

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ÚPRAVA OPTOSONDY LUMINISCENČNÉHO SPEKTROMETRA PERKIN-ELMER LS 55 NA MERANIE FLUORESCENČNÝCH SPEKTIER KOŽNÝCH POVRCHOV

MICHAL MOKRÝ^a, JAROSLAV KUŠNÍR^b,
PETER GÁL^a, KATARÍNA DUBAYOVÁ^b,
MIROSLAV SYNEK^b a JÁN SABO^a

^aÚstav lekárskej biofyziky, ^bÚstav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Tr. SNP 1, 040 66 Košice, SR
sabo.jan@upjs.sk, mmokry@kosice.upjs.sk

Došlo 23.11.04, prepracované 12.5.05, prijaté 31.5.05.

Kľúčové slová: luminiscenčný spektrometer, synchrónne fluorescenčné spektrum, hojenie rán

Úvod

Vývoj optických vlákien umožnil použiť fluorescenčnú spektroskopiu na monitorovanie fluorescenčných vlastností povrchov tkanív¹.

Medzi najbežnejšie fluorofóry nachádzajúce sa v živých systémoch, a teda aj v povrchových vrstvách pokožky, patria: tryptofán, tyrozín, kolagén, elastín, FAD, NADH, fosfolipidy, lipofuscín, vitamíny B₆, B₁₂, A, D, K, a mnoho iných^{2,3} (Tab. I). Biologické procesy, akými sú nádorový rast, alebo hojenie rany sú nesmierne dynamické, počas nich sa kvalitatívne aj kvantitatívne mení zostava fluorofórov⁴. Taktiež sa menia optické vlastnosti prostredia, v ktorom sa nachádzajú, čo má zákonite vplyv na výsledné fluorescenčné spektrá². Tieto javy sú dostatočným markerom patologických procesov.

V súčasnosti je možné pomocou rôznych typov fluorescenčných spektier diagnostikovať prekancerózne stavy niektorých orgánov: krčka maternice, hrubého čreva, mliečnej žľazy alebo bronchov^{5–7}. Táto diagnostika je často presnejšia a citlivejšia ako zaužívané štandardné metódy (endoskopia, cytodiagnostické metódy a iné), pričom záťaž pacienta vzhľadom na nízky stupeň invazívnosti a rýchlosť merania je minimálna⁸. Fluorescenčné metódy často používajú ako excitačné svetlo laserové žiarenie len jednej vlnovej

dĺžky, pričom v emisnom spektre sa sústredia len na jednu vybranú vlnovú dĺžku. Takáto metóda síce dokáže ľahko určiť hranice zdravého a patologicky zmeneného tkaniva, avšak má len obmedzené použitie pri bližšom určení patologického stavu (napr. diagnostikovanie konkrétneho podtypu nádoru, a iné). Tento problém môžu vyriešiť metódy, ktoré by analyzovali celé spektrum emisných a excitačných vlnových dĺžok.

Vývoj rýchlej, exaktnej a minimálne invazívnej metódy, nezávislej od skúseností hodnotiaceho lekára, schopnej odhaliť už prvé patologické náznaky v tkanive ešte predtým, ako nastanú viditeľné zmeny zaznamenateľné ľudským okom, by bol prínosom najmä pre rizikových pacientov, medzi ktorých patria pacienti s diabetes mellitus, ikterickí a onkologickí pacienti, stavy spojené s malnutríciou, imunokompromitovaní jedinci a mnoho iných^{9–13}.

Cieľom práce bolo technicky upraviť a doriešiť zakončenia komerčného optického kábla luminiscenčného spektrometra LS 55 (Perkin-Elmer), vyvinúť stojan a držiak na sondu, ktorý by umožnil presné nastavenie

Tabuľka I

Prirodzené fluorofóry v živých systémoch a ich fluorescenčné parametre²

Endogénne fluorofóry	Excitačné maximum [nm]	Emisné maximum [nm]
Tryptofán	280	350
Tyrozín	275	300
Fenylalanín	260	280
Kolagén	325	400, 405
Elastín	290, 325	340, 400
FAD	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Vitamin A	327	510
Vitamin K	335	480
Vitamin D	390	480
Pyridoxín	332, 340	400
Pyridoxamín	335	400
Pyridoxal	330	385
Pyridoxal 5'-fosfát	330	400
Vitamin B ₁₂	275	305
Fosfolipidy	436	540, 560
Lipofuscín	340–395	540, 430–460
Ceroid	340–395	430–460, 540
Porfyríny	400–450	630, 690

sondy kolmo nad meraný povrch, v definovanej vzdialenosti od povrchu, čo má umožniť reprodukovateľnosť meraní rôznych druhov fluorescenčných spektier kožných povrchov.

