

© АРУТЮНЯН А.В., ЧЕРДАНЦЕВ Д.В., САЛМИН В.В., СКОМОРОХА Д.П.,
САЛМИНА А.Б.

УДК 616.37-002-076-073.586:615.849.19.03

ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ЛАЗЕР-ИНДУЦИРОВАННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

А.В. Арутюнян, Д.В. Черданцев, В.В. Салмин, Д.П. Скомороха, А.Б.

Салмина

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздравсоцразвития РФ, ректор –
д.м.н., проф. И.П. Артюхов; кафедра и клиника хирургических болезней им.
проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО, зав. – д.м.н.,
проф. Д.В. Черданцев; кафедра биохимии с курсами медицинской,
фармацевтической и токсикологической химии, зав. – д.м.н., проф. А.Б.
Салмина; Сибирский федеральный университет, ректор – акад. РАН Е.А.
Ваганов; Институт инженерной физики и радиоэлектроники, кафедра
фотоники и лазерных технологий, зав. – д.ф.-м.н., профессор В.В. Слабко.

Резюме. *Представлены результаты применения лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии при экспериментальном панкреатите. Обсуждается возможность использования флуоресцентной визуализации и спектроскопии ткани поджелудочной железы в качестве интраоперационного экспресс-метода в диагностике некроза поджелудочной железы.*

Ключевые слова: *лазер-индуцированная флуоресценция, оптическая биопсия, панкреонекроз.*

Арутюнян Алена Владимировна – аспирант кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО КрасГМУ; e-mail: alena_aav_84@mail.ru.

Черданцев Дмитрий Владимирович – д.м.н., проф., зав. кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ПО КрасГМУ; e-mail: gs7@mail.ru.

Салмин Владимир Валерьевич – к.ф.-м.н., доцент каф. фотоники и лазерных технологий Института инженерной физики и радиоэлектроники СФУ; e-mail: vsalmin@gmail.com.

Актуальное направление научных исследований в области хирургической панкреатологии - определение объема некроза поджелудочной железы в процессе хирургического вмешательства, так как именно от этого показателя зависит тяжесть панкреатита, прогноз и дальнейшая тактика лечения. В настоящее время существует несколько подходов к определению этого параметра: 1) визуальный осмотр поджелудочной железы [1], однако недостатком метода является сложность дифференцировки зон некроза ввиду наличия подкапсульных геморрагий (пропитывания геморрагическим выпотом тканей железы), к тому же деструктивные изменения даже при тотальном поражении имеют вид очагов большей или меньшей величины; 2) ультразвуковое сканирование, которое, однако, не позволяет дифференцировать зону некроза и здоровую ткань [3] КТ с болюсным контрастным усилением, этот метод является «золотым стандартом» в диагностике [9], но его не используют интраоперационно, т.к. возможно увеличение площади некроза в ответ на введения контраста. В связи с этим разработка новых методов определения объема некротизированной ткани поджелудочной железы в интраоперационном периоде – одно из важных направлений экспериментальной хирургии и медицинской визуализации.

В современной медицинской диагностике широкое распространение получили оптические методы исследования живых тканей *in situ*, объединенные названием «оптическая биопсия». Применение оптической биопсии, в отличие от обычной биопсии, предполагает, что ткань не извлекается и не модифицируется тем или иным способом (например, для гистологического исследования), а используется та или иная форма оптических измерений, часто спектроскопических, выполняемых неинвазивно или минимально инвазивно с целью поставить диагноз, на месте, *in vivo* и в режиме реального времени. В оптической биопсии используются как оптическая спектроскопия – абсорбционная, флуоресцентная, спектроскопия комбинационного рассеяния света [5], так и методы медицинской оптической визуализации – оптическая когерентная томография, конфокальная лазерная эндомикроскопия, эндоскопия. Основное преимущество использования оптической биопсии по сравнению с другими способами прижизненного исследования органов и тканей заключается в высокой скорости проведения анализа. Зачастую результат может быть получен в режиме реального времени. Уникальным свойством оптической биопсии по сравнению с другими средствами медицинской

визуализации является возможность прямого исследования метаболических превращений в клетках живых тканей.

