ПЕТРИЩЕВ Н. Н. [1,2], КИМ С. В.[3],
БЕРЕЗИН В. Б.[3], ПАПАЯН Г. В.[1,2]

Автофлуоресцентная визуализация сосудов микроциркуляторного русла

[1] Центр лазерной медицины Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова
[2] Научно-исследовательская лаборатория микроциркуляции Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург
[3] Korean Electrotechnology Research Institute (KERI), Seoul, Korean Republic
e-mail: lasmed@ya.ru

Реферат

Автофлуоресцентная визуализация сосудов микроциркуляторного русла в гиподерме позволяет улучшить контрастность изображения и более четко детализировать сосудистый рисунок по сравнению с обычным наблюдением в отраженном белом свете.

Ключевые слова: *автофлуоресценция, визуализация сосудов, микроциркуляция.*

Petrishchev N. N.[1,2], Kim S. V.[3], Berezin V. B.[3], Papayan G. V.[1,2]

Autofluorescent visualization of microcirculatory vessels

[1] Laser center of the Saint Petersburg State Pavlov Medical University
[2] V. A. Almasov Federal Heart, Blood and Endocrinology Center, Saint Petersburg
[3] Korean Electrotechnology Research Institute (KERI), Seoul, Korean Republic
e-mail: lasmed@ya.ru

Abstract

Autofluorescent visualization of hypodermal microvessels provides better contrast of the image and more detailed information about the architecture of the vasaclar tree in comparison to standard visualization in white light.

Keywords: *autofluorescence, imaging of the vessels, microcirculation.*

Введение

Биомикроскопия остается наиболее распространенным методом исследования сосудов микроциркуляторного русла. При изучении архитектоники сосудов функционирующего органа часто требуется наблюдение больших участков его поверхности. Для этого обычно используются оптические приборы с относительно слабыми увеличениями, соответствующими условиям макросъемки при фотографии. Поскольку живые объекты в большинстве случаев являются для видимого света непрозрачными, их освещение производится со стороны наблюдения. Для обозначения особенностей данного вида исследований применяются различные термины: «поверхностная микроскопия», «микроскопия в падающем свете», «эпилюминесцентная микроскопия». Однако при таком исследовании обычно используются увеличения и поля зрения, характерные, скорее, для луп, чем для световых микроскопов [5]. Для того чтобы подчеркнуть особенности наблюдения органов *in-vivo*, заключающиеся в необходимости обеспечения оптическим прибором большого рабочего расстояния и поля зрения, а также прижизненных условий для объекта, мы будем использовать термин «органоскопия».

Для органоскопической визуализации сосудов в отраженном свете применяются различные оптические методы повышения контраста. К факторам, снижающим контрастность изображения, относятся спектральные компоненты освещения, расположенные за пределами полос поглощения гемоглобина, а также зеркальное и (или) диффузное отражение света от поверхности ткани и ее глубинных слоев. Для улучшения качества визуализации сосудов используются:

1) спектральные методы, заключающиеся в применении синих или сине-зеленых фильтров (бескрасное освещение), позволяющих устранить из изображения спектральные компоненты, слабо поглощаемые гемоглобином [3, 4];

2) поляризационный метод, с помощью которого устраняется свет, отраженный от поверхности объекта [7];

3) конфокальный метод, улучшающий контраст благодаря устранению света из внефокусных областей [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель работы

Цель данной работы состояла в выяснении целесообразности визуализации сосудов в свете флуоресценции, обусловленной эндогенными флуорофорами (методом автофлуоресценции).

Материал и методы исследования

Опыты проводились на мышах линии C57BL6. Объектом исследования были сосуды гиподермы. Под наркозом (40 мкл кетамина, внутрибрюшинно) отпрепарировался участок кожи П-образной формы площадью 2×2 см^2; кровоснабжение у основания лоскута сохранялось и велось наблюдение за сосудами на внутренней поверхности лоскута и на мышечной ткани под ним. В исследовании была использована установка для получения мультиспектральных изображений в свете собственной флуоресценции и в обычном свете (рис. 1), разработанная в Центре лазерной медицины СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Основные параметры установки:

- источник излучения — ртутная лампа мощностью 120 Вт;
- фильтры возбуждения — 360 нм, 435 нм;
- световод — жидкостный, диаметр 5мм;
- фильтры барьерные – 400 нм, 470 нм;
- ТВ-камера —RGB, 1280×1024, прогрессивное сканирование;
- интерфейс — IEEE 1394 (Fire Wire);
- поле зрения —24×30 мм;
- разрешение в плоскости объекта — 23,5 мкм/пиксель;
- экспозиция — 50 мс.