Experimentálna časť

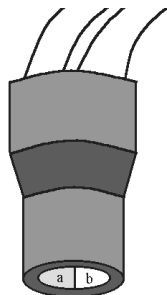
Prístroje a zariadenia

Luminiscenčný spektrometer LS 55 (Perkin-Elmer) vybavený optickým káblom na externé meranie s pripojeným počítačom na spracovanie dát s programom FLWinLab, ktorý je dodávaný výrobcom prístroja.

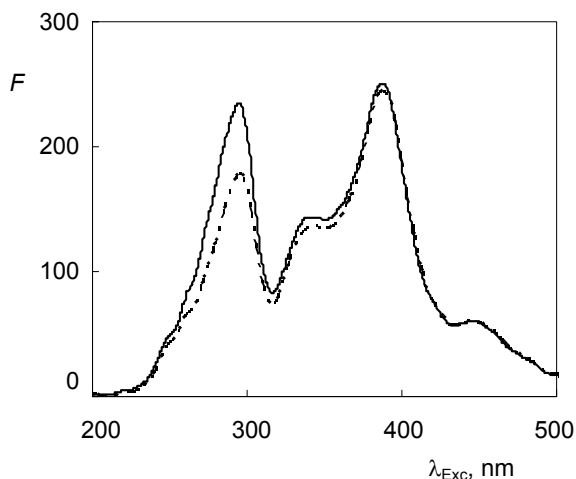
Spektrá pokožky boli snímané u zdravých dobrovoľníkov, spektrá rán boli snímané u experimentálnych zvierat (potkan).

Výsledky a diskusia

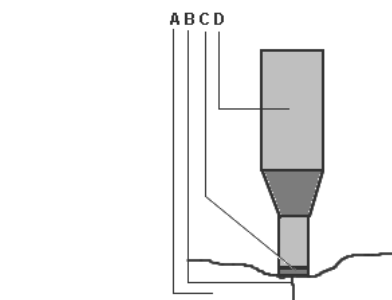
Prístroj bol vybavený dvojitém svetlovodným káblom, z ktorého jedna polovica je určená na privod excitujúceho svetla z prístroja a druhá na zachytávanie svetla emitovaného povrchom. Konce oboch káblov sú umiestnené v jednoduchej koncovke tesne vedľa seba (Obr. 1).



Obr. 1. Schéma spodnej časti svetlovodného kábla; a) zakončenie vlákna privádzajúceho excitáciu svetlo k meranému povrchu, b) zakončenie vlákna odvádzajúceho emitované svetlo



Obr. 2. Synchronné fluorescenčné spektrum tej istej kožnej rany pre $\Delta\lambda = 60$ nm, pri rôznej vzdialenosti zakončenia svetlovodných káblov od rany



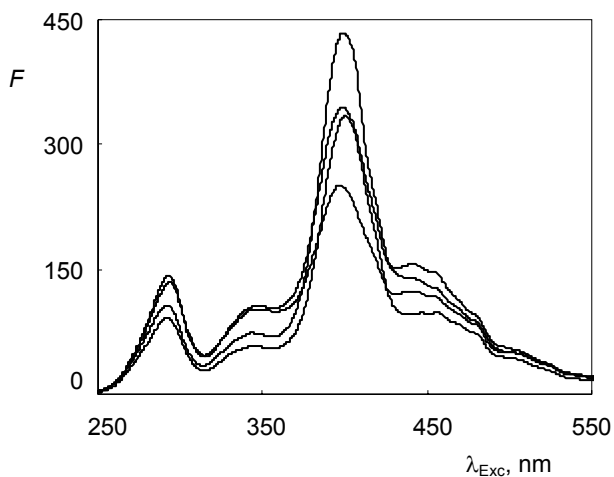
Obr. 3. Schéma sondy so sklenenou koncovkou; A – meraná pokožka, B – kožná rana, C – sklenená koncovka z optického skla, D – telo sondy. Podkožie je tlakom sondy deformované a ischemizované, čo má negatívny vplyv na reprodukovateľnosť takto nameraných spektier

ceho svetla z prístroja a druhá na zachytávanie svetla emitovaného povrchom. Konce oboch káblov sú umiestnené v jednoduchej koncovke tesne vedľa seba (Obr. 1).