Среди методов оптической биопсии особое место занимает анализ люминесценции живых тканей. Параметры люминесценции весьма чувствительны к состоянию микроокружения флуоресцирующего агента (флуорофора), что позволяет отслеживать степень его агрегации, свойства микроокружения, включая полярность и жесткость среды, наличие поблизости зарядов и молекул-акцепторов энергии электронного возбуждения. Флуоресцентные методы оптической биопсии можно условно разделить на два класса: 1) методы, основанные на регистрации флуоресценции эндогенных флуорофоров – аутофлуоресценции [10]; 2) методы, использующие различные экзогенные флуоресцирующие соединения - флуоресцентные метки и зонды, вводимые в ткань для визуализации исследуемых процессов. К настоящему времени накоплен значительный экспериментальный материал по использованию лазер-индуцированной аутофлуоресцентной спектроскопии в диагностических целях при операционном вмешательстве в гастроэнтерологии, кардиохирургии, определены основные тканевые флуорофоры, разработаны различные прототипы установок для клинического использования [9, 14], предложено большое количество методик изучения типовых патологических процессов (ишемия, воспаление, неоплазия, дегенеративные изменения). Нами ранее продемонстрирована высокая эффективность использования метода лазерно-индуцированной флуоресцентной спектроскопии в интраоперационной дифференциальной диагностике воспаления при перитоните [4]. Вместе с тем, этот метод не был тестирован для оценки некроза ткани *in situ* при остром панкреатите.

Существуют различные флуоресцентные методы диагностики острого панкреатита. Возможен анализ, основанный на регистрации флуоресценции эндогенных порфиринов, и визуализации флуоресцирующей ткани [7]. Возможно проведение оптической биопсии методом тримодальной системы, включающей в себя анализ полученных спектров флуоресценции, коэффициента отражения и рассеяния света, что позволяет определить структуру и состав ткани, как *in vivo*, так и *in vitro* [8]. Мульти模альные оптические системы и методы спектроскопии производят спектроскопический анализ биологических тканей и классифицируют ткань поджелудочной железы, используя флуоресцентную, отражательную спектроскопию и спектроскопию с временным разрешением [12]. Применение таких методов дает возможность в реальном времени одновременно характеризовать ткань и поставить диагноз. Такие системы и методы могут использоваться для проведения биопсии во время операции.

Цель исследования: обосновать возможность применения лазер-индуцированной аутофлуоресценции для объективной дифференцировки очага некроза и здоровой ткани, идентифицировать спектральные критерии для прогнозирования течения острого панкреатита в эксперименте.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на беспородных кроликах-самцах массой 2,5-3,0 кг (n=30), в соответствии с этическими нормами обращения с животными, с разрешения Биоэтической комиссии и Локального этического комитета Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, а также требованиями «Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей». Все кролики содержались в стандартных условиях и на стандартном рационе вивария.

Моделирование острого экспериментального панкреатита осуществлялось по методике - термокоагуляция долек поджелудочной железы [6]. Площадь коагуляции составляла 20% от общей площади передней поверхности поджелудочной железы. Данная модель была выбрана с учетом ее максимальной приближенности к клинике острого панкреатита человека: развитие острого экспериментального панкреатита у животных сопровождается наличием всех фаз острого панкреатита, наблюдающихся у людей.

Общая анестезия животных обеспечивалась внутрибрюшинным введением 1% раствора тиопентала натрия в дозе 70 мг на 1 кг массы тела. Для воспроизведения острого экспериментального панкреатита выполнялась верхнесрединная лапаротомия, производилась термокоагуляция участка поджелудочной железы портативным термокоагулятором СВЕТ-1, со временем экспозиции стандартно 15 секунд всем опытным животным, до образования участка некроза 1,0 x 1,0 см. Поверхность ткани промывалась физиологическим раствором и раствором Хенкса для удаления остатков крови и тканевой жидкости.

