

ОПТИЧЕСКОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ

УДК 621.391.837.681.3]:[621 + 681:723

ВОЛОКОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-ОТРАЖАТЕЛЬНЫЙ СПЕКТРОМЕТР С МНОГОВОЛНОВЫМ ВОЗБУЖДЕНИЕМ

© 2014 г. Г. В. Папаян*, канд. техн. наук; В. М. Журба**, А. А. Кишалов**;
Н. Н. Петрищев*, доктор мед. наук; М. М. Галагудза***, доктор мед. наук

* Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург

** Научно-производственное предприятие «ВОЛО», Санкт-Петербург

*** Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

E-mail: papayan.garry632@gmail.com

Универсальный волоконный флуоресцентно-отражательный спектрометр с многоволновым возбуждением предназначен для проведения медико-биологических исследований, в том числе в свете автофлуоресценции. Для этого он оснащен осветительной системой на основе светодиодов, обладающей рядом технических особенностей: возбуждением флуоресценции излучением с длинами волн 365, 405 и 450 нм, синхронным переключением блокирующих светофильтров на длины волн возбуждения, быстрым переключением освещения белым светом и возбуждающим излучением. Прибор позволяет проводить наблюдение изменений живых объектов по спектрам диффузного отражения и флуоресценции, регистрируемым практически одновременно. Возможности прибора иллюстрируются проведенными с его помощью исследованиями влияния условий возбуждения автофлуоресценции на состояние метаболического статуса миокарда.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, отражательная спектроскопия, флуоресцентная диагностика, автофлуоресценция.

Коды OCIS: 170.0170, 170.6280, 170.6510, 170.3880, 170.3880, 170.1610, 170.4580

Поступила в редакцию 05.11.2013

Для проведения локальных измерений спектров отражения и флуоресценции в биомедицине на органно-тканевом уровне в условиях *in vivo* и *ex vivo* обычно используются многоканальные спектрометры, оснащенные волоконными зондами [1–6]. В большинстве случаев используется возбуждение излучением какой-либо одной длины волны с помощью лазерного источника. Возможность вариации длины волны возбуждения реализована в работе [4] за счет применения перестраиваемого лазера на красителях, а в работе [5] – ксенонового осветителя с монохроматором.

В работе [6] описан флуоресцентно-отражательный волоконный спектрометр «Skin-AGE», в котором флуоресценция возбуждается излу-

чением с длиной волны 365 нм. Оно позволяет эффективно возбуждать автофлуоресценцию ткани, а также ряд экзогенных веществ, которые представляют интерес для диагностики. Вместе с тем при решении некоторых задач, например связанных с выбором оптимальных условий для оценки функционального состояния органа в условиях ишемического повреждения, требуется наличие нескольких длин волны возбуждения. При этом необходимо обеспечить возможность оперативного перехода от одной длины волны возбуждения к другой без перестройки прибора и сохранить возможность быстрого переключения регистрации спектров флуоресцентной эмиссии и спектров диффузного отражения для изучения кинетики их изменений.

Таковыми свойствами обладает описываемый ниже универсальный флуоресцентно-отражательный спектрометр с многоволновым возбуждением «ФОС-М». Прибор оснащен специальной осветительной системой. Ее оптическая схема приведена на рис. 1. Излучателями возбуждения флуоресценции служат монохромные светодиоды с центральными длинами волн 365, 405 и 450 нм (1–3), а для регистрации спектров отражения – светодиод белого света 4. Излучения светодиодов 1–3 коллимируются тремя одинаковыми линзами 5, в фокусе которых находятся излучающие площадки светодиодов. Одно из этих излучений в зависимости от положения подвижного зеркала 6 и с помощью неподвижного зеркала 7 и линзы 8 фокусируется на торец осветительного жгута 9. В каждом из осветительных каналов возбуждения в промежутке между линзами 5 и 8 установлены очищающие светофильтры 10–12, задача которых состоит в устранении паразитного длинноволнового излучения светодиодов, которое способно помешать регистрации слабой флуоресценции.