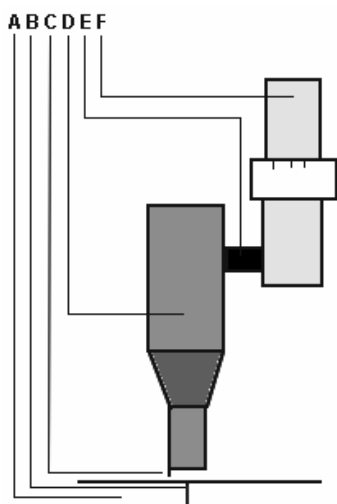
Keďže intenzita signálu je aj funkciou vzdialenosti zakončenia svetlovodných vlákien od meraného objektu² (Obr. 2), pre reprodukovateľnosť merania bolo nevyhnutné zabezpečiť jej presné nastavenie.

Problém sme spočiatku riešili pomocou upravenej koncovky, kde nastavenie vzdialenosti zabezpečovalo 1 mm hrubé optické sklo oddeľujúce povrch rany od zakončenia svetlovodných vlákien (Obr. 3).

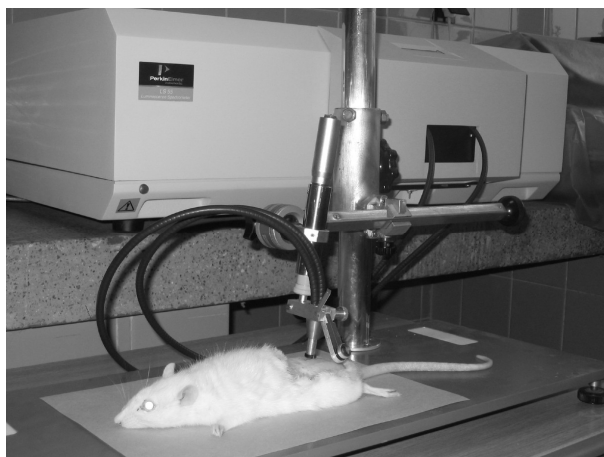
Ukázalo sa, že charakter a intenzita nameraných spektier sa menia v závislosti od tlaku a času, ktorým pôsobila koncovka na povrch (Obr. 4). Tieto rozdiely sú pravdepodobne spôsobené okrem iného hlavne zmenou intenzity prekrvenia rany. Pri meniacej sa intenzite prekrvenia sa



Obr. 4. Synchronné fluorescenčné spektrá pre $\Delta\lambda = 30$ nm tej istej kožnej rany merané pomocou sondy so sklenenou koncovkou; Keďže nie je možné zabezpečiť konštantný tlak sondy na pokožku spektrá nie sú reprodukovateľné



Obr. 5. Schéma sondy s koncovkou na bezdotykové meranie; A – meraná pokožka, B – kožná rana, C – koncovka s 0,7 mm dlhým oceľovým hrotom, D – telo sondy, E – držiak sondy, F – mikroskop. Podkožie nie je deformované ani ischemizované, vďaka čomu sú namerané spektrá reprodukovateľné



Obr. 6. Luminiscenčný spektrometer spolu s prídavnými zariadeniami počas merania

mení aj množstvo hemoglobínu v rôznych vrstvách rany a hemoglobín je zodpovedný za znižovanie intenzity signálu⁶.

Kvôli týmto problémom sme zvolili bezdotykové nastavenie vzdialenosti pomocou ďalšej úpravy koncovky, ktorú sme vybavili 0,7 mm dlhým kontaktným oceľovým hrotom (Obr. 5). Na zabezpečenie presnej vzdialenosti sme skonštruovali stojan s mikroskopom umožňujúci pohyb sondy v troch rovinách. Takto sme boli schopní nastaviť presnú vzdialenosť sondy od rany. Táto vzdialenosť sa kontrolovala vizuálne pomocou lupy (Obr. 6).