Результаты исследования и их обсуждение

На ил. 1, *а, б, в* (см. стр. 3 обложки) приведены изображения кровеносных сосудов подкожной соединительной ткани, полученные, соответственно, в белом свете, а также в свете флуоресценции при возбуждении 360 нм и 435 нм.

Как видно из представленных данных, флуоресцентное изображение, благодаря большему контрасту, позволяет более четко детализировать сосудистый рисунок по сравнению с обычным изображением в белом свете. Преимущества визуализации сосудов в свете флуоресценции особенно заметны в случае большой толщины препарата. На ил. 2, *а, б, в* (см. стр. 3 обложки) показаны снятые в аналогичных условиях картины сосудистого русла у мыши под лоскутом кожи в области спины. Плохое качество изображения в белом свете (ил. 2, *а*) обусловлено как низким контрастом самих сосудов, так и рассеянием света в глубине мышечной ткани, а также бликами на ее поверхности, делающими детали структуры под бликами совершенно невидимыми. Поскольку возбуждение 360 нм и 435 нм выявляет различные морфологические структуры, а контрастность сосудов при этом примерно одинакова, выбор оптимальной длины волны должен осуществляться исходя из необходимости визуализации этих структур.

Минимальный калибр сосудов в приведенных изображениях — около 25 мкм. При этом площадь поля зрения составляет 24×30 мм, что значительно больше тех, что обычно обеспечиваются устройствами для биомикроскопии. Для визуализации более мелких сосудов необходима замена используемого объектива с фокусом 50 мм на объектив с большим фокусом и

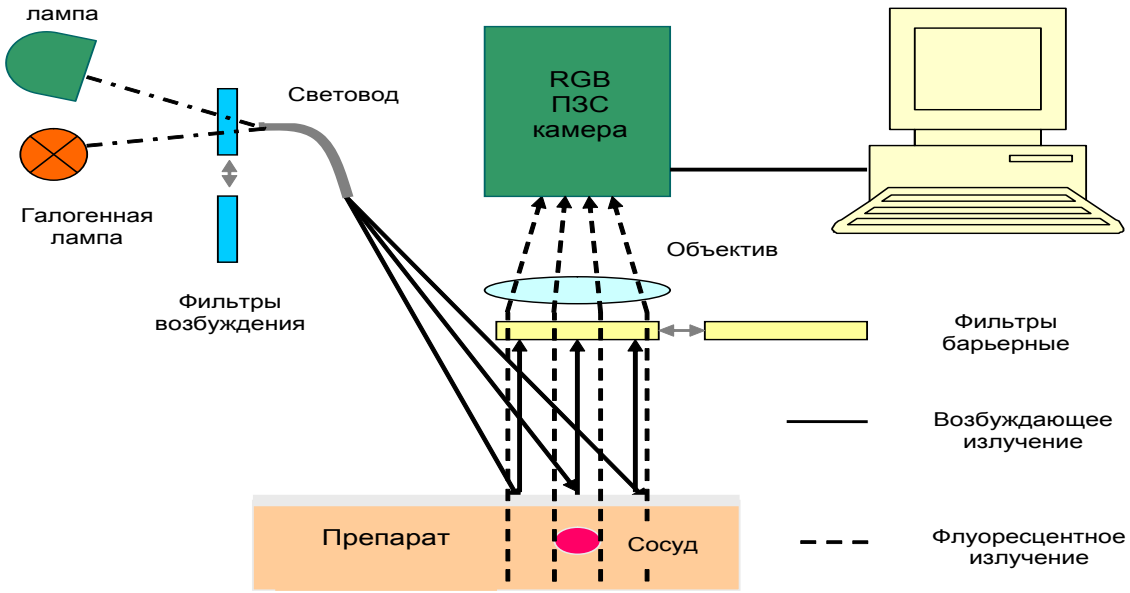

Рис. 1. Установка для получения мультиспектральных изображений в свете собственной флуоресценции и обычном свете

