

Параметризация флуоресцентных изображений наружных тканей организма с диагностическими целями

С.Г. Геворкян¹, В.Н. Гришанов¹, И.В. Малов², Г.А. Плешаков¹

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34, Самара, Россия, 443086

²Самарский государственный медицинский университет, Чапаевская 89, Самара, Россия, 443099

Аннотация. Исследование эндогенной флуоресценции наружных тканей организма является мощным диагностическим инструментом. Перспективным классом диагностических флуориметров являются флуориметры, формирующие цветные изображения участка поверхности, возбуждаемой излучением соответствующего решаемой задаче спектрального состава. Дополнительно подобные флуориметры регистрируют изображения и в белом свете. В результате объектом обработки с целью извлечения диагностической информации становятся два цветных кадра по три цветовых компонента в каждом. На основе экспериментов, проведённых на флуориметре, предназначенном для оценки содержания конечных продуктов гликирования в коже (пиковая длина волны возбуждения флуоресценции 365 нм) представительным параметром оказалось отношение среднего арифметического значения (САЗ) пикселя зелёного компонента флуоресцентного изображения к САЗ пикселя зелёного компонента изображения в белом свете. Использование этого отношения позволило выявить возрастные и сезонные изменения автофлуоресценции кожи. Для склеры глаза при длине волны возбуждения флуоресценции 405 нм наименьшую вариабельность продемонстрировало отношение САЗ значения пикселя зелёного компонента к САЗ значению пикселя красного компонента кадра флуоресцентного изображения.

1. Введение

Диагностические возможности, которые открывает флуоресценция биотканей, уже давно привлекает внимание медиков в плане расширения номенклатуры выявляемых патологий, а инженеров-оптотехников - в плане создания диагностических систем с использованием всё более совершенной и доступной элементной базы [1]. Наиболее перспективными для флуоресцентной диагностики *in vivo* являются поверхностные биоткани организма. Это, прежде всего, кожа и наружные фрагменты глаза. Важной диагностической проблемой является определение содержания конечных продуктов гликирования (КПГ) в биотканях, т.к. гликирование – это основная причина спонтанного повреждения белков. Количественный анализ продуктов гликирования с технической точки зрения представляет собой серьёзную проблему. Наиболее точным методом их количественного определения является хроматография с масс-спектрометрической детекцией и количественной оценкой с использованием стабильных изотопов в качестве заменяемых стандартов, в особенности

жидкостная хроматография с тандемной масс–спектрометрией [2], которая, к тому же, требует предварительной биопсии. С другой стороны, многочисленными исследованиями подтверждена достоверность оценки содержания КПП по измерениям интенсивности автофлуоресценции кожи [3, 4]. Аппаратура для подобных измерений относительно проста, а сама процедура флуоресцентной диагностики по коже оперативна и не требует биопсии и медикаментов.

Наибольшее распространение получили диагностические флуориметры, содержащие источник ультрафиолетового (УФ) или фиолетового излучения для возбуждения КПП, спектрометр, анализирующий спектр флуоресценции, и компьютер, управляющий излучателем и спектрометром и осуществляющий по заданному алгоритму преобразование спектральной информации в числовое значение диагностического параметра, на основании которого врач и даёт своё заключение. Этот класс представлен коммерческими флуориметрами, как специально предназначенными для регистрации флуоресценции КПП [4], так и универсальными приборами [5, 6]. Обработка спектральной информации сводится [5, 6] к выбору интенсивностей флуоресцентного и упруго рассеянного излучений на нескольких определяемых решаемой задачей длинах волн с последующим расчётом по экспериментальным значениям интенсивностей значения числового параметра – коэффициента флуоресцентного контраста, который и является диагностическим параметром. Получил распространение и интегральный критерий уровня флуоресценции КПП, который используется в качестве диагностического параметра в коммерческом приборе AGE Reader [4] и является отношением интеграла экспериментального спектра интенсивности флуоресцентного излучения кожи в диапазоне длин волн (420 – 600) нм к интегралу спектра интенсивности упруго отражённого кожей излучения возбуждения флуоресценции в диапазоне длин волн (300 – 420) нм.

Поскольку интегральный критерий получил международное признание, то была предпринята реализация конструктивно простого и малобюджетного флуориметра для оценки содержания КПП в коже путем аналогового интегрирования флуоресцентного и упруго отражённого УФ излучения двумя фотодиодами с скорректированными светофильтрами спектральными характеристиками и возбуждением УФ светодиодом [7]. В отличие от коммерческого AGE Reader флуориметр [7] не содержит спектрометра и ртутной лампы. Он прошёл клинические испытания, продемонстрировав надёжность и удобство в работе [8]. Введение в конструкцию [7] дополнительного светодиода зелёного цвета свечения позволило частично нейтрализовать влияние на значение диагностического параметра присутствующего в коже меланина [9]. Разработанные приборы также выдают диагностическую информацию в форме числа, что удобно для медицинского персонала.