Dáta získané zo spektrofluorimetra boli spracované v programe FLWinLab.

Vyhodnocovali sme synchronne fluorescenčné spek-

trá pre $\Delta\lambda_1 = 30$ nm, $\Delta\lambda_2 = 60$ nm a $\Delta\lambda_3 = 90$ nm, pre tento typ spektier a parametre vlnových dĺžok sme sa rozhodli preto, lebo nám umožnili zachytiť maximum relevantných fluorofórov pri relatívne malom počte meraní. Ramanujam² uvádza, že väčšina relevantných fluorofórov, ktoré sa nachádzajú v živých systémoch, má rozdiel excitačného a emisného maxima práve v tomto intervale.

Analýza nameraných spektier a ich interpretácia nie je predmetom tejto práce.

Záver

Po technickej úprave optosondy fluorescenčného spektrofotometra je možné reprodukovateľne merať fluorescenčné spektrá z povrchu kožnej rany u potkanov, povrchu pokožky a slizníc človeka. Meranie fluorescenčných spektier je neinvazívna, rýchla a objektívna diagnostická metóda na posúdenie normálneho a patologického stavu hojenia rán. V budúcnosti bude potrebné vyriešiť problémy spojené s nízkou intenzitou signálu a vysokou variabilitou kožných rán, pravdepodobne použitím vhodných fluorescenčných markerov na monitorovanie meniacich sa parametrov v hojacej sa rane.

LITERATÚRA

- Gillenwater A., Jacob R., Ganeshappa R., Kemp B., El-Naggar A. K., Palmer J. L., Clayman G., Mitchell M. F., Richards-Kortum R.: Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 124, 1251 (1998).
- Ramanujam N.: *Fluorescence Spectroscopy in Vivo*, Encyclopedia of Analytical Biochemistry. John Wiley, Chichester 2000.
- Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E.: Ann. Rev. Phys. Chem. 1999, 555.
- Vidinský B., Gál P., Lakyová L., Toporcer T., Špaková T., Rybár D., Kilík R., Sabo J., Longauer F.: *Loida Symposium on Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry*, Košice 28.6.–1.7. 2004, (Kluchová D., ed.) str. 9.
- Palmer G. M., Keely P. J., Breslin T. M., Ramanujam N.: Photochem. Photobiol. 78, 462 (2003).
- Ramanujam N.: Neoplasia 2, 89 (2000).
- Sokolov K., Follen M., Richards-Kortum R.: Curr. Opin. Chem. Biol. 6, 651 (2002).
- Mitchell M. F., Cantor S. B., Ramanujam N., Tortolero-Luna G., Richards-Kortum R.: Obstet. Gynecol. 93, 462 (1999).
- Armstrong C. P., Dixon J. M., Duffy S. W., Elton R. A., Davies G. C.: Br. J. Surg. 71, 267 (1984).
- DeGraaf P. W., Zwaveling A.: J. Surg. Oncol. 24, 32 (1982).
- Mousley M.: Nurs. Times. 99, 73 (2003).
- Mowat A., Baum J.: N. Engl. J. Med. 284, 621 (1971).
- Mullen J. L., Gertner M. H., Buzby G. P., Goodhart G. L., Rosato E. F.: Arch. Surg. 114, 121 (1979).

**M. Mokřý^a, J. Kušnír^b, P. Gál^a, K. Dubayová^b,
M. Synek^b, and J. Sabo^a** (^a*Department of Medical Bio-
physics, ^bDepartment of Medical Chemistry, Biochemistry
and Clinical Biochemistry, Pavol Jozef Šafárik University,
Košice, Slovakia*): **Modification of the Optical Probe of
the Perkin-Elmer LS 55 Luminiscent Spectrometer for
Measurement of Fluorescence Spectra of Skin Surface**

One end of the double cable in commercial instru-
ments is installed in the cuvette space of the instrument
and the other one is free. As the optical cables do not in-
clude either optical components or an optimal fixation
mechanism for the distance adjustment, the measurements
using those accessories do not give reproducible results.
Our modification including addition of other components
to the cable terminal enables the instrument to monitor
biological processes on skin surface.