(или) уменьшение рабочего отрезка. Увеличение масштаба изображения сопровождается уменьшением глубины фокуса, что затрудняет исследование *in vivo* при большом увеличении. Наилучшие результаты могут быть достигнуты с помощью контактных объективов, которые позволяют зафиксировать поверхность ткани в плоскости наилучшей фокусировки и проводить исследования с увеличениями, свойственными обычным микроскопам [1].

Основными источниками флуоресцентного излучения при возбуждении светом 360 нм и 435 нм являются эндогенные флуорофоры: NADH, флавины, коллаген, кератин, липофусцин, порфирины. Большинство из них обладает сине-зеленой флуоресценцией, которая создает вторичные источники излучения, осуществляющие подсветку сосудов из нижележащих слоев ткани в области сильного поглощения гемоглобина (рис. 2), что повышает контраст изображения. Применение в регистрирующей системе барьерного фильтра позволяет устранить компоненты излучения, вызванные отражением возбуждающего света от поверхности органа, а также рассеянием его внутри ткани, что также увеличивает контраст сосудов.

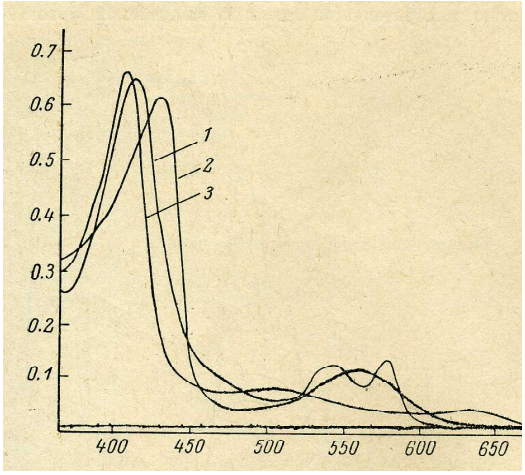

Рис. 2. Спектры поглощения различных форм гемоглобина в отдельных эритроцитах [7]. По оси абсцисс — длина волны в нм; по оси ординат: справа — оптическая плотность (D; слева — поглощение (1-T); 1— оксигемоглобин; 2 — восстановленный гемоглобин; 3 — метгемоглобин

Вывод

Автофлуоресцентная визуализация сосудов микроциркуляторного русла в тканях функционирующих органов при органоскопии позволяет улучшить контрастность изображения и более четко детализировать сосудистый рисунок по сравнению с обычным наблюдением в отраженном белом свете. Это преимущество в наибольшей степени проявляется при исследовании глубоко расположенных сосудов.

Литература

1. Агроскин, Л. С. Регистрирующий ширинг-микроспектрофотометр / Л. С. Агроскин, Г. В. Папаян, Л. П. Раутиан // Цитология. — 1970. — Т. XII. — № 4. — С. 548–558.

2. Барский, И. Я. Контактная микроскопия / И. Я. Барский, Н. И. Поляков, В. А. Якубенас. — М. : Медицина, 1976. — 160 с.

3. Кольпоскопия : практ. рук-во / В. Н. Покровская, С. И. Роговская, Е. А. Межевитинова. — М. : Мед. информ. аг-во, 2006. — С. 11.

4. Национальное руководство по глаукоме (путеводитель) для поликлинических врачей / под ред. Е. А. Егорова, Ю. С. Астахова, А. Г. Щуко. — М., 2008. — С. 48.

5. Скворцов, Г. Е. Микроскопы / Г. Е. Скворцов [и др.]. — Л. : Машиностроение, 1969. — 512 с.

6. Handbook of biological confocal microscopy / eds. by J. B. Pawley. — 3-d ed. — Springer-verlag, 2006. — 933 p.

7. Jacques, S. L. Imaging skin pathology with polarized light / S. L. Jacques, J. C. Ramella-Roman, K. Lee // Journal of Biomedical Optics. — 2002. — № 7 (3). — P. 329–340.