

СПЕКТРОМЕТЪР ЗА ФЛУОРЕСЦЕНТНА ДИАГНОСТИКА В РЕАЛНО ВРЕМЕ

н.с. д-р Николай Минковски, Николай Мечков*

и ст.н.с. д-р Валентин Лъцканов

Институт по лазерна техника при СУ“Св.Кл.Охридски”

*Агенция за специална електроника ООД - София

We report on a spectrometer for spectral analysis of biological tissue. The apparatus itself incorporates a diffraction grating tuned to its first order to achieve maximum sensitivity and linear dispersion. The fluorescent signal is collected by an optical fiber tract and collimated and focused by two photograph objectives with broadband AR coating.

The as so far received signal is processed by a CCD matrix (a 2048 channel device) designed for maximum sensitivity within the visible range. The signal can be amplified programmability to 10^3 and is being digitised by a ADC before data is collected by a PC.

The overall performance of this compact device can be made clear when one takes into account that more than 250 nm are scanned simultaneously with a „spectra lens“ of 25 nm. Maximum spectral resolution is 0.25 nm.

We have successfully used this device to diagnose arterial vessel for atherosclerotic plaque. A prototype clinical model of XeCl excimer laser (308 nm) angioplasty system serves as source for optical excitation.

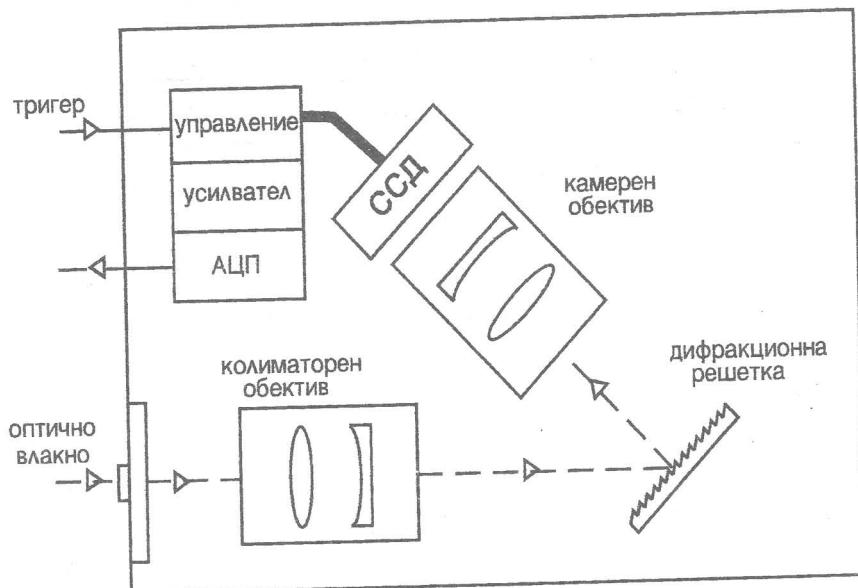
Разработен е спектрометър за диагностика на биологични тъкани по метода на спектралния анализ на флуоресценцията им. Базовата идея на метода на флуоресцентната диагностика е възбуждането на флуоресценция вследствие въздействието на оптично лъчение върху изследваната тъкан, приемането на този флуоресцентен сигнал, получаването на неговия спектър чрез подходяща спектроанализираща апаратура и сравняването му с типични спекtri за конкретния случай.

В нашия конкретен случай този прибор се явява част от лазерен комплекс за ангиопластика предназначен за отпушване на артериални кръвоносни съдове. Той се състои от мощен ексимерен лазер (XeCl - 308 nm) и подходящ оптичен катетър чрез който лазерното лъчение се транспортира до съответното място в артерията. При тази интервенция е необходимо наблюдение на артерията с цел насочване на катетъра, което рутинно се извършва чрез рентген при вкарано в организма на подходящо контрастно вещество.

Идеята е чрез създавания от нас спектрометър да се избегне вредното облъчване на организма с рентген, а да се използва флуоресцентна диагностика за определяне на вида на мишена. Ултравиолетовото лъчение на ексимерния лазер е много подходящо за възбудждане на флуоресценция, а чрез световод намиращ се в същия катетър флуоресцентният сигнал се приема и транспортира до спектрометъра. Като диспергиращ елемент се използва дифракционна решетка работеща в първи порядък съответно с 1200 или 650 линии/мм в зависимост от необходимия за наблюдение спектрален интервал.

