



УДК 681.785

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ДЕРМАТОСКОП ДЛЯ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ В КОЖЕ

С.Г. Геворкян, sedochka2013@yandex.ru; В.Н. Гришанов, vladgrishanov@yandex.ru
Самарский университет, г. Самара

При оценке содержания конечных продуктов гликирования (КПГ) в коже по её автофлуоресценции (АФ) нерешённой проблемой является индивидуальная вариабельность сигналов АФ, что снижает достоверность диагностики. В качестве возможных причин индивидуальной вариабельности указывают: эндогенный меланин, степень насыщения ткани в месте измерения кровеносными сосудами, их кровенаполнение, механическую компрессию кожной ткани, дефекты кожного покрова на диагностируемом участке. Поэтому представляется перспективной реализация диагностического флуориметра с цветной камерой в качестве фотоприёмного устройства. Наличие трёх спектральных каналов и фиксация изображения диагностируемого участка обеспечивают существенно большее количество информации и, возможно, позволят выявить превалирующий вклад в индивидуальную вариабельность и снизить её значение до единиц процентов.

Ключевые слова: флуориметр, фотоприёмник, конечные продукты гликирования, автофлуоресценция, вариабельность.

FLUORESCENT DERMATOSCOPE FOR THE ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS EVALUATION IN SKIN

S.G. Gevorkyan¹, V.N. Grishanov¹
Samara University, Samara

Individual variability of autofluorescence (AF) signals is an unsolved problem in content assessing of advanced glycation end-products (AGEs) in skin, which leads to the diagnosis reliability decrease. Possible causes of individual variability are endogenous melanin, blood vessels content, blood filling, mechanical compression of skin tissue, skin defects of the diagnosed tissue area. Therefore, it seems promising to implement a diagnostic fluorimeter with a color camera as a photodetector device. The presence of three spectral channels and the image acquisition of the diagnosed area provide substantially more information. These factors may allow for identifying the predominant contribution of individual variability and reducing its value to a few percent.

Keywords: fluorometer, photodetector, advanced glycation end-products, autofluorescence, variability.

В 1980-х годах было обнаружено, что реакции между белками и сахарами (так называемое гликирование) приводит к образованию КПГ практически во всех типах клеток организма. Накопление КПГ считается одним из факторов старения и некоторых хронических заболеваний, связанных со старением. Доказано, что накопление КПГ в тканях имеет связь с развитием атеросклероза, сахарного диабета, поражениями почек [1], глаз [1,2] и нервной системы.

На данный момент существует несколько зарубежных серийно производимых флуориметров для оценки концентрации КПГ в коже, которые широко распространены в европейских клиниках.

Одним из таких приборов является «AGE – Reader» - прибор для экспресс-диагностики КПГ в коже, широко распространенный в Европе. Источником возбуждающего излучения служит УФ ртутная газоразрядная лампа, длина волны которой лежит в диапазоне 300 – 420 нм. Сбор и регистрация излучения осуществляются с помощью волоконного зонда и спектрометра. Для увеличения площади, на которой осуществляются измерения, проксимальный конец волокна отодвинут на некоторое расстояние от осветительного окна с исследуемым участком ткани, а для снижения вклада зеркального отражения от объекта ось волокна расположена под углом 45° к поверхности окна. Измерения проводятся на участках кожи



размером 0,4 см², расположенных в области предплечья пациента. Для учета влияния пигментации кожи оценивается коэффициент диффузного отражения с помощью светодиода белого свечения. Результат измерения представляется в виде отношения интенсивности АФ (420 – 600 нм) к интенсивности отраженного возбуждающего излучения (300 – 420 нм). Все вычисления происходят в ПК в специализированном программном обеспечении. Продолжительность измерения составляет от 1 до 3 мин в зависимости от цвета кожи.

С помощью прибора “AGE-Reader” проведен широкий круг исследований. В частности, показано, что АФ кожи может служить неинвазивным маркером микроангиопатии у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, мощным прогностическим фактором сердечно-сосудистой смертности при диабете. В клинической практике этот прибор применяется для оценки риска возникновения сердечно-сосудистых осложнений [3].