Возбуждающее излучение через осветительный канал волоконного щупа поступает в объект, с которым он контактирует. Щуп состоит из семи кварцевых волокон диаметром 400 мкм. Шесть из них находятся на периферии, выполняя функцию освещения, а расположенное в центре зонда седьмое волокно – функцию сбора исходящего из объекта вторичного

излучения. Это излучение через волокна 13 и 14 и сопрягающие линзы 15 и 16 поступает на вход многоканального спектрометра. Между линзами 15 и 16 вводится один из подвижных светофильтров 17, 18 или 19. Его задача ослабить возбуждающее излучение до уровня излучения флуоресцентной эмиссии, что позволяет сформировать референтный сигнал в отраженном свете. Блокирующие светофильтры 17–19 вместе со вспомогательным зеркалом 6 смонтированы на общей платформе, приводимой в движение шаговым двигателем. При изменении длины волны возбуждающего излучения платформа устанавливает зеркало 6 в положение напротив необходимого светодиода, при этом соответствующий барьерный светофильтр устанавливается в приемном канале. Таким образом, в данной схеме каждому положению платформы соответствует свой излучающий светодиод, а также пара светофильтров – один очищающий и один барьерный. При этом переключение источников излучения и барьерных светофильтров происходит синхронно с помощью одного общего двигателя, что упрощает систему переключения и делает ее более надежной.

Ввод излучения светодиода белого свечения 4 в осветительный жгут 9 осуществляется через вспомогательный световод 20, который изготовлен из полимерного волокна диаметром 1,5 мм. Его входной торец располагается в непосредственной близости от светодиода 4,

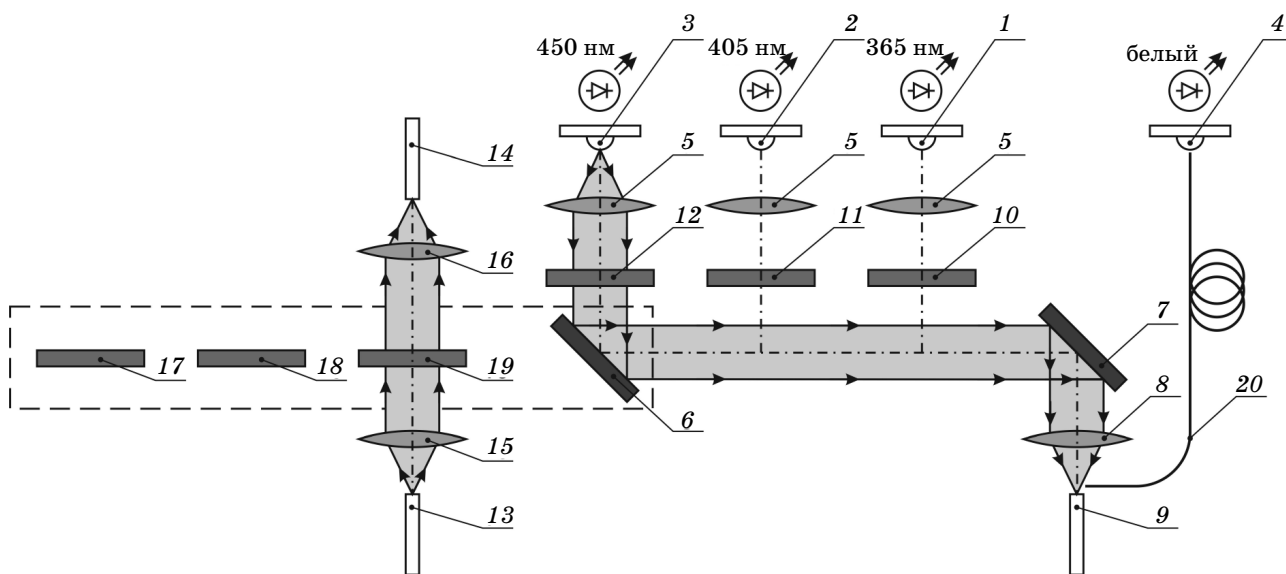


Рис.1. Оптическая схема осветителя многоволнового волоконного флуоресцентно-отражательного спектрометра ФОС-М (пояснения в тексте).

