

ТЕОРИЯ И КОНСТРУИРОВАНИЕ

И.П. Шилов, Л.Ю. Кочмарев, Е.П. Новичихин

Лазерно-волоконный флуориметр для БИК-люминесцентной диагностики новообразований кожи и слизистых оболочек

Аннотация

Разработан лазерно-волоконный флуориметр для люминесцентной диагностики опухолей кожи и слизистых оболочек, работающий в ближнем ИК-спектральном диапазоне (900...1100 нм). Данный прибор, совместно с фармацевтической композицией на основе дикалиевой соли итербиевого комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX, обеспечивает достижение высоких значений люминесцентного диагностического контрастного индекса новообразование/нормальная ткань.

Введение

По данным ВОЗ, в мире наблюдается неуклонный рост онкологических больных. Только в РФ в 2018 году было зарегистрировано около 500 000 новых больных раком. Среди онкологических заболеваний на первые места начинают выходить кожные заболевания, что косвенно говорит о проблемах в области диагностики. Имеющиеся в настоящее время в распоряжении врачей спектральные устройства типа ЛЭСА-001 созданы в основном для спектрального диапазона 600...750 нм, дающего в некоторых случаях ложноположительные результаты из-за присутствия в биотканях эндогенных порфиринов [1]. Эта аппаратура работает с фотосенсибилизаторами (ФС) типа «Фотодитазин», «Фотофрин», «Аласенс», которые создают при проведении флуоресцентной диагностики опухолей токсичные концентрации синглетного кислорода, разрушающего как больные ткани, так и здоровые [2]. Наиболее перспективным для биомедицинских диагностических исследований является ближний ИК-диапазон (БИК) из-за большей глубины проникновения фотонов через биоткань и минимальной аутофлуоресценции в этом диапазоне спектра [3]. Для БИК-спектрального диапазона (800...1100 нм) с присущим ему так называемым окном прозрачности в настоящее время отсутствует оптоэлектронная аппаратура повышенной чувствительности для детектирования сигнала люминесценции малой интенсивности.

Целью рассматриваемой работы являлось создание макетного лазерно-волоконного флуориметра (ЛВФ) для БИК-люминесцентной диагностики (ЛД) рака кожи и слизистых оболочек на основе использования наноразмерных итербиевых комплексов порфиринов (ИКП), которые в диагностических концентрациях не создают токсичных концентраций синглетного кислорода.

Материалы и методы

При создании лазерно-волоконного флуориметра учитывались особенности разработанного ранее метода БИК-люми-

несцентной диагностики опухолей на основе использования ИКП [4], [5].

В основе метода лежат два явления: 1) избирательность накопления люминесцирующего маркера-фотосенсибилизатора в тканях новообразований и возможность его обнаружения по характерной люминесценции на освещаемой лазерным излучением области; 2) различия в интенсивности люминесценции здоровых и патологически измененных тканей при их возбуждении лазерным излучением в ультрафиолетовом диапазоне спектра.

Следует отметить, что ИКП являются перспективными субстанциями для ЛД опухолей в БИК-области спектра. Эти соединения характеризуются люминесцентным сигналом повышенной интенсивности в спектральном диапазоне 900...1100 нм, что позволяет детектировать их при концентрации порядка 10^{-4} М и ниже. Они обладают повышенными фотофизическими свойствами, в частности высоким коэффициентом экстинкции ($1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и временем жизни люминесценции до 20 мкс. Следует отметить, что 4f-люминесценция Yb-иона в ИКП наблюдается в достаточно широком спектральном БИК-диапазоне 920...1060 нм при возбуждении в диапазоне 300...630 нм. ИК-люминесценция Yb-ионов вызвана переходами 4f-электронов: $^4F_{5/2} \rightarrow ^2F_{7/2}$. Типичные спектры люминесценции для различных ИКП представлены на *рис. 1*. Как видно из *рис. 1*, в БИК-диапазоне спектра наблюдаются две основные люминесцентные полосы вблизи 930 и 980 нм (наиболее интенсивная) и многочисленные эмиссионные полосы в спектральном диапазоне 900...1100 нм. В связи с этим появляется возможность в конструкции ЛВФ отказаться от использования монохроматора, а использовать для сбора интегрального малого сигнала люминесценции весь спектральный диапазон 900...1100 нм при помощи системы интерференционных фильтров.