Принцип работы прибора “AGE-Reader” базируется на возбуждении ультрафиолетовым (УФ) излучением ртутной лампы автофлуоресценции кожи, обусловленной накоплением в ней конечных продуктов гликовидного обмена (КПГ). В качестве фотоприемника в AGE Reader применяется спектрометр [3]. Ранее авторами [4] был реализован флуориметр, в приборе ртутная лампа была заменена на УФ-светодиод, а в целях снижения стоимости спектрометр заменен на пару фотодиодов, посредством которых организованы 2 фотоприёмных канала: канал измерения интенсивности АФ и канал измерения интенсивности упругого рассеяния УФ излучения кожей. С помощью этого прибора проводились исследования на больных ишемической болезнью сердца (ИБС), так как АФ может служить признаком нормального или аномального протекания болезни [5], а также прибор позволил дифференцировать по содержанию КПГ в коже возрастную макулярную дегенерацию и катаракту [6].

Последующим развитием разработок является флуориметр с цветной измерительной камерой модели ToupCam 350KPA в качестве фотоприёмного устройства [7]. Основными оптоэлектронными компонентами данного прибора являются измерительная камера модели ToupCam 350KPA, мощный ультрафиолетовый светодиод LEUVA77V20RV00 с пиковой длиной волны 365 нм, белый светодиод HB3b-449AWF, очищающий светофильтр УФС6 и отрезающий интерференционный светофильтр LP435.

Повышение контрастности получаемых изображений в белом свете, а также подавление бликов от предметного стекла достигнуто путем использования приемов поляризационной фильтрации. Для этого на источник видимого излучения, в нашем случае белый светодиод устанавливается линейный поляризатор. На объектив видеокамеры устанавливается второй поляризатор таким образом, чтобы плоскости поляризации были перпендикулярны. Рассеянный шероховатой поверхностью свет, не является поляризованным и может быть зарегистрирован видеокамерой, блики от предметного стекла остаются поляризованными и через поляризатор объектива не проходят.

Фотография внешнего вида опытного образца флуориметра приведена на рисунке 1, где на ПК (1) используется специальное приложение измерительной камеры ToupCam350KPA для фиксации изображений. ПК соединен с помощью USB кабелей (2) к мыши (3) для переключения светодиодов осветителя. Блок управления светодиодами (5) позволяет регулировать их параметры, таких как интенсивность излучения и длительность светового импульса.

