

ПЕРСПЕКТИВИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ В СУЧАСНІЙ ДІАГНОСТИЦІ

Вінницький національний технічний університет

Анотація

Приведене наукове обґрунтування та розглянуто перспективи методу оптичної спектроскопії при проведенні фотодинамічної діагностики, який можна успішно використати для кількісної оцінки оптичних параметрів шкіри та отримання об'єктивної інформації про наявність чи відсутність та просторовий розподіл в ній різних біологічних компонентів і використання її для діагностики різних шкірних захворювань.

Ключові слова: флуоресцентна спектроскопія, хромофори, флуорофори.

Abstract

This paper presents a scientific substantiation and examines the prospects of the method of optical spectroscopy in conducting photodynamic diagnostics, which can be successfully used to quantify the optical parameters of the skin and to obtain objective information on the presence or absence of and the spatial distribution of various biological components in it, and its use for the diagnosis of various skin.

Keywords: fluorescence spectroscopy, chromophore, fluorophore.

Вступ

Фотонні технології у медицині сьогодні стали важливою ланкою державної політики охорони здоров'я у найбільш розвинутих країнах світу. Сьогодні в медицину впроваджується все більша кількість методів лікування, у яких застосовуються фотонні прилади. Широкого розвитку набули оптичні методи реєстрації та перетворення біомедичної інформації для неінвазивних методів діагностики. Це особливо актуально в зв'язку з тим, що проблема онкологічних захворювань шкіри займає значне місце в сучасній медицині. Рак, в тому числі і рак шкіри, є однією з основних причин смертності у світі. Тому рання, а особливо неінвазивна діагностика має велику перспективу розвитку в медицині. Розглядаючи фотонні технології для медицини, слід зауважити, що в них присутні такі риси, які роблять їх конкурентноспроможними з іншими технологіями. Лише джерела лазерного випромінювання (ЛВ) і світлодіоди (СД) мають такі унікальні можливості, як мікропроцесорне керування мультиспектральністю, динамічні властивості в широкому частотному діапазоні, часова та просторова когерентність ЕМВ.

Результати дослідження

Метою флуоресцентної спектроскопії є отримання інформації про діапазон довжин хвиль, в якому найвиразніше виявляються спектральні відмінності між нормальною біологічною тканиною і тканиною з патологією, та ідентифікація хромофорів, відповідальних за такі відмінності. Кількісна оцінка оптичних параметрів шкіри дає можливість отримувати об'єктивну інформацію про наявність чи відсутність та просторовий розподіл в ній різних біологічних компонентів і успішно використовувати її для діагностики різних шкірних захворювань.

Серед оптичних методів досліджень шкіри *in vivo* в даний час найбільший розвиток отримали методи відбивної і флуоресцентної спектроскопії. Відбите шкірою випромінювання та її флуоресценція несуть інформацію про структуру епідермісу і дерми, кількість і кровонаповненість кровоносних судин, просторовий розподіл хромофорів і флуорофорів всередині шкіри і їх концентрацію, інтенсивність метаболічних процесів, що відбуваються в шкірі. Обговорюються потенційні переваги і можливі області сумісного застосування відбивної і флуоресцентної спектроскопії шкіри для оцінки індексів еритеми і пігментації, визначення ступеня оксигенації і концентрації гемоглобіну [1].

Флуоресценція виникає після поглинання світла і пов'язана з електронним переходом із збудженого стану молекули в основний. Її інтенсивність визначається формулою

$$I(\lambda) = I_0(1 - 10^{-\varepsilon(\lambda)cd})\eta \frac{\Omega}{4\pi} \quad (1)$$

де $I(\lambda)$ — інтенсивність флуоресценції, а I_0 — інтенсивність падаючого світла, $\varepsilon(\lambda)$ - молярний коефіцієнт екстинкції, c – концентрація поглинаючих молекул, η - квантовий вихід флуоресценції, Ω - тілесний кут реєстрації ізотропного випромінювання флуоресценції.

У разі тонких зразків, наприклад моношарів клітин або зразків біопсії, що мають товщину декілька мікрометрів, вираз (1) можна апроксимувати формулою

$$I(\lambda) = I_0 \text{Ln}(10\varepsilon(\lambda)cd)\eta \frac{\Omega}{4\pi} \quad (2)$$

Флуоресцентна спектроскопія отримує широке використання завдяки розробці нових джерел світла, надчутливих багатоканальних оптичних аналізаторів, приймачів на основі ПЗС-структур, які характеризуються великою тимчасовою та просторовою роздільною здатністю [2].