Разрабатываемый ЛВФ в связи с отсутствием в его структурной схеме стационарно устанавливаемого монохроматора, настроенного только на одну эмиссионную полосу с макси-

мальной интенсивностью люминесценции (~ 980 нм) [5], обеспечивает повышенный сбор полезного сигнала, что ведет к существенному увеличению чувствительности.

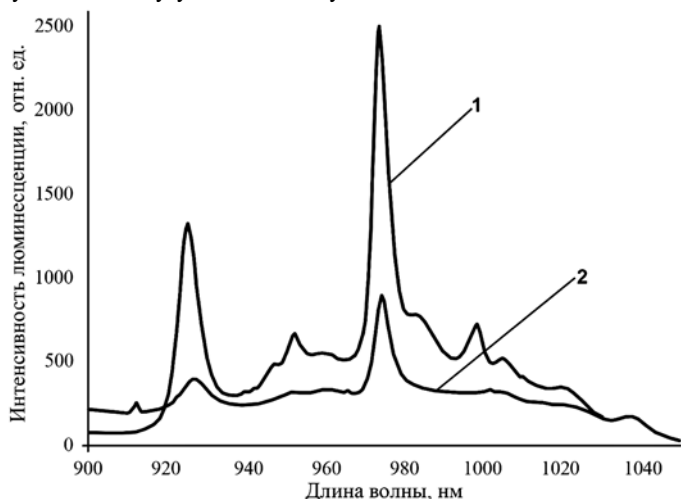


Рис. 1. Спектры люминесценции образцов ИКП:
1 – Yb-комплекс 5,10,15,20-тетра(1-N-(п-фторфенил)-3-(о-хлорфенил)пиразол-4-ил)порфирина (40%-ный раствор ДМСО, концентрация комплекса – 10^{-5} М); 2 – Yb-комплекс 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (40%-ный раствор ДМСО, концентрация комплекса – 10^{-5} М)

Результаты

Лазерно-волоконный флуориметр. Устройство и принцип работы

На рис. 2 представлена блок-схема макетного ЛВФ (разработки ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН) для БИК-люминесцентной диагностики опухолей кожи и слизистых оболочек.

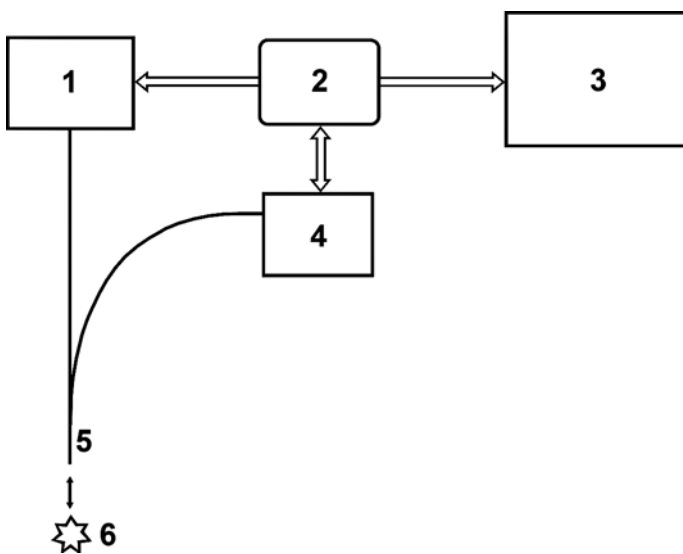


Рис. 2. Блок-схема ЛВФ: 1 – 405 нм-полупроводниковый лазер; 2 – блок модуляции и оцифровки; 3 – ноутбук; 4 – блок регистрации и обработки сигнала люминесценции; 5 – волоконно-оптический зонд; 6 – биоткань