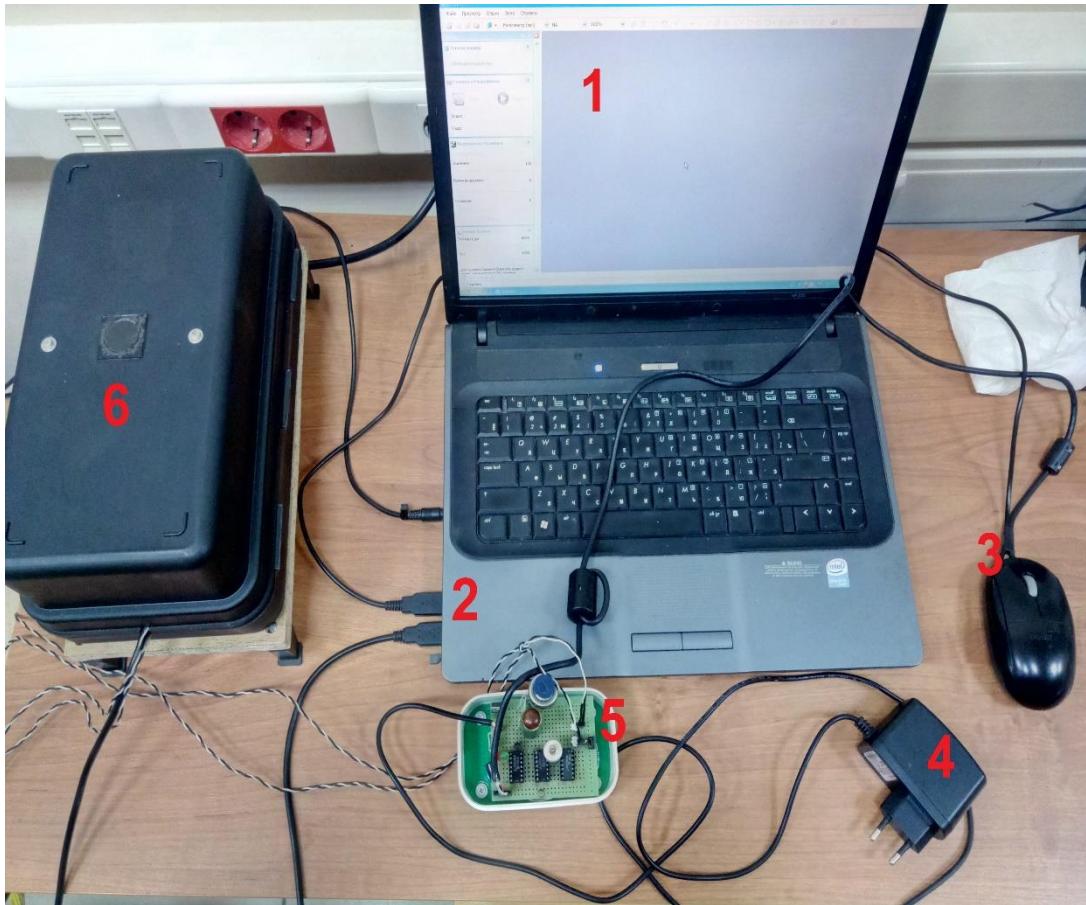


Рис. 1 – Общий вид флуориметрической системы люминесцентной диагностики:
1-ПК и интерфейс программы; 2- порты для подключения USB; 3-мышь для управления; 4-блок питания на 24В; 5-блок управления; 6-флуориметр

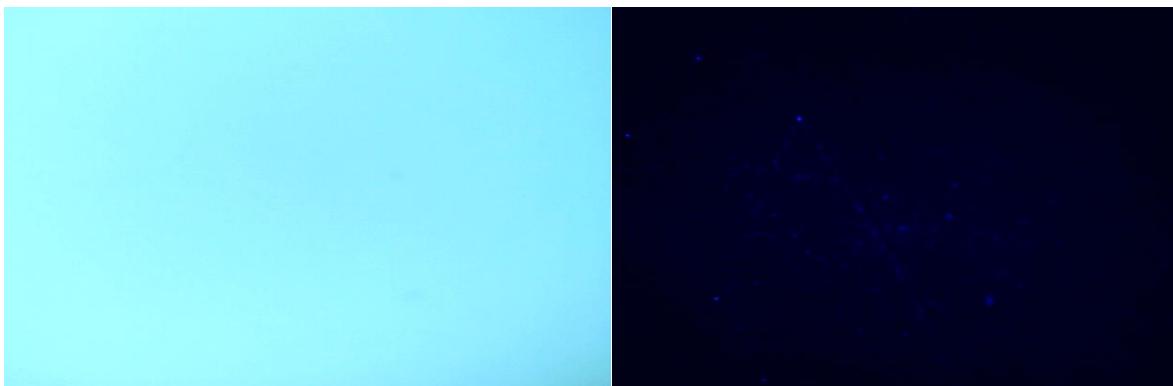
В работе [7] была продемонстрирована применимость флуориметра для исследования флуоресценции оптических элементов и плёнкообразующих материалов для изготовления оптических покрытий. Настоящее исследование посвящено перспективам использования, разработанного флуориметра в качестве флуоресцентного дерматоскопа.

В течение 95 дней проводились эксперименты на повторяемость результатов. Объектами исследований стали физическая модель абсолютно чёрного тела(АЧТ), фторопластовая пластина и два добровольца в возрасте 22 и 67 лет. В качестве реперного физического объекта, обладающего стабильными во времени, как упруго-рассевающими, так флуоресцентными свойствами была выбрана прокладка уплотнитель (рис. 2).

