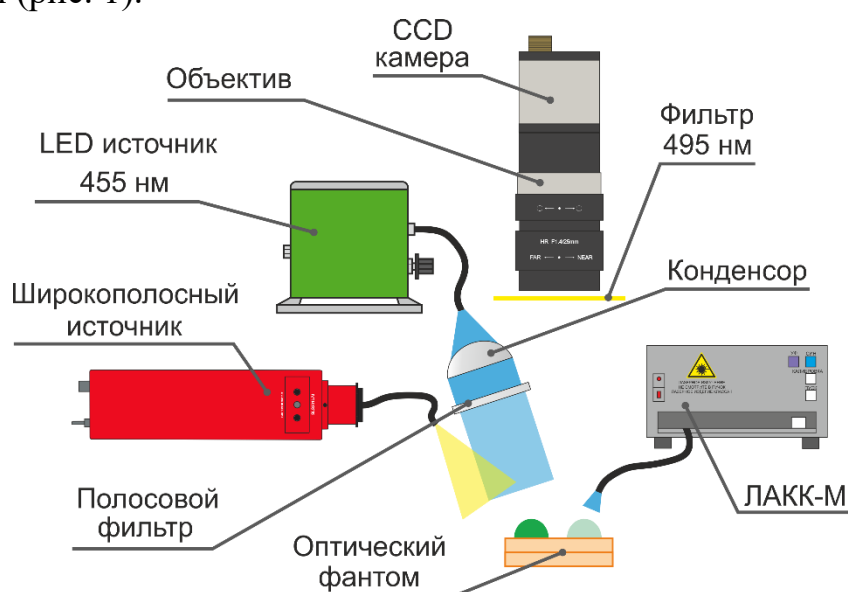


Рис. 1. Схема экспериментальной установки

Излучение светодиодного источника 455 нм LLS-455 (Ocean Optics, США) проходит через конденсор и направляется на оптический фантом, возбуждая флуоресценцию желатина и рибофлавина. В канале флуоресцентной визуализации излучение флуоресценции и обратно отражённое излучение источника, ослабленное светофильтром 495 нм, регистрируется ПЗС камерой 340M-USB (Thorlabs, Inc. США). В канале флуоресцентной спектроскопии спектры флуоресценции рибофлавина регистрируются с помощью оптического волокна спектрометром многофункционального лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М (ООО НПП «ЛАЗМА», Россия). Широкополосный источник излучения 360–2600 нм SLS201L-M (Thorlabs, Inc. США) используется для получения изображений в белом свете.

2.3. Методология исследования

Измерение флуоресценции разработанного оптического фантома проходило при помощи вышеописанной установки флуоресцентной визуализации и спектроскопии (рис. 2).

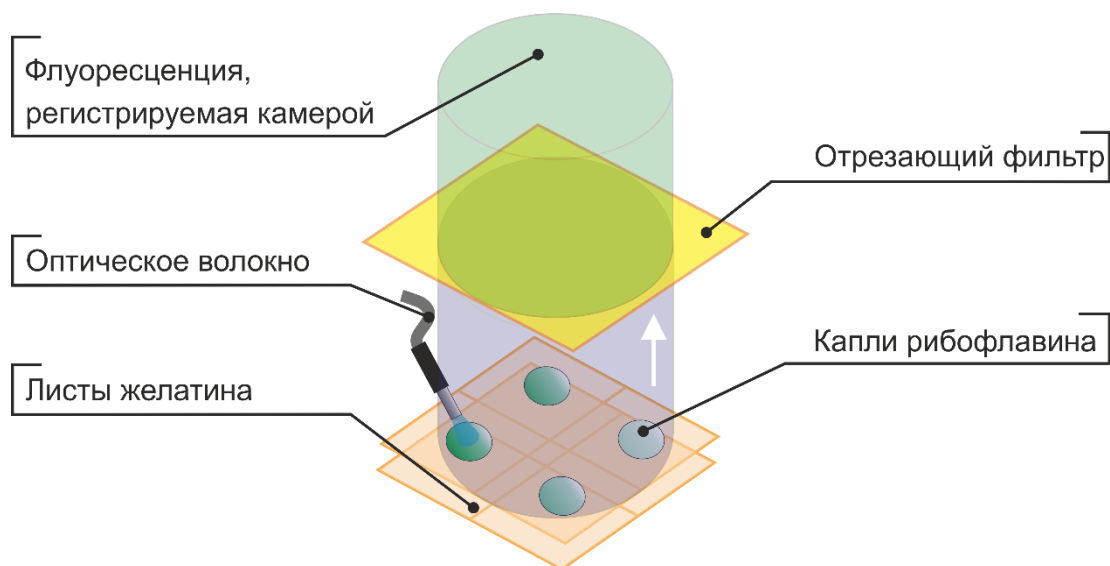


Рис. 2. Схема проведения эксперимента

Методика исследования предполагает поочередную регистрацию флуоресценции ПЗС камерой и спектрометром. На листы желатина с

помощью микропипетки были нанесены капли одинакового объема (20 мкл) с различной концентрацией рибофлавина. Оптический фантом был расположен на нефлуоресцирующей неотражающей поверхности.

На первом этапе перед матрицей камеры устанавливался фильтр 495 нм и регистрировались флуоресцентные изображения (измерения повторяли 3 раза). Затем регистрировалось изображение фантома в белом свете без отрезающего фильтра.

На втором этапе была проведена регистрация спектров флуоресценции каждой из капель рибофлавина (измерения повторяли 3 раза). Полученные результаты обрабатывались на персональном компьютере с помощью программного обеспечения, разработанного в среде Matlab.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изображение оптического фантома в белом свете приведено на рисунке 3.