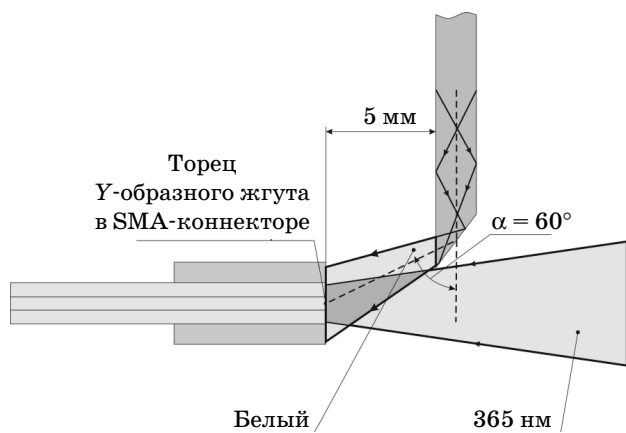


Рис. 2. Конструктивное выполнение многоволнового осветителя (обозначения те же, что и на рис. 1).

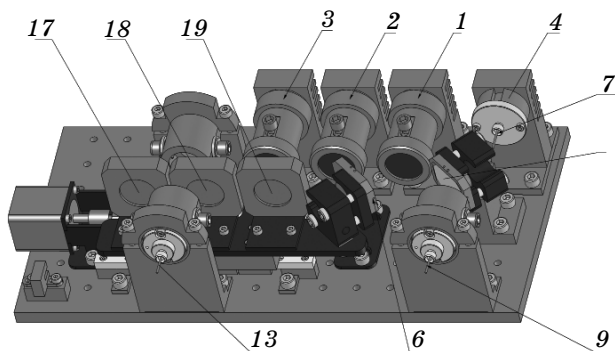


Рис. 3. Ввод излучения белого светодиода в осветительный жгут.

что позволяет осуществлять ввод излучения без согласующей оптики. Выходной конец световода 20, выполненный в виде призмы полного внутреннего отражения (рис. 2), вмонтирован в SMA-разъем осветительного жгута таким образом, чтобы не препятствовать освещению его возбуждающими лучами.

Конструктивное выполнение многоволнового осветителя прибора «ФОС-М» представлено на рис. 3, а его технические характеристики приведены в таблице.

Что касается спектрометрического модуля прибора «ФОС-М», то в нем, как и в приборе «Skin-AGE», используется коммерчески доступный многоканальный оптоволоконный спектрометр *AvaSpec-2048 (Avantes Inc.)*, регистрирующий спектр в диапазоне 350–750 нм. Управление прибором осуществляется от встроенного контроллера с помощью персонального компьютера, подключаемого к прибору через порт USB-2.0.

В качестве примера приведем результаты предварительных исследований метаболического статуса миокарда при повторных эпизодах тотальной ишемии-реперфузии сердца *ex vivo* с использованием различных условий возбуждения автофлуоресценции. В экспериментах участвовали все имеющиеся в приборе источники возбуждения флуоресценции – 365, 405 и 450 нм. Кривые изменения интенсивности автофлуоресценции во времени, полученные при различных спектральных условиях

Технические характеристики прибора «ФОС-М»

Мощность на выходе зонда	канал освещения 365 нм	3 мВт
	канал освещения 405 нм	6 мВт
	канал освещения 450 нм	9 мВт
	канал освещения «белый»	50 мкВт
Время переключения	365 нм / 405 нм	3 с
	405 нм / 450 нм	3 с
	365 нм / 450 нм	6 с
	365 нм / белый	<1 мс
Спектральный диапазон регистрации спектров отражения		420–700 нм
Спектральный диапазон регистрации спектров флуоресценции		350–750 нм
Шина связи с компьютером		USB 2.0
Габаритные размеры В. Ш. Г.		140×350×300
Питание		220 В, 50 Гц
Масса прибора		6 кг

регистрации и возбуждения, приведены на рис. 4. Кривые, приведенные на рис. 4а получены при возбуждении излучением с длинами волны $\lambda = 365, 450$ (рис. 4б) и 405 нм (рис. 4в, г).