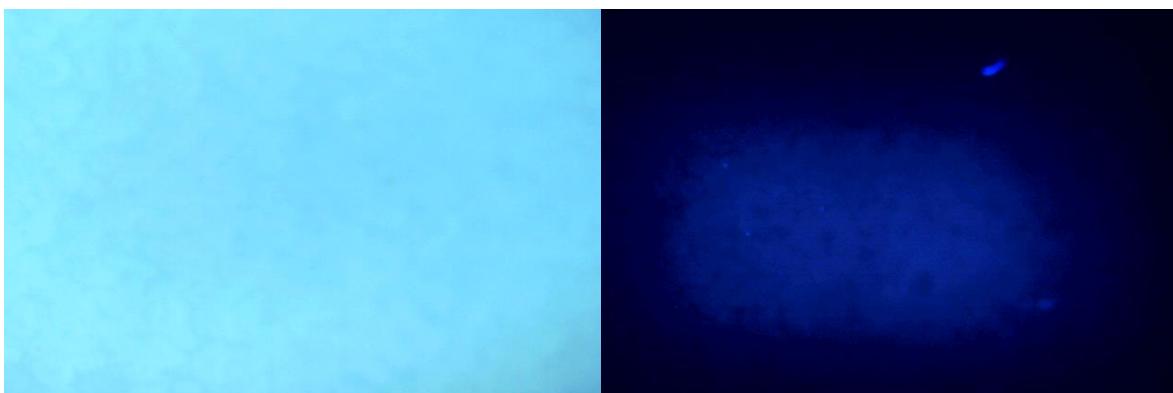
Известно, что абсолютно чёрное тело полностью поглощает излучение на всех частотах, не рассеивает и не излучает. Фторопласт является нефлуоресцирующим веществом, но рассеивает излучение. Получены изображения поверхностей АЧТ, фторопласта, прокладки-уплотнителя и кожи при белом и ультрафиолетовом освещении. Фотографии представлены на рисунках 3, 4 и 5. Сравнение рис. 3б с 4б и 5б доказывают возможность фиксации камерой флуоресценции.



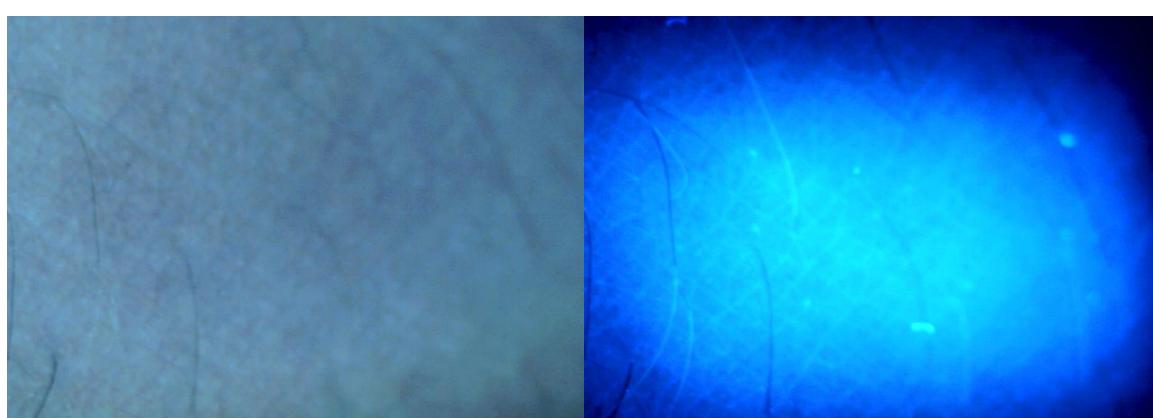
Рис. 2 – Прокладка-уплотнитель



а)
б)
Рис. 3 – Изображения фторопласта в белом а) и УФ б) свете



а)
б)
Рис. 4 – Изображения прокладки-уплотнителя в белом а) и УФ б) свете



а)
б)
Рис. 5 – Изображения кожи в белом а) и УФ б) свете



Обработка изображений проводилась в пакете «Mathcad». Система Mathcad в любом варианте поставки с помощью функций READ_GREEN, READ_RED, READ_BLUE позволяют считывать изображения, представленные файлами с расширением .BMP. Эти функции возвращают матрицу, которая определяется размером рисунка. Каждый элемент возвращаемой матрицы соответствует пикселию исходного изображения и имеет значение кода плотности черного цвета от 0 до 255.



