

ОПТИЧЕСКОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ И ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 616.092.4, 628.978.3, 535.372

ОПТИКО-ВОЛОКОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

^{*}Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

^{**}Научно-производственное предприятие “ВОЛО”, Санкт-Петербург

^{***}Государственный оптический институт имени С.И. Вавилова, Санкт-Петербург

^{****}Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

E-mail: pgarry@mail.ru

Описана спектрометрическая система для проведения интраоперационных исследований методами флуоресцентной и отражательной спектроскопии, включающая в себя два специализированных устройства: динамической фиксации волоконно-оптического зонда на работающем сердце и автоматического смыва крови с его поверхности. Приводится пример ее использования при флуоресцентных исследованиях экспериментальной ишемии миокарда крысы в условиях *in vivo*.

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 06.02.2014.

1. Введение

Спектральные измерения методами отражательной и флуоресцентной спектроскопии необходимы в процессе разнообразных биомедицинских исследований ткани [1]. Для их проведения в условиях *in vivo* наиболее удобными являются спектрометры, оснащенные волоконными щупами или катетерами [2–5]. Такие исследования проводятся, в частности, при разработке методов мониторинга процессов развития ишемического повреждения и уровня жизнеспособности тканей в ходе операции, в том числе, выполняемых на сердце [6]. Существующие волоконно-оптические щупы для этих целей не вполне подходят. Главным фактором, препятствующим их использованию, является неизбежно присутствующая в операционной ране и на поверхности исследуемого органа кровь.

Она может оказаться в зазоре между дистальным концом щупа и поверхностью исследуемой ткани, что приводит к большим и трудно контролируемым потерям света, как в процессе освещения, так и при его детектировании. Кроме указанной проблемы определенную трудность вызывают измерения на работающем сердце, при которых может произойти потеря контакта датчика с его поверхностью. Особенно сложно преодолеть влияние сокращения сердца в экспериментах на мелких животных, имеющих высокую частоту сердечных сокращений.

В статье описывается волоконно-оптическая спектрометрическая система, позволяющая преодолеть указанные трудности. Ее возможности иллюстрируются примером флуоресцентных исследований ишемии миокарда крысы, выполненных в условиях *in vivo*.

2. Оптико-волоконная спектрометрическая система с устройством для смыва крови

В спектрометрической системе, предназначенной для проведения интраоперационных исследований, задача устранения влияния крови решается за счет постоянного смыва крови в зазоре, образованном торцом оптоволоконного щупа и тканью. Система используется в разработанных нами ранее оптоволоконных флуоресцентно-отражательных спектрометрах двух типов: одноволновом [2] и многоволновом [3]. Ее схема показана на рис. 1. Она содержит специализированный светодиодный источник света 1, универсальный волоконный спектрометр 2, компьютер 3 и Y-образный волоконно-оптический щуп, осветительный 4 и детекторный 5 кабели которого подключены через SMA-разъемы соответственно к осветителю 1 и спектрометру 2. Осветительный кабель выполнен в виде жгута, состоящего из шести оптических волокон, а детекторный кабель содержит одиночное оптическое волокно. Дистальный конец щупа 6, объединяющий указанные волокна, выполнен в виде жгута с гексагональной укладкой, в центре которого расположено детекторное волокно, а на пери-

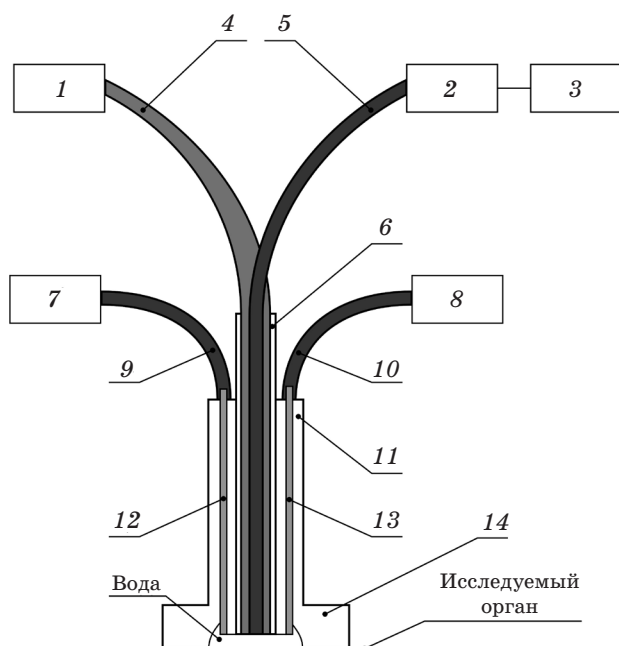


Рис. 1. Схема оптоволоконной спектрометрической системы с каналами подачи воды и ее аспирации.