Аутофлуоресценция ткани поджелудочной железы регистрировалась *in situ* в зоне некроза, переходной зоне и здоровой ткани, с помощью экспериментального лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения [14]. Для записи спектров флуоресценции использовался бесконтактный метод: оптический зонд устанавливался над участком исследуемой ткани размером 2x2 мм и оставался неподвижным в течение периода записи спектра над каждой зоной. Спектры флуоресценции записывались *in situ* с нескольких участков исследуемых тканей каждого кролика в диапазоне 390-590 нм с шагом в 10 нм. Для возбуждения аутофлуоресценции ткани использовалось излучение УФ

импульсного лазера на молекулярном азоте (337,1 нм). Частота повторения импульсов лазерного излучения составила 500 Гц, энергия импульса – 50 мкДж.

Данные измерений лазерным спектрофлуориметром представлялись в виде двумерного массива, где $I(i,j)$ i – определяет номер серии эксперимента, j - индекс длины волны. Обработка данных включала:

А). Нормировку, которая позволяла сравнивать спектры, полученные в разных сериях, и устраняла амплитудные искажения, вызванные различием расстояния от волоконного датчика до объекта. Нормировка осуществлялась делением значений интенсивности на разных участках спектра на среднее значение интенсивности, полученное по всему спектру.

$$i(l_k) = N \frac{I(l_k)}{\sum_{k=1}^N I(l_k)} \quad (1)$$

Нормированные на среднее значение спектры разносились на соответствующие три группы.

Б). Вычисление средних нормированных спектров по группе.

$$J(l_k) = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M i_m(l_k),$$

$$s_J(l_k) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{m=1}^M (i_m(l_k) - J(l_k))^2} \quad (2)$$

где: M – размер выборки.

В). Нахождение нормированного разностного спектра

$$\Delta J_s(l_k) = \frac{J'(l_k) - J''(l_k)}{\sqrt{s_J'^2(l_k) + s_J''^2(l_k)}} \quad (3)$$

Нормированный разностный спектр выявляет наиболее значимо различные участки спектров в исследуемых выборках. В качестве этих участков выбирались длины волн, соответствующие максимумам и минимумам нормированного разностного спектра. Критерием значимости выбиралось превышение амплитуды нормированного разностного спектра на величину, большую или равную 1, что соответствовало различию между спектрами на выбранном интервале на величину, превышающую стандартное отклонение σ .

Документирование изображения осуществлялось с помощью цифровой фотокамеры Panasonic Lumix, в режиме длительной экспозиции в затемненном помещении при освещении излучением лазерного спектрофлуориметра при

установленном на расстоянии 0,2 м над участком ткани оптоволоконного зонда и при комнатном освещении.

Статистический анализ полученных результатов включал методы описательной статистики – определения среднего арифметического и стандартного отклонения. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартное отклонение. Для определения уровня значимости различия средних значений в выборках мы использовали Т-тест. Нормальность распределения в пределах выборки проверяли графически с использованием функции НОРМСТОБР(Р) пакета MS Excel. Коэффициент корреляции линейной регрессии в выборках $R^2 > 0,975$.

Результаты и обсуждение

Известно, что тяжесть экспериментального острого панкреатита напрямую коррелирует с интенсивностью некроза и имеет обратную зависимость от выраженности апоптоза [13].

У животных контрольной группы поджелудочная железа расположена позади и кнаружи от желудка, в брыжейке; она бледно-розового цвета, состоит из отдельных долек. На рис. 1 представлена поджелудочная железа А – при естественном освещении (неизменная ткань), В – при ультрафиолетовом освещении (неизменная ткань), Б – при естественном освещении (неизменная ткань с участком некроза), Г – при ультрафиолетовом освещении визуализируется участок панкреонекроза.

С помощью аутофлуоресценции при УФА возбуждении четко определялся участок панкреонекроза из-за резкого снижения его аутофлуоресценции. После обнаружения точных границ некротизированной и здоровой ткани поджелудочной железы записывались спектры флуоресценции с разных участков.