Недостатком существующих методик флуоресцентной диагностики КПП по коже является индивидуальная вариабельность результатов [3 - 9]. Причинами вариабельности могут выступать дефекты кожного и волосяного покровов в зоне анализа. Чтобы иметь возможность хотя бы апостериори указать причины появления аномальных результатов был разработан флуориметр с цветной телевизионной камерой в качестве фотоприёмника [10]. Другим перспективным направлением диагностики накопления КПП в биотканях является измерение автофлуоресценции наружных тканей глаза, в частности, склеры. Аргументы в пользу подобных исследований следующие: а) наружные ткани глаза столь же доступны для диагностики *in vivo*, как и кожа; б) могут быть преодолены этнические и гендерные ограничения, которые присущи диагностике по коже [11]; в) с использованием распространённого инструмента офтальмолога – щелевой лампы, модернизированной для возбуждения и измерения флуоресценции КПП [12], измерение производится дистанционно, чем исключается фактор механического давления на измеряемый участок, влияющее на его кровенаполнение.

В обоих случаях [10, 12] исходным экспериментальным материалом являются два цветных кадра изображения участка кожи или склеры, один из которых получен при УФ или фиолетовом освещении, а другой – при освещении белым светом. Сами изображения дают качественную информацию о диагностируемом участке и документальное подтверждение

правильности его выбора, но для количественных сравнений накопленных в биоткани КПП необходимо иметь один или несколько числовых параметров, характеризующих изображения.

2. Параметризация диагностических изображений

Примеры изображений, полученных с кожи и с глаза испытуемых, представлены на рисунках 1 и 2.

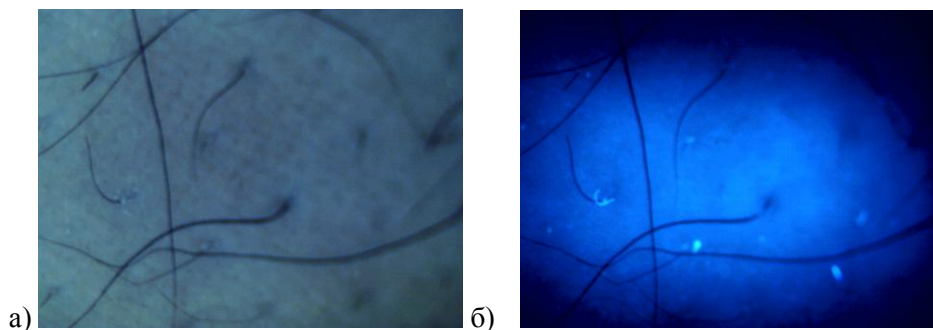


Рисунок 1. Изображение кожи руки испытуемого: а – в белом свете; б – при УФ освещении светодионом с пиковой длиной волны 365 нм.

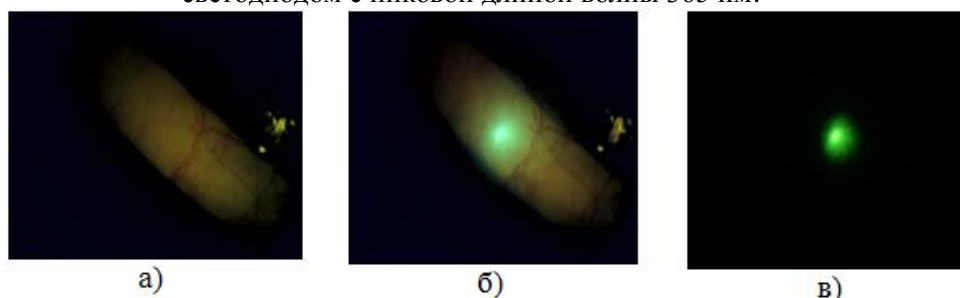


Рисунок 2. Изображение склеры глаза испытуемого: а – в белом свете; б – при одновременном освещении белым и фиолетовом свете; в – при освещении фиолетовым лазером с пиковой длиной волны 405 нм.

Поскольку целью обработки изображений в обоих случаях был выбор параметра, коррелирующего с содержанием КПП, то этапы обработки в целом совпадали, а отличия были обусловлены особенностями приборов, формирующих изображения и методикой работы с ними. В случае с кожей можно было выделить стационарный, неизменяющийся от эксперимента к эксперименту, участок 65×201 пк относительно равномерно освещённый УФ светодиодом (коэффициент вариации не превышал 6 %), а белым светом он же был освещён с неравномерностью, характеризуемой коэффициентом вариации всего 1 %. Именно по этому участку, границы которого программно не менялись и проводился расчёт параметров изображений, полученных как при УФ освещении, так и в белом свете.