Рис. 3. Изображение оптического фантома в белом свете

С помощью канала флуоресцентной визуализации было получено монохромное изображение изготовленного оптического фантома с разрядностью 16 бит (рис. 4). Затем изображение было контрастировано псевдоцветом.

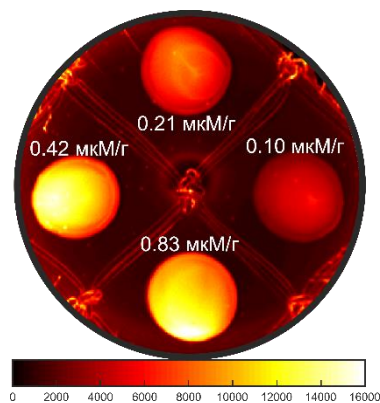


Рис. 4. Флуоресцентное изображение оптического фантома

Усредняя значения интенсивности по области в каждой из капель рибофлавина, были получены четыре средних значения интенсивности флуоресценции. Данные о максимальных значениях интенсивности, полученные с помощью флуоресцентной спектроскопии, также были усреднены для сравнения с данными флуоресцентной визуализации. Результаты измерений интенсивности флуоресценции для четырех концентраций рибофлавина представлены на рисунке 5.

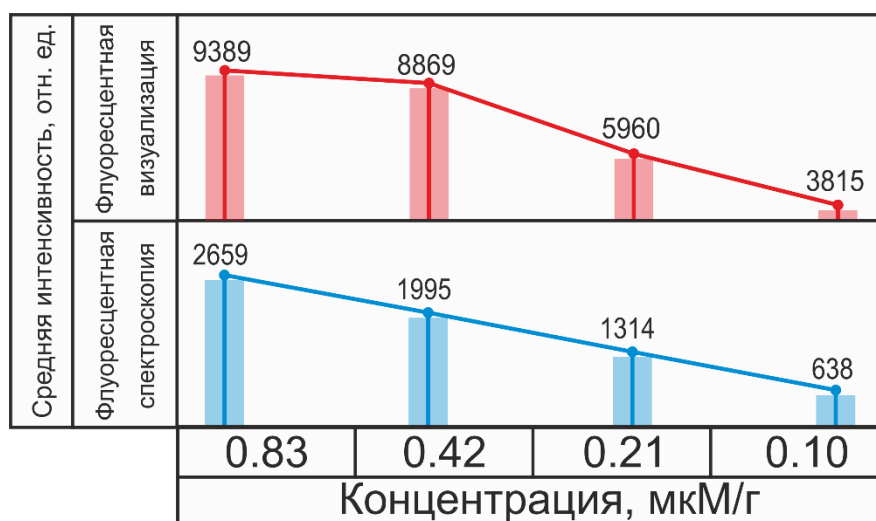


Рис. 5. Средние значения интенсивности

Интенсивность флуоресценции, зарегистрированная установкой флуоресцентной визуализации, уменьшается пропорционально уменьшению концентрации рибофлавина, что также было подтверждено флуоресцентной спектроскопией.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о чувствительности собранной установки флуоресцентной визуализации к изменению концентрации флавинов. Предложенный оптический фантом прост в изготовлении и может быть использован для имитации флуоресценции различных веществ в зависимости от конкретной исследовательской задачи, учитывая при этом влияние коллагена кожи. Использование такого оптического фантома позволит производить валидацию устройств флуоресцентной визуализации для улучшения качества технологии для дальнейшего проведения исследований в клинических условиях. Полученные данные планируется также использовать для корректировки флуоресцентных изображений патологических биотканей с целью определения границ опухолей в ходе хирургических операций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта №18-02-00669.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide // IARC CancerBase No. 11
2. E. Borisova, A. Gisbrecht, T. Genova-Hristova et al. Multispectral autofluorescence detection of skin neoplasia using steady-state techniques // Proc. SPIE 11047, 2019, 1104704.
3. Y.A. Khristoforova, I.A. Bratchenko, O.O. Myakinin et al. Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by Raman and autofluorescence analysis // Journal of Biophotonics, 2019, v. 12, №4, e201800400.
4. Currie E., Schulze A., Zechner R., Walther T.C., Farese R.V. Jr. Cellular fatty acid metabolism and cancer // Cell Metabolism 2013; v. 18, №2, p. 153–161.
5. Fox C.J., Hammerman P.S., Thompson C.B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response // Nature Reviews Immunology, 2005; v. 5, №11, p. 844–852.

6. Moesta K.T., Ebert B., Handke T., Nolte D., Nowak C., Haensch W.E., Pandey R.K., Dougherty T.J., Rinneberg H., Schlag P.M. Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases // *Cancer research*, 2001, v. 61, №3, p. 991-999.
7. Drössler P. et al. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution // *Chemical Physics*, 2002, v. 282, №3, p. 429-439.
8. Aliverti A., Curti B., Vanoni M. A. Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins // *Flavoprotein protocols – Humana Press*, 1999, p. 9-23.

DEVELOPMENT OF OPTICAL PHANTOM FOR FLUORESCENCE DIAGNOSIS OF BIOLOGICAL TISSUES

V.V. Shupletsov¹, K.Y. Kandurova¹

*¹Research and Development Center of Biomedical Photonics,
Orel State University named after I.S. Turgenev
(Komsomolskaya st., 95, Orel, Russia, 302026)
e-mail: matoka_97@mail.ru*

The article describes the possibility of application of the optical phantom mimicking flavin adenine dinucleotide (FAD) and skin collagen fluorescence. The results of experimental studies using fluorescence imaging and fluorescence spectroscopy methods are demonstrated. The method of producing the optical phantom for quick calibration of fluorescence imaging devices for further application in clinical practice is proposed.

Keywords: optical phantom, fluorescence imaging, fluorescence spectroscopy.