На рис. 2 представлены нормированные спектры флуоресценции некротизированной и интактной ткани поджелудочной железы при возбуждении УФ лазерным излучением с длиной волны 337,1 нм. Характерный пик люминесценции на длине волны 465-470 нм обусловлен люминесценцией НАД(Ф)Н, являющимся основным тканевым флуорофором при УФА облучении. Положение наиболее выраженных пиков нормированного разностного спектра представленного на рис. 3 - минимум на длине волны 470 нм, который соответствует пику люминесценции НАД(Ф)Н, максимум на длине волны 540 нм, который соответствует пику β – полосы оксигемоглобина. Менее выраженный пик в области 410-430 нм может быть также приписан пикам полос Соре окси- и дезоксиформ гемоглобина. Таким образом, на фоне общего снижения интенсивности аутофлуоресценции, вызванного уменьшением пула НАД(Ф)Н, происходит снижение самопоглощения излучения флуоресценции на пиках полос окси- и дезоксиформ гемоглобина, что, очевидно, вызвано локальными нарушениями микроциркуляции. Мы полагаем, что развитие некроза ткани поджелудочной железы ассоциировано со снижением флуоресценции НАД(Ф)Н вследствие его свободно-радикального окисления в условиях нарастающего окислительного стресса и нарушения регенерации пиридиновых нуклеотидов из-за развившейся в ткани энергетической катастрофы, обусловленной деполяризацией мембран митохондрий и истощением АТФ, чему способствует гипоксия, обусловленная микроциркуляторными изменениями [11].

Мы использовали отношение интенсивностей люминесценции на длинах волн 540 и 470 нм для получения спектрального критерия, позволяющего дифференцировать здоровую и некротическую ткань. В зоне некроза этот показатель составил $0,20 \pm 0,08$, что достоверно ($p < 0,001$) выше контрольного значения ($0,127 \pm 0,04$).