Шкіра людини містить велике число різноманітних природних флуорофорів, які мають різні спектральні області поглинання і флуоресценції, різний квантовий вихід флуоресценції, час загасання флуоресценції, різний просторовий розподіл в товщині шкірної тканини. Для деяких флуорофорів характерним є перекриття області поглинання і флуоресценції, внаслідок чого випромінювання флуоресценції, що виходить з шкіри має складний спектральний склад. Крім того, в шкірі містяться також не флуоресцентні хромофори, такі, наприклад, як гемоглобін. Це поглинання ними випромінювання, що виходить з шкіри, приводить до виникнення в спектрі флуоресценції специфічних мінімумів і максимумів.

У міру збільшення довжини хвилі збуджуючого світла до формування спектру флуоресценції залучаються нові флуорофори, розташовані в глибших шарах шкіри.

Більшість біологічних компонентів, які або характеризують структуру шкірної тканини, або залучені в метаболічні або функціональні процеси, генерують флуоресцентну емісію в УФ і видимому спектральному діапазоні. В результаті різні морфо-функціональні стани шкіри, що відносяться до гістологічних, біохімічних і фізико-хімічних змін, можуть бути, в принципі, охарактеризовані на основі інформації, що отримується за допомогою карт збудження-емісії флуоресценції.

Серед ендогенних флуорофорів шкіри знаходяться різні форми нікотин-амідадениндинуклеотида (НАД) і кератин, що містяться в епідермісі, а також колаген дерми. Відновлена (НАДН) і окислена (Над+) форми НАД беруть участь в клітинному метаболізмі, а інтенсивність їх специфічної флуоресценції (максимуми флуоресценції, відповідно, близько 460 і 435 нм) використовується для диференціальної діагностики метаболічної дисфункції. Для колагену і еластину, які в основному локалізовані в межах ретикулярного шару дерми, збуджуюче світло та світло, що випромінюється, послаблюються за рахунок поглинання меланіну, а інтенсивність флуоресценції в діапазоні 400-480 нм послаблюється іншими хромофорами шкіри: гемоглобіном, порфіринами, каротиноїдами та інші [3].

При збудженні біологічних об'єктів ультрафіолетовим світлом ($\lambda < 300$ нм) спостерігається флуоресценція білків і нуклеїнових кислот. Проте квантовий вихід флуоресценції всіх складових нуклеїнових кислот близький до 10^{-4} - 10^{-5} , що відповідає часу життя збуджених станів, що знаходяться в пікосекундному діапазоні. Автофлуоресценція (АФ) білків обумовлена амінокислотами, триптофаном, тирозином і фенілаланином з максимумами поглинання відповідно на 280, 275 і 257 нм і максимумами випромінювання між 280 (фенілаланин) і 350 нм (триптофан). Флуоресценція колагену або еластину збуджується між 300 і 400 нм і має широкі емісійні смуги між 400 і 600 нм з максимумами близько 400, 430 і 460 нм. Зокрема, флуоресценція колагену і еластину може бути використана для розрізнення різних типів тканин і їх патологій, наприклад епітеліальній і сполучній тканині.

Відновлена форма кофермента нікотинамидадениндинуклеотида (НАДН) збуджується селективно в діапазоні довжин хвиль між 330 і 370 нм. НАДН сконцентрований в основному в мітохондріях, де він окислюється в межах дихального ланцюга, локалізованого на внутрішній мембрані мітохондрії. Його флуоресценція є відповідним параметром для розпізнавання ішемічних і неопластичних тканин. Було показано, що флуоресценція вільного і пов'язаного з білком НАДН чутлива до концентрації кисню. Було знайдено, що флавінмононуклеотид (ФМН) і

флавінадениндинуклеотид (ФАД) з максимумами збудження близько 380 і 450 нм також дають внесок у внутріклітинну флуоресценцію [3].

В даний час для вивчення анатомії і фізіології клітини можуть бути використані різноманітні екзогенні флуоресцентні фарбники. Такі фарбники, як флуоресцеїн і індоціанін зелений, використовуються для ангіографії або визначення об'єму крові в органах людини [3].