Устройство базируется (рис. 2) на компактном полупроводниковом лазере 1 разработки НТЦ волоконно-оптических устройств (ВОУ), г. Москва; блоке модуляции и оцифровки 2 (БМО), включающем в себя аналогово-цифровой преобразователь (АЦП-ЦАП); ноутбуке 3; блоке регистрации и обработки сигнала люминесценции 4 (БРОСЛ), включающем в себя систему интерференционных фильтров, фотодиодного модуля (ФДМ) с предусилителем, системы линз; многожильном высокоапертурном волоконно-оптическом зонде 5 (ВОЗ) на основе кварцевых волоконных световодов (КВС) состава

$\text{SiO}_2\text{-F/SiO}_2$ (SiO_2 – сердцевина световода, $\text{SiO}_2\text{-F}$ – светоотражающая оболочка). Заготовки состава $\text{SiO}_2\text{-F/SiO}_2$ с повышенной числовой апертурой изготавливались на макетной СВЧ-плазмохимической установке (разработки ФИРЭ им. В.А. Котельникова РАН). Вытяжка КВС из получаемых заготовок осуществлялась по известной технологии с использованием графитовой печи.

На основе анализа спектральных потерь в диапазоне 0,18...1,10 мкм для создания центрального световода ВОЗ (обеспечивающего возбуждение люминесценции излучением на длине волны 405 нм) было выбрано оптическое волокно типа UV200/220/290-AL с металлическим (алюминиевым) защитным покрытием и числовой апертурой $NA = 0,30$. В качестве периферийных световодов для детектирования малого сигнала люминесценции в БИК-диапазоне спектра 900...1100 нм использовались оптические волокна типа WF200/220/245P с полиимидным защитным покрытием. На рис. 3 представлена конструкция 19-жильного высокоапертурного зонда повышенной чувствительности обнаружения ФС. Использование высокоапертурных ВОЗ (с числовой апертурой $NA \sim 0,30$ и более) на основе кварцевого стекла повышает производительность процесса ЛД, а также чувствительность всего устройства диагностики. Чувствительность ЛВФ по обнаружению ФС в режиме *ex vivo* в случае внутривенного его введения в организм лабораторных животных (мыши) для детектирования малого сигнала люминесценции в БИК-диапазоне спектра 900...1100 нм использовались оптические волокна типа WF200/220/245P с полиимидным защитным покрытием. На рис. 3 представлена конструкция 19-жильного высокоапертурного зонда повышенной чувствительности обнаружения ФС. Использование высокоапертурных ВОЗ (с числовой апертурой $NA \sim 0,30$ и более) на основе кварцевого стекла повышает производительность процесса ЛД, а также чувствительность всего устройства диагностики. Чувствительность ЛВФ по обнаружению ФС в режиме *ex vivo* в случае внутривенного его введения в организм лабораторных животных (мыши) для детектирования малого сигнала люминесценции в БИК-диапазоне спектра 900...1100 нм использовались оптические волокна типа WF200/220/245P с полиимидным защитным покрытием. Следует отметить, что в целом ряде спектрально-диагностических установок типа ЛЭСА (ООО «Биоспек») [6], которые используют в конструкции ВОЗ кварцевые волоконные световоды (КВС) подобного состава, но со стандартной числовой апертурой 0,20...0,22, чувствительность обнаружения ФС не превышала ~ 50 мкг/кг веса биобъекта (минимально определяемая концентрация ФС) [7].

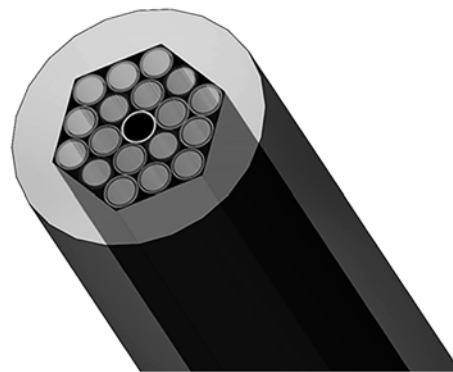


Рис. 3. Конструкция 19-жильного волоконно-оптического зонда ЛВФ

В качестве ИФ были использованы фильтры типа SL 930-1100. Их спектральные характеристики, выполненные на спектрофотометре «Shimadzu» UV-3600, представлены на рис. 4. Как видно из рис. 4, пропускание в оптическом диапазоне 900...1100 нм составляет вплоть до 80 %. При этом степень блокировки возбуждающего излучения составляет не менее 10^{-4} %.