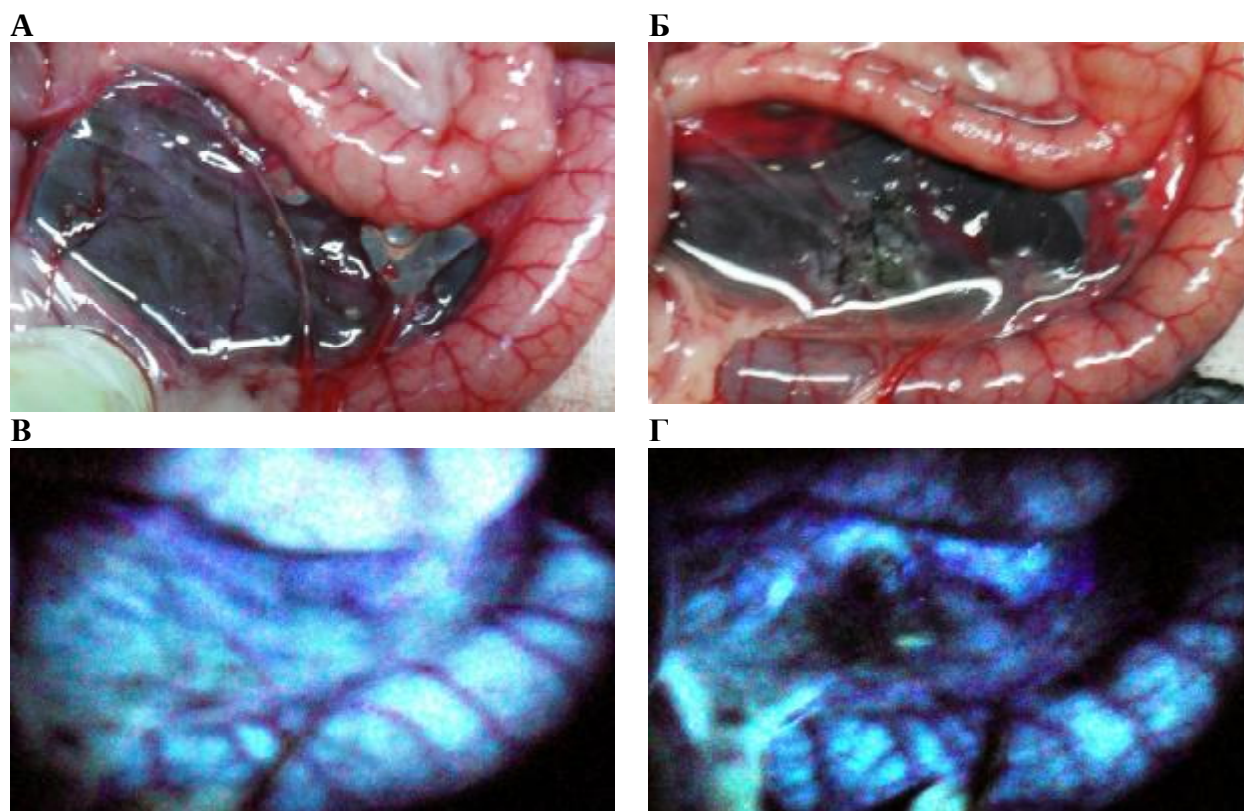


Рис. 1. Поджелудочная железа в разных режимах освещения.