ферии – осветительные волокна. Для организации смыва крови служит система подачи и аспирации жидкости, включающая в себя насос для подачи воды 7 и помпу для ее отсоса 8, которые подключаются к щупу через шланги 9 и 10 к штуцерам, входящим в состав металлического наконечника 11. Наконечник 11, в котором расположены соответствующие жидкостные каналы 12 и 13, вместе с дистальным концом волоконно-оптического щупа 6 образует волоконно-оптический зонд для хирургического применения. Наконечник 11 содержит раструб 14, назначение которого – увеличить площадь контакта зонда с исследуемым органом и, тем самым, исключить возможность его травмирования, а также препятствовать поступлению в зону контакта новых порций крови.

Устройство для смыва крови, будучи включенным в состав флуоресцентно-отражательных спектрометров [2, 3], работает следующим образом. Раструб 14 волоконно-оптического зонда приводится в контакт с поверхностью исследуемого органа. При этом создается небольшой зазор между дистальным концом щупа и поверхностью ткани. В этот зазор поступает вода из канала 12, которая эвакуируется из него с помощью канала 13. Скорость поступления воды выбирается чуть большей скорости ее аспирации, чтобы образовалась водяная подушка, предотвращая затекание крови в область измерения. Размер зазора устанавливается равным 0,2–0,3 мм, что при наличии в зоне контакта водной иммерсии и при диаметре оптического волокна 400 мкм обеспечивает поступление в измерительный канал преимущественно диффузно рассеянного отраженного излучения (без зеркальной компоненты).

После фиксации волоконно-оптического зонда на поверхности исследуемого органа по осветительному каналу 4 волоконно-оптического щупа от источника света 1 подается излучение, которое в зависимости от режима работы спектрометра является либо коротковолновым излучением, предназначенным для возбуждения флуоресценции, либо широкополосным – для измерения спектров отражения. Возникающее в результате освещения в объекте вторичное излучение поступает по детекторному каналу 5 на вход спектрометра 2, который с помощью компьютера 3 проводит регистрацию спектров флуоресценции или отражения. При быстром переключении режимов освещения и режимов регистрации спектрометра возможна их одновременная запись.

3. Устройство для динамической фиксации волоконно-оптического зонда на работающем сердце

Для проведения экспериментов на сердце мелких животных в условиях *in vivo* (когда сердце находится в организме) или в условиях *ex vivo* (когда функция изолированного сердца поддерживается за счет перфузии кристаллоидным раствором) разработано устройство динамической фиксации (рис. 2).

Устройство обеспечивает автоматическое перемещение зонда в такт с сокращением сердечной мышцы без потери контакта с его поверхностью. В его состав входит: штатив 15, штанга 16, узел тонкой подачи 17, механизм балансировки волоконно-оптического зонда 18 и держатель зонда 19. Штатив выполнен в виде основания с вертикальной стойкой, на которой с помощью поворотной системы 20 закрепляется штанга 16. Штатив располагается рядом с платформой, на которой фиксируется экспериментальное животное. Поворотная система позволяет поднимать и опускать штангу относительно платформы, изменять угол наклона и рабочую длину штанги, поворачивать штангу вокруг собственной оси. На штанге 16 закреплен узел тонкой подачи 17, позволяющий перемещать механизм балансировки зонда 18 в диапазоне ± 20 мм путем вращения