Рис. 6 – Изображение прокладки-уплотнителя в УФ свете, вырезанный с помощью функции submatrix

Для оценки количественных параметров изображения с помощью функции submatrix выбирались его участки однородно освещённой поверхности. Наиболее заметна неоднородность на флуоресцентных изображениях (см. рис. 4б и 5б). Вырезанный с помощью функции submatrix участок изображения прокладки уплотнителя (рис. 6) освещён существенно однороднее. Это подтверждается и количественными оценками. Коэффициент вариации элементов матрицы, соответствующей рис. 4б, составляет 164% при среднем значении 7, тогда как для рис. 6, составляет 12% при среднем значении 30. Функция submatrix позволяет на всех обрабатываемых изображениях выделять одни и те же участки.

Обработка изображений сводилась к расчёту среднего арифметического значения элемента submatrix в каждом из трёх цветовых каналов. Затем усреднялись результаты по количеству проведённых с каждым из исследованных объектов экспериментов и коэффициент вариации. Результаты расчётов сведены в табл. 1.

Таблица 1
Результаты измерения автофлуоресценции

Объект	Количество измерений	Среднее значение элементов и коэффициент вариации в каналах					
		зелёный		красный		синий	
		сред	к-т вар	сред	к-т вар	сред	к-т вар
АЧТ	9	0	-	0	-	22	1,3%
Фторопластовая пластина	6	0	-	0	-	41	8,3%
Прокладка-уплотнитель	6	30	4,5%	4	9%	133	2,7%
Испытуемый 1	7	175	19%	13	22%	255	-
Испытуемый 2	7	116	23%	10	29%	212	-



В ходе работы, было выявлено, что в синем канале в УФ свете для АЧТ значения находятся на уровне 22 единиц, а в зелёном и в красном цветах значения незначительно отличаются от нуля. Что касается фторопластовой пластины, то в УФ свете в синем канале значения находятся на уровне 40, в зеленом и в красном значения также близки к нулю, в то время как у испытуемых в зелёном и в синем каналах уровни регистрируемого сигнала значительно больше, чем от не флуоресцирующих объектов. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Низкий уровень рассеянного излучения внутри прибора и качество спектральной фильтрации позволяют уверенно регистрировать АФ кожи.
2. Коэффициент вариации регистрируемых сигналов от физических объектов указывают на стабильность работы узлов и блоков флуоресцентного дерматоскопа.
3. Для оценки уровня АФ КПГ в коже целесообразно использовать зелёный и синий каналы цветной камеры прибора.

Список цитируемой литературы

1. Ryoji Nagai, Takefumi Mori, Yasuhiko Yamamoto, Yuichi Kaji, Yoshikazu Yonei Significance of Advanced Glycation End Products in Aging-Related Disease // JAAM. — Published online: Sep 16, 2010.
2. Glenn J.V., Mahaffy H., Wu K., et al. Advanced Glycation End Product (AGE) Accumulation on Bruch's Membrane: Links to Age-Related RPE Dysfunction // Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. — 2009. — Vol. 50, №1. — P. 441-51.
3. AGE reader brochure: www.diagnoptics.com | www.age-reader.com
4. Куликов, В.С. Диагностический флуориметр и его клиническая апробация у пациентов с ишемической болезнью сердца / В.С. Куликов, В.Н. Гришанов, Д.Е. Копаев // Актуальные проблемы радиоэлектроники и телекоммуникаций: материалы Всероссийской научно-технической конференции (г. Самара, 16-18 мая 2017 г.) / Самар. нац. исслед. ун-т им. С. П. Королева, под. ред. А. И. Данилина - Самара : ООО «Офорт», 2017. – С. 220-222.
5. D. J. Mulder, P. L. van Haelst, R. Graaff et al. Skin autofluorescence is elevated in acute myocardial infarction and is associated with the one-year incidence of major adverse cardiac events // Netherlands Heart Journal 2009 v. 17(4), P.162 – 168
6. Лебедев П.А., Малов И.В., Пшеницына Е.С. и др. Флюоресцентный метод определения содержания конечных продуктов гликовидирования в коже у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией и катарктой // Практическая медицина. — 2018. — № 3 (114). — С. 110-113
7. Нигматулин, И.Р. Панорамный диагностический флуориметр. [Текст] / И.Р. Нигматулин, В.Н. Гришанов – Труды Международной молод. научн. конфер. «14-е Королёвские чтения», Т. 1. – Самара: и-во Самарского университета, 2017. – С. 524 - 525.