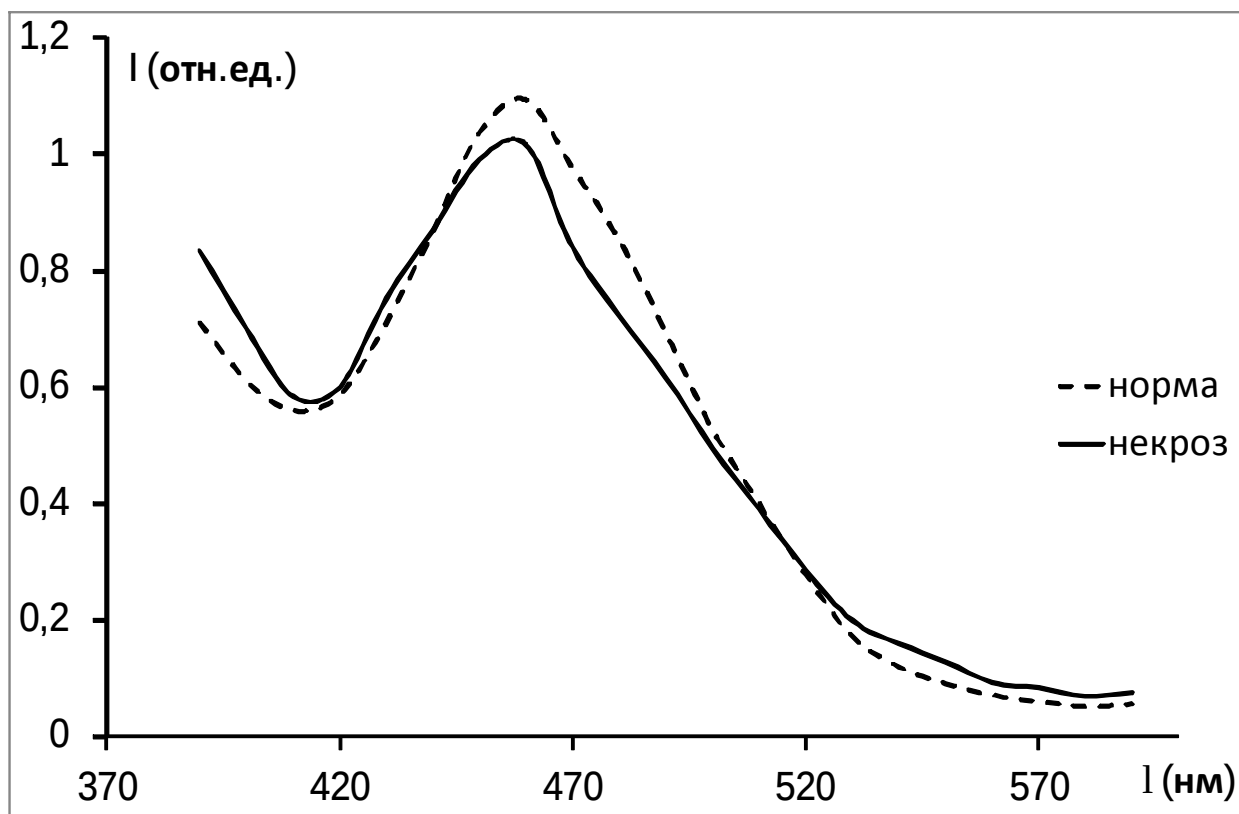


Рис 2. Нормированные спектры лазер-индуцированной аутофлуоресценции поджелудочной железы в группах норма, некроз.

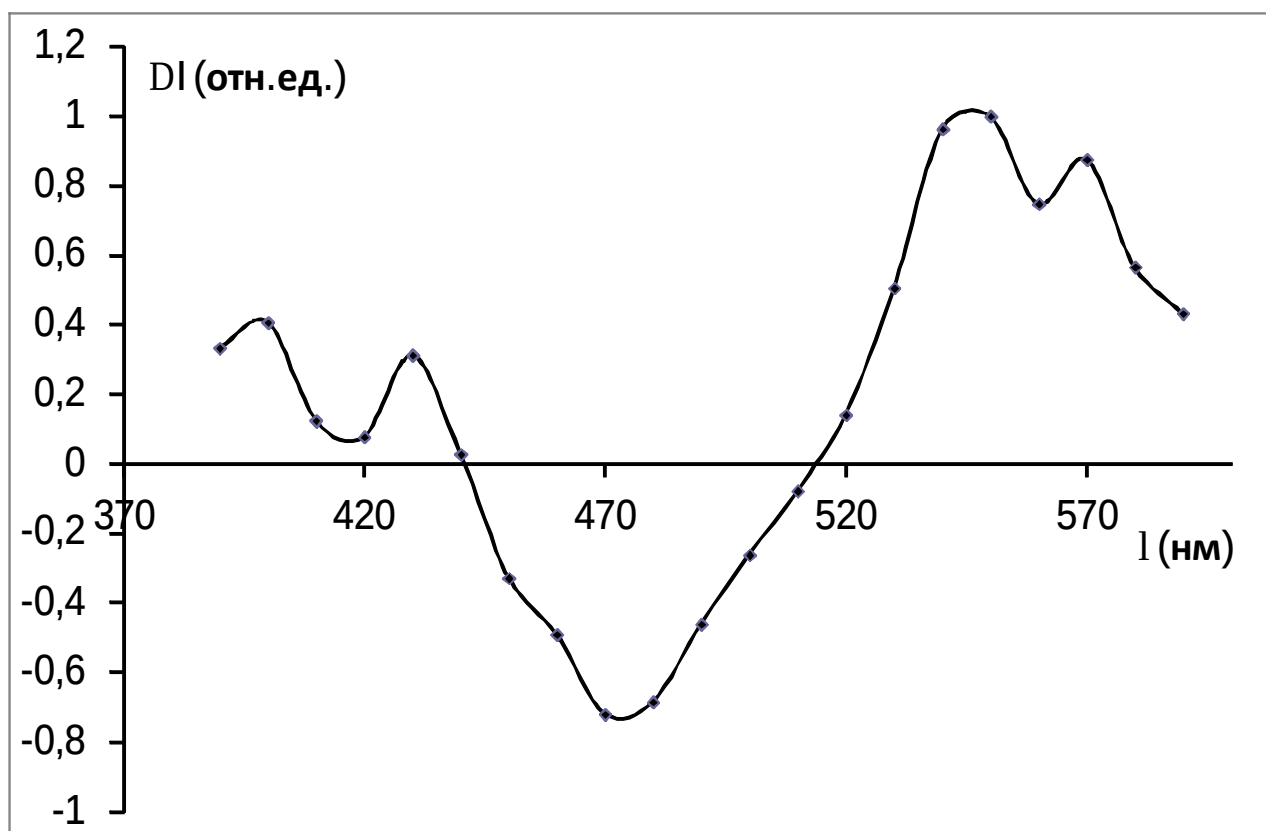


Рис 3. Нормированный разностный спектр ткани поджелудочной железы по группам норма-некроз.