Спектри флуоресценції часто дають детальну інформацію про флуоресціюючі молекули, їх конформацію, зв'язки і взаємодію усередині кліток і тканин. Інтенсивність флуоресценції може бути зміряна як функція довжини хвилі емісії або збудження. Емісійний спектр є специфічним для будь-якого флуорофору і зазвичай використовується у флуоресцентній діагностиці. Флуоресцентні спектрометри для діагностики *in vivo* зазвичай використовують волоконно-оптичні системи і оптичний багатоканальний аналізатор (лінійку діодів або ПЗС-КАМЕРУ) як детектор випромінювання флуоресценції.

Принципова схема флуоресцентного спектрографа показана на рис. 1. Збуджуюче світло (наприклад, від ксенонової лампи високого тиску з безперервним спектром) фокусується на вхідну щілину монохроматора збудження, розкладається в спектр і далі монохроматичне випромінювання використовується для освітлення зразка. Частина ізотропного випромінювання флуоресценції від зразка потрапляє на щілину монохроматора і реєструється як функція довжини хвилі. Для реєстрації максимально можливої інтенсивності випущеного світла щілина 3 розташовується в безпосередній близькості від зразка, або випромінювання флуоресценції фокусується на щілину. Часто в обох монохроматорах використовуються ввігнуті дифракційні ґратки, які забезпечують спектральну роздільну здатність і одночасно фокусують падаюче світло на вихідні щілини, що дозволяє обійтись без додаткової колімуючої оптики.

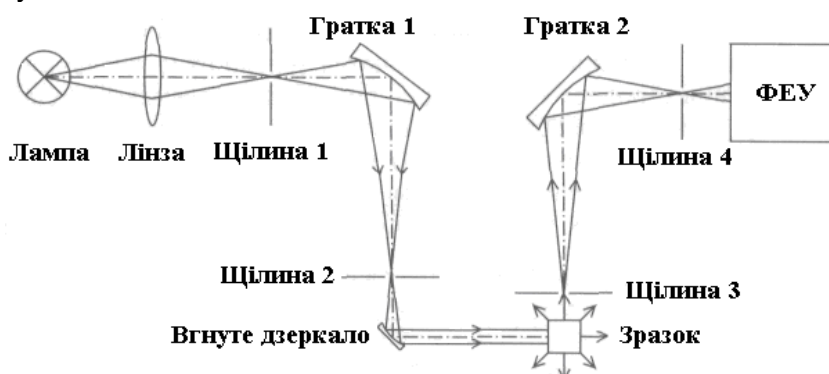


Рис. 1. Установка для збудження флуоресценції в емісійній спектроскопії

Висновки

Швидкий прогрес органічної хімії забезпечує основу для синтезу різноманітних флуоресцентних зондів. В даний час безліч флуоресцентних фарбників, що покривають весь видимий діапазон спектру, доступні для застосування в анатомії і фізіології клітин та у медичній діагностиці. Виявлення, за допомогою таких зондів ракових клітин, являється фактично важливим кроком для ранньої діагностики онкологічних захворювань.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Оптична біомедична діагностика. В 2 т. / Пер. з англ. під ред. В.В. Тучина. - М.: ФІЗМАТЛІТ, 2007. - 560 с. - ISBN 978-5-9221-0769-3.
2. Осінський В.І., Павлов С.В., Тужанський С.Є., Камінський О.С. Перспективність застосування світловипромінюючих квантово-розмірних структур для фотомедицини// Матеріали XXXIII міжнародної науково-практичної конференції "Застосування лазерів у медицині та біології". - 15-17 квітня 2010 р. - Ужгород, 2010. - с.166.
3. Jahne B. Practical Handbook on Image Processing for Scientific Applications. — Boca Raton: CRC Press, 1997.

Камінський Олександр Станіславович — провідний інженер кафедри загальної фізики, Вінницький національний університет, м.Вінниця, e-mail: kaminsky_1976@ukr.net

Павлов Сергій Володимирович — д.т.н, професор, проректор з наукової роботи, Вінницький національний технічний університет, м. Вінниця, e-mail: psv@vntu.edu.ua

Kaminsky Oleksandr Stanislavovich — leading engineer of the Department of General Physics, Vinnytsia National University, Vinnytsia, e-mail: kaminsky_1976@ukr.net

Pavlov Sergey Volodymyrovych — Ph.D., professor, vice-rector for scientific work, Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia, e-mail : psv@vntu.edu.ua