Опыты проводились на изолированном перфузируемом по Лангендорфу сердце крысы [8]. Отключение перфузии сердца питающим раствором приводило к ишемии миокарда. Установленные в спектрометре длины волн регистрации автофлуоресценции с центрами на 460 и 540 нм соответствуют максимумам флуоресцентной эмиссии двух ферментов дыхательной цепи: пиридин-нуклеотиду в восстановленном состоянии (NADH) и флавопротеину в окисленном состоянии (Fp). Известно, что при ишемии сигнал, связанный с изменением NADH, должен увеличиваться, а сигнал Fp, наоборот, уменьшаться [7]. Эту закономерность подтверждают приведенные на рис. 4а, б кривые, имеющие форму меандра. Рис. 4а получен при возбуждении излучением с длиной волны 365 нм, которая оптимальна для возбуждения NADH, рис. 4б – при возбуждении излучением с $\lambda = 450$ нм, которая обеспечивает оптимальное возбуждение Fp. Как видно из рис. 4а, при отключении перфузии сигнал, ассоциированный с NADH и измеренный на длине волны 460 нм при возбуждении излучением с $\lambda = 365$ нм

(обозначим его как $460(365)$), возрастает более чем в 3 раза за счет перехода NAD^+ в $NADH$ (кривая 1).

Противоположным образом, как это и должно быть, ведет себя сигнал $540(450)$, ассоциированный с Fp (рис. 4б, кривая 4). При ишемии он примерно втрое уменьшается. Динамика перехода из состояния перфузии в состояние ишемии отличается от таковой при обратном процессе. В эксперименте, представленном на рис. 4б, переход миокарда из состояния перфузии в состояние ишемии сопровождается экспоненциальным падением сигнала на длине волны 540 нм, которое происходит за 26 с (уровень $0,9$). Обратный процесс идет быстрее, он занимает всего 18 с и содержит, судя по плечу на кривой 4, две стадии – вначале быструю, а затем медленную.

На рис. 4а наряду с флуоресцентным сигналом на $\lambda = 460$ нм (кривая 1) приведен сигнал, полученный в отраженном возбуждающем свете на длине волны 385 нм (кривая 2), являющийся референтным сигналом. Его полезная роль наглядно видна при первом эпизоде ишемии, представленном на рис. 4а кривыми 1 и 2, когда сигналы на $\lambda = 460$ и 385 нм вели себя неустойчиво, что, по-видимому, объясняется временной потерей контакта волоконного