Программа, установленная на ноутбуке, разработана в ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН и зарегистрирована в Реестре программ для ЭВМ (свидетельство № 2018617536). Она формирует сигнал, моделирующий световой поток и представляющий собой прямоугольный импульс с заданным периодом (меандр). Алгоритм обработки поступающих данных основан на идеологии синхронной фильтрации (синхронного усреднения). В нашем случае интерес представляет общая величина ответного сигнала, а не его форма, поэтому отпадает необходимость строго синхронизировать моменты снятия ответного сигнала с импульсами моделирующего сигнала. При обработке происходит отдельное усреднение сигнала на максимуме меандра и усреднение сигнала на минимуме меандра. Это позволяет практически избавиться от шума и получить информационный результат в виде разности (или отношения) этих двух величин, который показывает уровень накопления введенного вещества в исследуемой ткани.

Принцип работы ЛВФ следующий. Излучение от лазера 1 с регулируемой оптической мощностью (до 10 мВт) через центральный световод волоконно-оптического зонда 5 попадает на пораженную биоткань 6, в которой селективно накоплен ИКП. Посредством БМО 2 обеспечивается модуляция лазерного излучения. Частотой и амплитудой модуляции управляет программа, установленная на ноутбуке 3. Далее малый сигнал ИК-люминесценции иона иттербия после УФ-возбуждения вместе с фоновыми флуоресцентными сигналами от эндогенных порфиринов и других хромофоров биоткани (флавины, коллагены и т. д.) через приемные периферийные световоды ВОЗ поступает в БРОСЛ (4). Данный блок (состоящий из системы короткофокусных линз, интерференционных фильтров, ФДМ с предусилителем) устраняет попадание на ФДМ возбуждающего излучения (405 нм), а также фоновой аутолюминесценции, образующейся в основном в зеленом и красном диапазонах спектра. Полезный же сигнал ИК-люминесценции после усиления и оцифровки при помощи АЦП-ЦАП, который расположен в БМО 2, поступает на ноутбук 3 с разработанной программой.

На ноутбуке детектируемый сигнал представлен в виде усредненной за время получения сигнала интегральной интенсивности люминесценции от данной зоны локализации ВОЗ. Следует отметить, что ЛВФ с его волоконно-оптическим зондом по сути является биомедицинским фотонным локактором.

Основные технические характеристики устройства приведены в табл. 1.

В качестве диагностикума для проведения процедуры ЛД поражений кожи и слизистых использовалась фармацевтическая композиция (ФК) на основе дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди-(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (Уб-ДМДП). ФК в виде геля прошла соответствующую госсертификацию (№ РОСС RU.0001.510608) и получила название гель «Флюроскан».

При помощи разработанного устройства нами осуществлялся процесс изучения люминесцентного диагностического контрастного индекса (ЛДКИ) от различных участков кожи и слизистых оболочек. Значение ЛДКИ (y_s) оценивалось по формуле $y_s = I / I_0$, где I и I_0 – интегральные интенсивности БИК-люминесценции опухоли и других биотканей (например, соседней нормальной биоткани) соответственно.

Исследования ЛДКИ новообразование/норма при воспалительных и пролиферативных процессах в ранней диагностики рака шейки матки (РШМ) с применением разработанного макета ЛВФ проводятся в настоящее время в 1-м МГМУ им. И.М. Сеченова (МЗ РФ, Москва). Проведенные исследования показали, что интенсивность люминесценции от тканей

шейки матки без патологических изменений варьировалась от 0,016 до 0,026 мВ, в то время как интенсивность люминесценции от тканей РШМ с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями высокой степени (HSIL) увеличивалась до 0,75 мВ, т. е. более чем на порядок величины.