Таким образом, на основании экспериментальных данных мы полагаем, что снижение интенсивности аутофлуоресценции ткани в зоне панкреонекроза по отношению к здоровой ткани является критерием для объективной оценки объема поражения поджелудочной железы при панкреонекрозе на ранних стадиях. Этот подход перспективен для разработки интраоперационного экспресс-метода оценки тяжести острого панкреатита и распространенности деструктивного процесса в железе.

INTRAOPERATIVE LASER-INDUCED FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN EXPERIMENTAL PANCREATITIS

A. V. Arutyunyan, D. V. Cherdantsev, V. V. Salmin,
D. P. Skomorokha, A. B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky,
Siberian Federal University

Abstract . Here are given the results of using the laser-induced fluorescence spectroscopy in experimental pancreatitis. The possibility of using fluorescence visualization and spectroscopy of pancreatic tissue as intraoperative rapid method in the diagnosis of pancreatic necrosis.

Key words: laser-induced fluorescence, optical biopsy, pancreatic necrosis.

Литература

1. Атанов Ю. П. Гнойный панкреатит // Хирургия – 1997. – № 8. – С. 20-24.
2. Зубарев А. В., Каленова И. В., Башилов В. П. и др. Современная ультразвуковая диагностика объемных образований поджелудочной железы // Медицинская визуализация. – 2001. – № 1. – С.12-17.
3. Минько Б. А., Пручанский В. С., Корытова Л. И. Комплексная лучевая диагностика заболеваний поджелудочной железы. – СПб.: Гиппократ, 2001. – 134 с.
4. Салмин В. В. Спектрофлуориметрический метод диагностики перитонита // Вестник КрасГУ. Серия физ.-мат. науки. – 2006. – №9. – С. 43-47.
5. Тучин В. В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2010. – 352 с.

6. Шалимов С. А., Радзиховский А. П., Кейсевич Л. В. Руководство по экспериментальной хирургии. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.
7. Detecting and mapping of inflamed zones in a living tissue: US 6393315 B1 US: / P. M. Aprahamian, F. Heisel, A. Lucia, J. A. Miehe, M. Sowinska, M. Whelan; Issuing Organization; Google Patents - 21 May 2002; - P. 060501
8. Georgakoudi, I. Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus // Gastroenterology - 2001. - Vol. 120, 7. - P. 1620-1629.
9. Loschenov V. B. Portable spectroscopic system for fluorescent diagnostics and photodynamic therapy // Russian Chemical J. – 1998. – Vol 42, № 5. – P. 50-53.
10. Monici M., El-Gewely M. R. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications // Biotechnology Annual Review. – 2005. – P 227-256.
11. Mukherjee R., Criddle D. N., Gukvoskaya A. Mitochondrial injury in pancreatitis // Cell Calcium. – 2008. – Vol 44, № 1. – P 14-23.
12. Multimodal Spectroscopic Systems and Methods for Classifying Biological Tissue: US 2010/0330611 A1 US: / M. A. Mycek, M. Chandra, J. Scheiman, R. H. Wilson, D. Simeone, B. McKenna, J. Purdy; Issuing Organization; Google Patents - 14 Sep 2010. – 23 p.
13. Odinkova I. V., Sung K. F., Mareninova O. A. et al. Mitochondrial mechanisms of death responses in pancreatitis // Journal of gastroenterology and hepatology. – 2008. – Vol 23, – P 25-30.
14. Popov A. Y., Salmin V. V., Fursov A. A. et al. Automated laser spectrofluorimeter for monitoring of myocardial metabolism // Proc. Proceedings of SPIE, 2006. – Vol 6284. – P. 62840J.