микрометрического винта 21. С его помощью зонд можно плавно опускать и поднимать, добиваясь контакта с объектом. Механизм балансировки служит для организации постоянного небольшого давления зонда на поверхность миокарда. Он включает в себя коромысло 22, винт 23, а также большой и малый балансировочные грузики 24 и 25, которые при перемещении по винту создают нужную компенсирующую силу, позволяющую изменять давление зонда на объект в пределах $1-10$ г/см². Зонд фиксируется на механизме балансировки с помощью держателя зонда 19. Задача механизма состоит в компенсации веса наконечника зонда, а также присоединенного к нему волоконного жгута 26 и шлангов 9 и 10, таким образом, чтобы при сокращении сердца он мог двигаться в такт с его биением за счет разворота вокруг оси балансировочного механизма 18, что позволяет сохранять контакт зонда с поверхностью сердца. Регулируя положение балансировочного грузика, можно с высокой точностью устанавливать нужное для этого давление зонда на объект. Балансировочный механизм необходим для проведения продолжительных экспериментов на сердце мелких животных в условиях *in vivo*, однако для однократной регистрации спектра флуоресценции его использование не обязательно.

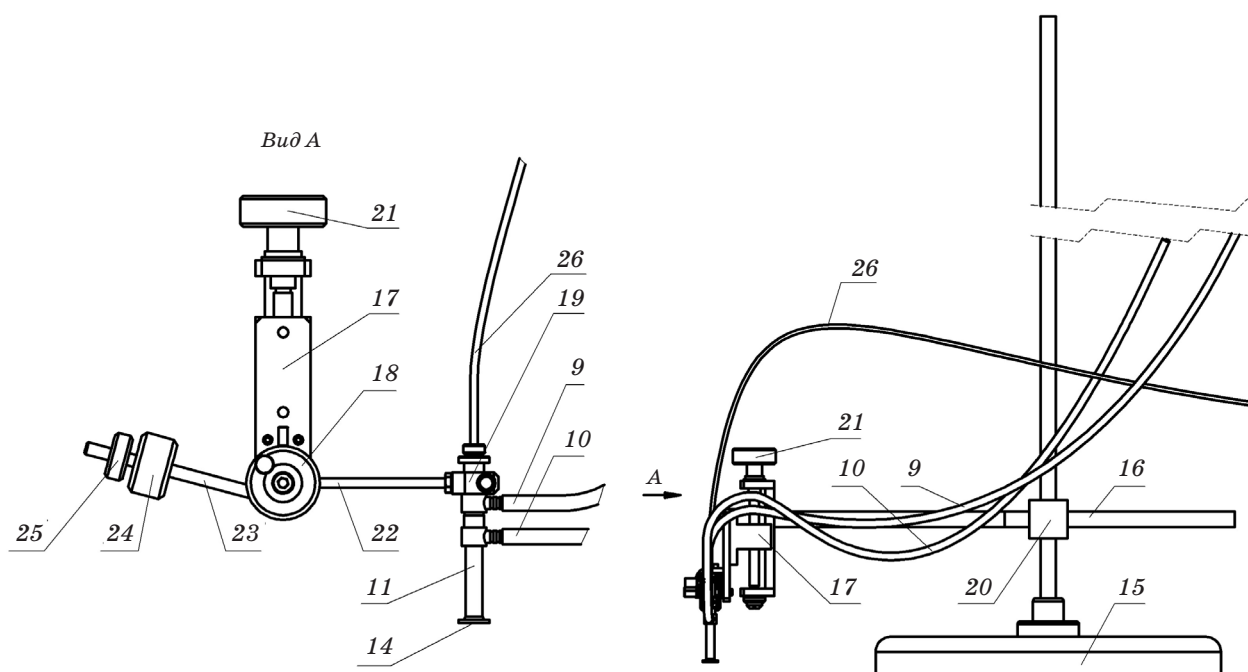


Рис. 2. Схема устройства для динамической фиксации волоконно-оптического зонда на работающем сердце.