В случае склеры глаза в модернизированной щелевой лампе для возбуждения флуоресценции использовался фиолетовый лазер со слабо расходящимся пучком и флуоресценция возбуждалась лишь на малом участке склеры. Сама процедура получения изображений на щелевой лампе предусматривала настройку освещения под каждого испытуемого по условиям резкого изображения и совмещения полей освещения белым и фиолетовым светом, как показано на рисунке 2б. Поэтому программа обработки включала интерактивные пункты выбора оператором центра флуоресцентного изображения и границ прямоугольной области с ранее выбранными координатами центра в значениях её полуширины и полувысоты. Здесь также, как в случае с кожей, расчёт параметров изображений, проводился по области – фрагменту изображения, но область выбиралась в интерактивном режиме. Координаты области не менялись при переходе от флуоресцентного изображения к соответствующему изображению в белом свете.

Далее обрабатывались цветовые R, G, B компоненты выделенного фрагмента. Ведущей компонентой была зелёная (G) компонента флуоресцентного изображения, т.к. в её происхождении превалирует флуоресценция КПП [13]. В ней учитывались лишь ненулевые и не насыщенные пиксели, по которым и рассчитывалось САЗ пикселя. Для остальных цветовых компонент флуоресцентного изображения и всех трёх компонент фрагмента изображения, полученного в белом свете, так же рассчитывались САЗ пикселя, но в расчёте учитывались лишь пиксели, места расположения которых соответствовали пикселям, использованным для расчёта САЗ ведущей зелёной компоненты флуоресцентного изображения. Исключение из расчётов САЗ нулевых и насыщенных пикселей было особенно актуально для параметризации флуоресцентных изображений склеры в силу неравномерного распределения плотности мощности в лазерном пучке и малого его сечения по сравнению с полем зрения микроскопа щелевой лампы. Так как нулевые пиксели исключались из расчётов, то выделенный в интерактивном режиме фрагмент обычно имел форму квадрата со стороной в 2 – 3 раза превосходящей визуальный диаметр лазерного пучка на склере.

Из рассчитанных САЗ пикселей цветовых компонент фрагментов и формировались параметры, коррелирующие с содержанием КПП в коже или склере. Основная идея формирования диагностического параметра как для флуориметров, не строящих изображений [3 - 9], так и использующих в качестве первичного экспериментального материала изображения [13, 14], состоит в нормировке сигнала флуоресценции диагностируемого компонента на оптические свойства биоткани, влияющие на выход флуоресцентного излучения из биоткани и его попадания в поле зрения фотоприёмника.

В настоящее время различные формы диагностического параметра исследуются путем накопления данных для статистической обработки. Для кожи представительным параметром оказалось отношение САЗ пикселя зелёного компонента флуоресцентного изображения к САЗ пикселя зелёного компонента изображения в белом свете. Использование этого отношения позволило выявить возрастные и сезонные изменения автофлуоресценции кожи. Для склеры глаза наименьшую вариабельность продемонстрировало отношение САЗ значения пикселя зелёного компонента к САЗ значению пикселя красного компонента кадра флуоресцентного изображения.

3. Заключение

Продемонстрирована перспективность использования САЗ пикселей цветовых компонент флуоресцентных изображений для формирования числовых значений диагностического параметра, характеризующего содержание КПП в коже и склере глаза. Достоверность полученных результатов подтверждается выявлением с помощью отношения САЗ пикселя зелёного компонента флуоресцентного изображения к САЗ пикселя зелёного компонента изображения в белом свете возрастных накоплений КПП – факта, установленного многочисленными исследованиями.

4. Благодарности

Данная работа поддержана грантом РФФИ № 19-52-18001 Болг_a.

5. Литература

- [1] Приезжев, А.В. Лазерная диагностика в биологии и медицине / А.В. Приезжев, В.В. Тучин, Л.П. Шубочкин. – М.: Наука, 1989. – 240 с.
- [2] Ahmed, N. Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе осложнений сахарного диабета / N. Ahmed, P.J. Thornalley // Русский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17, № 9. – С. 642-650.
- [3] Голубев, Р.В. Исследование автофлуоресценции кожи для определения содержания конечных продуктов гликирования у больных, находящихся на хроническом гемодиализе / Р.В. Голубев, Г.В. Папаян, А.А. Глазунова, Н.Ю. Коростелева, Н.Н. Петрищев, А.В. Смирнов // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 6. – С. 65-72.