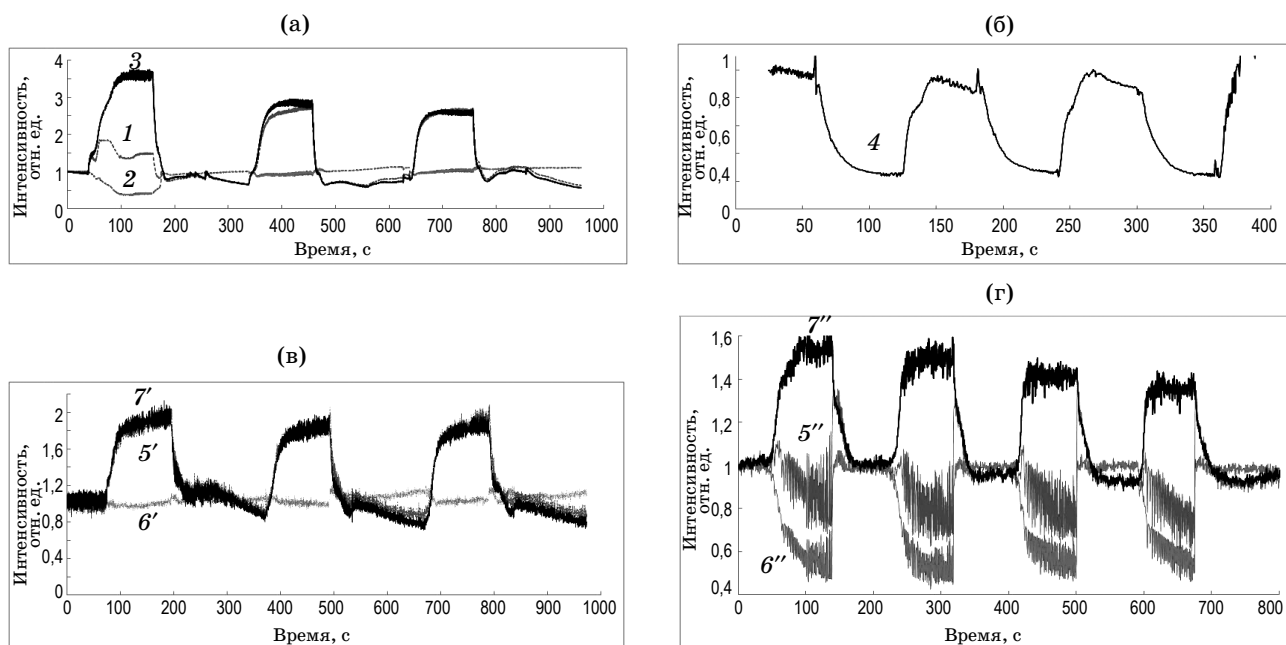


Рис. 4. Графики изменения интенсивности автофлуоресценции изолированного сердца крысы во времени при циклической тотальной ишемии-перфузии, полученные при различных условиях возбуждения и регистрации: 365 нм (а), 450 нм (б), – 405 нм (в, г); 1 – $460(365)$, 2 – $385(365)$, 3 – $460/385(365)$, 4 – $540(450)$, 5', 5'' – $460(405)$, 6', 6'' – $540(405)$, 7', 7'' – $460/540(405)$.

зонда с сокращающимся сердцем. Отношение сигналов на 460/365 ведет себя существенно более стабильно (кривая 3), демонстрируя одинаковую динамику во всех трех эпизодах ишемии.

Обращает на себя внимание также отчетливое снижение амплитуды нарастания отношения сигналов 460/365 на кривой 3 при выполнении повторных эпизодов ишемии миокарда. Не исключено, что данный показатель отражает адаптацию миокарда к ишемии, возникающую при выполнении кратковременных эпизодов ишемии-реперфузии и известную под названием ишемического preconditionирования.

Таким образом, исходя из представленных данных, для мониторинга может использоваться возбуждение как излучениями на $\lambda = 365$ нм, так и на $\lambda = 450$ нм, а в качестве регистрируемого параметра полезно применять отношение флуоресцентных сигналов на $\lambda = 460$ и 540 нм к соответствующим референтным сигналам, которые формируются из отраженного возбуждающего излучения.

Интерес представляет также изучение поведения сигналов при возбуждении излучением с $\lambda = 405$ нм. Излучение с этой длиной волны, занимающее промежуточное положение между 365 и 450 нм, потенциально способно возбудить одновременно NADH и Fp. Возбуждение обоих флуорофоров излучением одной длины волны с учетом их разнонаправленной реакции на состояние ишемии может оказаться полезным инструментом для создания более простой системы интраоперационной диагностики ишемии. Проведенные эксперименты дали неоднозначные результаты. Результаты двух из них при возбуждении излучением с $\lambda = 405$ нм представлены на рис. 4в, г, причем кривые 5 и 6 показывают изменение сигналов на $\lambda = 460$ и 540 нм в отдельности, а кривая 7 – их отношение (460/540). Как видно из экспери-