4. Пример исследования ишемии миокарда *in vivo*

Для предотвращения ишемического-реперфузионного повреждения сердца при выполнении кардиохирургических операций с применением техники искусственного кровообращения необходим интраоперационный мониторинг метаболического статуса миокарда. Он может быть основан на измерении интенсивности аутофлуоресценции пиридиннуклеотида NAD, который является эндогенным внутриклеточным флуорофором. В условиях аноксии в клетках миокарда увеличивается количество его восстановленной формы – NADH, дающей свечение в видимом диапазоне длин волн при облучении ультрафиолетовым излучением. В окисленном состоянии это вещество не светится. Для разработки методики мониторинга в ПСПБГМУ им. И.П. Павлова совместно с Институтом экспериментальной медицины ФГУ ФМИЦ им. В.А. Алмазова проводятся исследования, в которых используется описанная аппаратура. Регионарную ишемию миокарда вызывали в острых экспериментах на крысах стока Вистар массой 250–300 г в условиях общей анестезии хлоралгидратом в дозе 420 мг/кг при искусственной вентиляции легких. Для создания обратимой ишемии-реперфузии миокарда под обций ствол левой коро-

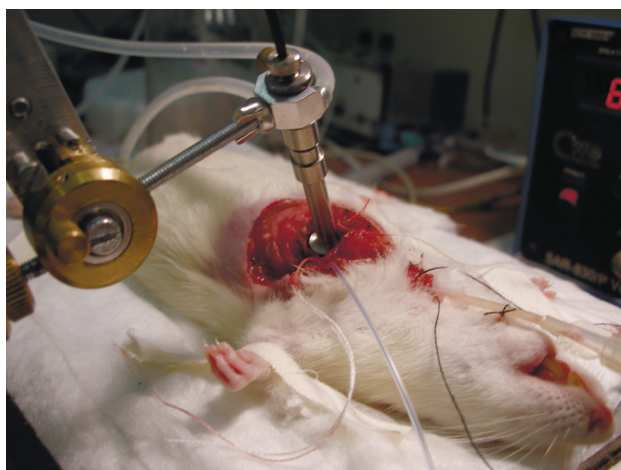


Рис 3. Фотография эксперимента по оценке метаболического статуса миокарда при регионарной ишемии в условиях *in vivo* с помощью волоконно-оптического щупа с насадкой для подачи воды и аспирации. Щуп приведен в контакт с сокращающимся сердцем с помощью устройства динамической фиксации.

нарной артерии подводили лигатуру с последующим формированием окклюдера. Данная методика широко используется в исследованиях метаболизма миокарда при ишемии, в том числе с целью уменьшения последствий ишемии-реперфузии [7].

Фотография разработанной оптико-волоконной спектрометрической системы, сделанная при воспроизведении регионарной ишемии миокарда крысы, показана на рис. 3. Слева от животного виден балансировочный механизм от устройства динамической фиксации волоконного датчика на поверхности работающего сердца крысы, а внутри операционной раны – волоконный щуп с насадкой для смыва крови.

Полученные в этих экспериментах спектры флуоресценции миокарда в состояниях перфузии и ишемии показаны на рис. 4. Регистрация спектров проводилась при возбуждении длиной волны 365 нм. Видно, что при ишемии (кривая 1) в результате перехода $NAD^+ \rightarrow NADH$ существенно возрастает интенсивность флуоресценции в области 470 нм по сравнению с перфузией (кривая 2). Для исследования динамики процесса ишемии/реперфузии проводилась непрерывная регистрация сигнала флуоресценции вблизи максимума эмиссии NADH на длине волны 470 ± 10 нм, а также сигнала на длине волны 380 ± 10 нм, обусловленного отражением части возбуждающего излучения от объекта, который используется нами в качестве референтного сигнала. Сдвиг референтного сигнала на 15 нм в длинноволновую сторону относительно центральной длины волны возбужда-

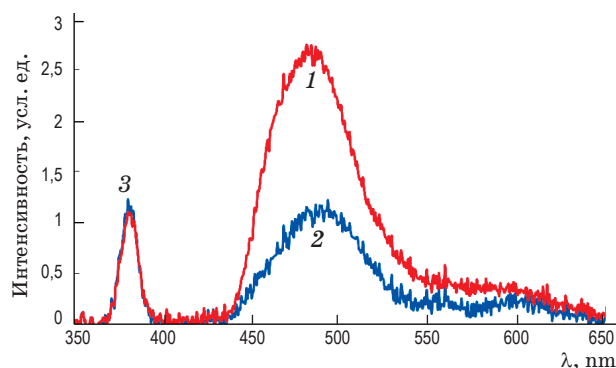


Рис. 4. Нормированные спектры аутофлуоресценции миокарда при возбуждении длиной волны 365 нм в состоянии ишемии (кривая 1) и перфузии (кривая 2). Нормировка произведена по пику полосы 3, вызванной отражением от объекта части возбуждающего излучения.