Таблица 1

Технические характеристики ЛВФ

Параметры фильтров	
Коэффициент пропускания (в полосе спектра 850...1000 нм), %	До 70
Коэффициент пропускания (в полосе фонового спектра 350...850 нм), %	< 0,001
Спектральный диапазон измерений, нм	900...1100
Фотодиодный модуль с предусилителем	S9269 («Hamamatsu»)
Пороговая чувствительность, фемтоВт	< 0,1
Волоконно-оптический зонд	
Тип волоконно-оптического зонда	Многожильный: 8, 13 или 19 жил
Тип световодов зонда	Кварц-кварц, SiO ₂ -F/SiO ₂
Числовая апертура световодов	До 0,30
Оптическая мощность лазера, мВт	До 30
Частота модулирующего сигнала, Гц	10...30
Рабочая длина волны лазера, нм	405
Чувствительность обнаружения препарата, мкг/кг веса биообъекта (мышь) в режиме <i>ex vivo</i>	До 20,0

Заключение

Разработанная конструкция макетного ЛВФ БИК-спектрального диапазона в сочетании с применением созданной ФК обеспечивает достижение высоких значений ЛДКИ новообразование/норма (5...50), что позволяет с повышенной точностью определять границы распространенности кожных новообразований. При этом возможно также изучение накопления ИКДГ при воспалительных и пролиферативных процессах с целью выявления их отличий от раковых заболеваний, контроля наличия или отсутствия пролиферации клеток и изменения накопления ИКДГ в процессе лечения.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0030-2019-0009.

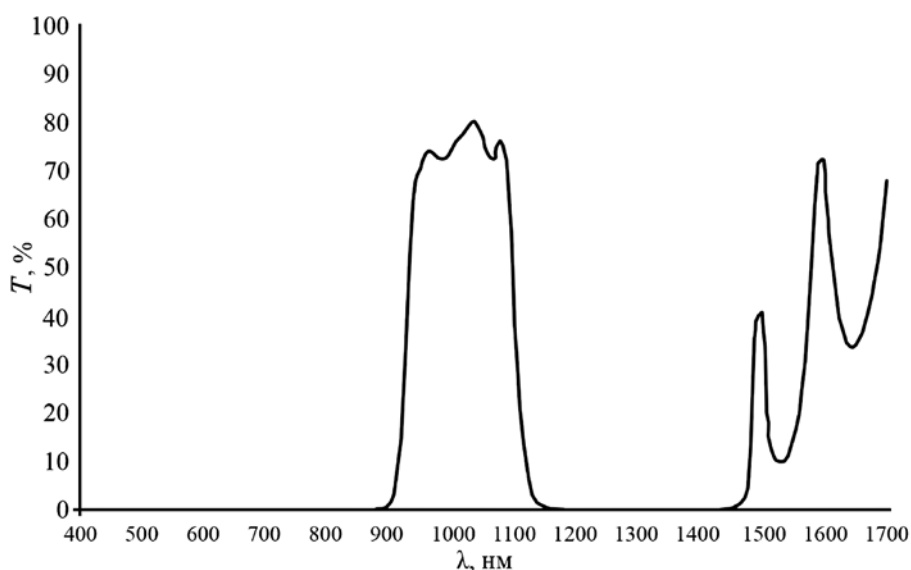


Рис. 4. Спектральные характеристики интерференционных фильтров типа SL 930-1100

Список литературы:

1. Zaak D., Alexander K., Stepp H. et al. Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy // *BJU Int.* 2005. Vol. 96. № 2. PP. 217-222.
2. Алексеев Ю.В., Румянцева В.Д., Шилов И.П., Иванов А.В., Шумилова Н.М., Миславский О.В. Перспективы применения иттербиевых комплексов порфиринов в клинической практике // *Лазерная медицина.* 2017. № 2. С. 20-25.
3. Perumal V., Sivakumar P.M., Zarrabi A. et al. Near infra-red polymeric nanoparticle based optical imaging in cancer diagnosis // *Photochem. Photobiol., B: Biology.* 2019. Vol. 199. P. 111630.
4. Ivanov A.V., Rumyantseva V.D., Shchamkhalov K.S., Shilov I.P. Luminescence diagnostics of malignant tumors in the IR spectral range using Yb-porphyrin metallocomplexes // *Laser Phys.* 2010. Vol. 20. № 12. PP. 2056-2065.
5. Gaiduk M.I., Grigoryants V.V., Mironov A.F. et al. Fibre-laser IR-luminescence diagnostics of malignant tumours using rare earth porphyrins // *Photochem. Photobiol., B: Biology.* 1990. Vol. 7. № 1. PP. 15-20.
6. Лощенов В.Б., Стратонников А.А., Волкова А.И., Прохоров А.М. Портативная спектроскопическая система для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией // *Ж. Российского химического общества им. Д.И. Менделеева.* 1998. Т. XLII. № 5. С. 50-53.
7. Установка ЛЭСА-01-БИОСПЕК / www.biospec.ru (дата обращения: 27.04.2020).