мента № 1 (рис. 4в) изменение сигнала на 460 при возбуждении излучением на $\lambda = 405$ нм (кривая 5') соответствует поведению NADH при возбуждении излучением $\lambda = 365$ нм, т.е. растет при дефиците кислорода, но рост происходит с меньшей в 2 раза амплитудой. Сигнал на $\lambda = 540$ нм при этом практически не реагирует на ишемию (кривая 6') и поэтому отношение сигналов 460/540 ведет себя так же, как и 460 (кривая 7'). Следовательно, в этом случае сигнал на $\lambda = 540$ нм не может быть ассоциирован ни с NADH, ни с Fp.

Иначе ведет себя этот сигнал в эксперименте № 2, представленном на рис. 4г. Здесь он (кривая 6'') уменьшается при недостатке кислорода, что характерно для поведения Fp. При этом сигнал на $\lambda = 460$ нм (кривая 5'') тоже уменьшается, но в значительно меньшей степени. При этом, несмотря на разнонаправленность реакций на процесс ишемии/перфузии, поведение отношения 460/540 в обоих случаях оказалось очень похожим. Это произошло благодаря тому обстоятельству, что вместо изменений в числителе, которые сформировали кривую 7' в эксперименте № 1, в эксперименте № 2 имело место противоположное изменение в знаменателе (кривая 7''). Амплитуда изменений сигналов 460/540(405) в обоих случаях была в 2 раза меньше, чем при оптимальном возбуждении.

Причина нестабильного поведения автофлуоресценции при возбуждении излучением с $\lambda = 405$ нм, возможно, кроется в различных условиях проведения экспериментов по ишемии изолированного сердца, которые пока не удалось стандартизовать. Это явление, а также возможность использования излучение с $\lambda = 405$ нм для диагностики ишемии подлежат дальнейшему изучению.

Авторы благодарят М.Э. Колпакову и С.М. Минаяна за участие в проведении экспериментов по ишемии сердца крысы в условиях *ex vivo*.

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics // Laser Physics. 2000. V. 10. № 6. P. 1188–1207.
2. Zharkova N.N., Kozlov D.N., Polivanov Yu.N., Pykhov R.L., Smirnov V.V. Laser-excited fluorescence spectroscopic system for tissue diagnostics // Proc. SPIE. 1994. V. 2328. P. 196–201.
3. Horvath K.A., Schomacker K.T., Lee C.C., Cohn L.H. Intraoperative myocardial ischemia detection with laser-induced fluorescence // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1994. V. 107. P. 220–225.

4. Zeng H.A., MacKinnon N., Cline R.W., MacAulay C. E. *In vivo* fluorescence spectroscopy of the gastrointestinal tract under multiple wavelength excitation // Proc. SPIE .1996. Optical Biopsies and Microscopic Techniques. V. 2926. P. 4–8.
5. Zuluaga A., Utzinger U., Durkin A., Fuchs H., Gillenwater A., Jacob R., Kemp B., Fan J., Richards-Kortum R. Fluorescence excitation-emission matrices of human tissue: a system for in vivo measurement and data analysis // Appl. Spectrosc. 1999. V. 53. P. 302–311.
6. Kang Uk., Папаян Г. В., Березин В. Б., Петрищев Н. Н., Галагудза М. М. Спектрометр для флуоресцентно-отражательных биомедицинских исследований // Оптический журнал. 2013. Т. 80. № 1. С. 56–67.
7. Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F. Oxidation-reduction ratio studies of NADH and flavoprotein fluorescence mitochondria in freeze-trapped samples signals // J. Biol. Chem. 1979.V. 254. P. 4764–4771.
8. Минасян С.М., Галагудза М.М., Сонин Д.Л., Зверев Д.А., Королёв Д.В., Дмитриев Ю.В., Васильева М.С., Григорова Ю.Н., Власов Т.Д. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2009. Т. 8. № 4 (32). С. 54–59.