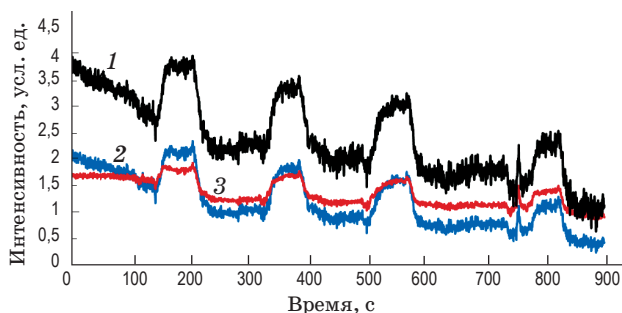


Рис. 5. Кривые изменения во времени сигнала флуоресценции (кривая 1) и сигнала отраженного возбуждающего света (кривая 2), а также их отношения (кривая 3) в процессе проведения повторных кратковременных эпизодов ишемии/реперфузии сердца крысы в условиях *in vivo*.

ющего светодиода 365 нм вызван особенностью встроенного в спектрометр коротковолнового отрезающего светофильтра, граница пропускания которого находится вблизи 380 нм. Кривые изменения этих сигналов, а также их отношения в процессе выполнения одного из экспериментов, показаны на рис. 5. Его цель заключалась в выяснении влияния кровенаполнения сосудов миокарда на модуляцию сигналов флуоресценции и отраженного света.

Во время выполнения этого опыта, который продолжался 15 минут, четыре раза в течение одной минуты производилась окклюзия левой коронарной артерии, что приводило к изменению сигналов. При этом благодаря устройству динамической фиксации волоконно-оптический зонд постоянно оставался в контакте

* * * * *

с сердцем, а благодаря наличию в нем каналов для подачи жидкости и канала аспирации, происходило непрерывное удаление крови в месте контакта щупа с поверхностью миокарда. Это обеспечивало независимость измерений от наличия крови в операционном поле. Что касается крови в сосудах миокарда, то прекращение ее подачи при окклюзии приводило к увеличению сигнала флуоресценции за счет изменения степени окислительно-восстановительного состояния ткани (кривая 1) и к увеличению отраженного сигнала за счет уменьшения потерь света, вызванных поглощением крови (кривая 2). При этом было показано, что изменение сигнала флуоресценции превышает изменение сигнала отражения примерно в 1,5–2 раза (кривая 3). Поэтому их отношение может использоваться в качестве меры ишемии, обеспечивающей большую стабильность измерительной процедуры по сравнению с измерением только флуоресценции.

Результаты данной работы будут использованы при разработке метода клинического контроля состояния сердца при осуществлении операций на сердце в условиях искусственного кровообращения.

Работа выполнена в рамках проекта “Создание аппаратно-программного комплекса для оценки функционального и метаболического статуса тканей с помощью флуоресцентной визуализации”. Государственное задание ФГБУ “ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова” Минздравсоцразвития России, Регистрационный № 01201256254, сроки выполнения: 2012–2014 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1996. V. 47. P. 555–606.
2. Папаян Г.В., Березин В.Б., Петрищев Н.Н., Галагудза М.М., Канг Ук. Спектрометр для флуоресцентно-отражательных биомедицинских исследований // *Оптический журнал.* 2013. Т. 80. № 1. С. 56–67.
3. Папаян Г.В., Журба В.М., Кишалов А.А., Галагудза М. М. Волоконный флуоресцентно-отражательный спектрометр с многоволновым возбуждением // *Оптический журнал.* 2014. Т. 81. № 1. С. 45–50.
4. Utzinger U., Richards-Kortum R. Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy // *Journal of Biomedical Optics.* 2003. V. 8. № 1. P. 121–147.
5. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics // *Laser Physics.* 2000. V. 10. № 6. P. 1188–1207.
6. 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.
7. Galagudza M., Blokhin I.O., Shmonin A.A., Mischenko K.A. Reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets // *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 2008. V. 8. № 1. P. 47–65.