Игорь Петрович Шилов,
канд. техн. наук, ведущ. научный сотрудник,
зав. лабораторией,
Леонид Юрьевич Кочмарев,
ст. научный сотрудник,
Евгений Павлович Новичихин,
канд. техн. наук, ведущ. инженер,
сотрудник лаборатории,
ФГБУН «Институт радиотехники
и электроники им. В. А. Котельникова РАН»,
Фрязинский филиал,
г. Фрязино, МО,
e-mail: laserlab@ms.ire.rssi.ru

А.Г. Гудков, В.Ю. Леушин, И.А. Сидоров, С.В. Агасиева, И.О. Порохов,
А.В. Чечеткин, М.И. Лазаренко, Н.А. Ветрова, Г.А. Гудков, В.Г. Тихомиров

Устройства для герметизации полимерных контейнеров с кровью и ее компонентами

Аннотация

Представлены результаты конкурентоспособных разработок устройств для герметизации трубок полимерных контейнеров с кровью и ее компонентами, которые предназначены для применения на станциях переливания крови, подвижных мобильных формированиях при заготовке донорской крови.

Введение

В связи с развитием новых направлений науки и техники, в частности биотехнологии, современной медицинской техники, фармацевтической и пищевой промышленности и т. д., возникает острая необходимость в оборудовании, позволяющем герметизировать в полимерную тару ценные продукты и препараты. Причем в ряде случаев перегрев герметизируемых объектов, например препаратов на основе крови, недопустим. В последние десятилетия в мировой и отечественной практике произошли революционные изменения в технологиях заготовки, переработки и применения донорской крови: отказ от использования цельной крови, переход к селективному производству и применению компонентов и препаратов крови; замена стеклянной и металлической тары на одноразовые полимерные контейнеры; внедрение информационных технологий «закрытых систем», исключающих контакт крови с окружающей средой [1].

Высокочастотная сварка полимерных материалов нашла широкое применение в медицине [2]. Одним из ее важнейших применений является герметизация полимерных контейнеров для заготовки крови и ее компонентов [3]. Данный способ высокочастотной сварки используется во всех устройствах для сварки трубок полимерных контейнеров зарубежных производителей [«Baxter» (США), «Therumo» (Япония), «Fresenius» (Германия)]. Однако для большинства российских потребителей основным фактором, ограничивающим приобретение импортного оборудования, является его высокая цена.

Полимерный контейнер представляет собой замкнутую эластичную, герметичную и стерильную систему, главными частями которой являются основная емкость для крови, дополнительные емкости для компонентов и магистрали (соединительные трубки), которые изготовлены из мягкого поливинилхлорида (ПВХ), пластифицированного диоктилфталатом. Для исключения взаимодействия крови с внешней средой и сохранения качества ее компонентов при хранении и транспортировании необходимо герметизировать полимерный контейнер.

Авторами были разработаны устройства для герметизации трубок полимерных контейнеров с кровью и ее компонентами методом высокочастотной сварки их магистралей.

Основная часть

В процессе высокочастотной сварки магистралей полимерных контейнеров для заготовки крови и ее компонентов к специализированному устройству предъявляются высокие требования, так как оно должно обеспечивать максимальную изоляцию крови и ее компонентов от воздействия внешней среды. Вследствие этого сварное соединение после проведения процесса должно быть герметично. Полимерный контейнер, используемый для хранения, транспортирования и переливания крови и ее компонентов, должен обеспечивать: сохранение качества крови и ее компонентов; эффективное и безопасное взятие крови, хранение, разделение крови на компоненты и переливание содержимого; сведение к минимуму заражения, особенно бактериального; отсутствие воздушной эмболии при