- [4] Graaff, R. Instrumentation for the measurement of Autofluorescence in the Human Skin / R. Graaff, R. Meerwaldt, H.L. Lutgers, R. Baptist, E.D. de Jong, J.R. Zijp, T.P. Links, A.J. Smit, G. Rakhorst // *Proc. of SPIE.* – 2005. – Vol. 5692. – P. 111-118. DOI: 10.1117/12.588984.
- [5] Рогаткин, Д.А. Анализ точности лазерной клинической флуоресцентной диагностики / Д.А. Рогаткин, О.А. Приснякова, Л.Г. Моисеева, А.С. Черкасов // *Измерительная техника.* – 1998. – № 7. – С. 58-61.
- [6] Дунаев, А.В. Анализ индивидуальной вариабельности параметров в лазерной флуоресцентной диагностике / А.В. Дунаев, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов, С.Г. Палмер, С.Г. Соколовский, Э.У. Рафаилов // *Биотехносфера.* – 2013. – № 2(26). – С. 39-47.
- [7] Kornilin, D.V. Portable fluorescence meter with reference backscattering channel / D.V. Kornilin, V.N. Grishanov, V.P. Zakharov, D.S. Burkov // *Proc. SPIE.* – 2016. – Vol. 9961. – P. 8. DOI: 10.1117/12.2237135.
- [8] Grishanov, V.N. Two-channel portable fluorescence meter for risk stratification of cardiovascular diseases / V.N. Grishanov, D.V. Kornilin, P.A. Lebedev, D.E. Kopaev, D.Yu. Pimenova, V.P. Zakharov // *Proc. SPIE.* – 2019. – Vol. 11079. – P. 7. DOI: 10.1117/12.2526735.
- [9] Kornilin, D.V. Pulse excitation fluorescence meter for diagnostic purposes / D.V. Kornilin, V.N. Grishanov, K.V. Cherepanov // *Proc. SPIE.* – 2018. – Vol. 10685. – P. 8. DOI: 10.1117/12.2306588.
- [10] Нигматулин, И.Р. Панорамный флуориметр / И.Р. Нигматулин, В.Н. Гришанов // *Актуальные проблемы радиоэлектроники и телекоммуникаций: материалы Всероссийской научно-технической конференции* – Самара: Изд-во ООО «Офорт», 2018. – С. 194-195.
- [11] Ahmad, M.S. Ethnicity and skin autofluorescence-based risk-engines for cardiovascular disease and diabetes mellitus / M.S. Ahmad, T. Kimhofer, S. Ahmad, M.N. AlAma, H.H. Mosli, S.I. Hindawi, D.O. Mook-Kanamori, K. Sebekova, Z.A. Damanhour, E. Holmes // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12(9). – P. 12. DOI.org/10.1371/journal.pone.0185175.
- [12] Гришанов, В.Н. Модернизация целевой лампы для исследования флуоресценции поверхностных тканей глаза / В.Н. Гришанов, Г.А. Плешаков // *Актуальные проблемы радиоэлектроники и телекоммуникаций: материалы Всероссийской научно-технической конференции* – Самара: Изд-во ООО «АРТЕЛЬ», 2019. – С. 150-151.
- [13] Крылова, Е.В. Изменение объективных параметров аутофлуоресцентной картины кожи под влиянием инсоляции и возраста / Е.В. Крылова, А.В. Крылов, Н.Н. Петрищев, Г.В. Папаян // *Biomedical Photonics.* – 2015. – Т. 4, № 4. – С. 3-10.
- [14] Новиков, И.А. Повышение эффективности флуоресцентной диагностики новообразований кожи и слизистых оболочек в офтальмоонкологии / И.А. Новиков, Я.О. Груша, Н.П. Кирющенко // *Вестник РАМН.* – 2012. – № 10. – С. 62-69.

Parameterization of fluorescent images of external tissues of the body for diagnostic purposes

S.G. Gevorkyan¹, V.N. Grishanov¹, I.V. Malov², G.A. Pleshakov¹

¹Samara National Research University, Moskovskoe Shosse 34 A, Samara, Russia, 443086

²Samara State Medical University, Chapaevskaya str. 89, Samara, Russia, 443099

Abstract. The study of endogenous fluorescence of external tissues of the body is a powerful diagnostic tool. A promising class of diagnostic fluorimeters are fluorimeters that form color images of the surface area excited by radiation of the corresponding spectral composition. In addition, such fluorimeters register images in white light. As a result, two color frames become the object of processing in order to extract diagnostic information. Each frame has three color components. On the basis of experiments carried out on a fluorimeter designed to evaluate the content of glycation end products in the skin (peak wavelength of fluorescence excitation 365 nm), the representative parameter was the ratio of the arithmetic mean value (AMV) of the pixel in the green component of the fluorescent image to the AMV of the pixel in the green component of the image in white light. The use of this ratio revealed age-related and seasonal changes in skin autofluorescence. For the eye sclera at a wavelength of 405 nm fluorescence excitation, the lowest variability was demonstrated by the ratio of the AMV of the pixel in the green component to the AMV of the pixel in the red component of the fluorescent image frame.