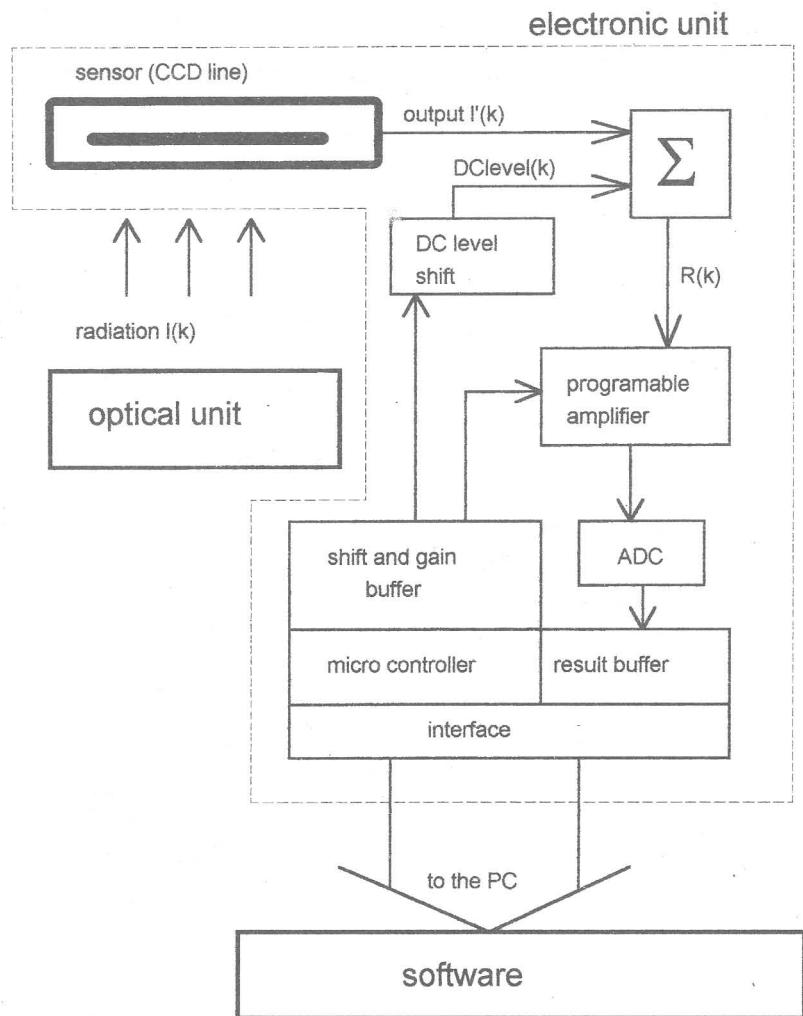
За приемник на диспергираното лъчение се използва едномерна ССД линийка (2048 елемента) с диапазон на спектрална чувствителност 0.3-1.0 мкм, волтова чувствителност не по-малка от 30mV/lx, размер на пикселите 13мкм и разстояние между тях 25мкм.

В зависимост от диаметъра на приемащия световод разделителната способност на спектрометъра се мени съответно от 0.25нм за 50 мкм диаметър на световода до 1.4нм за 200мкм.



Оптична схема на спектрометъра

На представена по-долу схема е представена блоковата схема на електронния блок за управление на ССД линийката.



Характеристики на електронния блок:

- брой канали (елементи на CCD) 2048;
- време за измерване на кадър от 10ms до 2.5 s;
- разрядност на АЦП - 8 бита;

- 10 битов програмен контрол на усилването и отместването по ниво за всеки отделен канал, динамично в процеса на измерване;
- възможност за единично и неперекъснато измерване със строго зададени времеви параметри (проследяване във времето).

Системата е замислена и реализирана като алтернатива на фотоплаките за използване с огромния брой спектрографи. Работната дължина на светочувствителния елемент е 3 см, което от една страна, ограничава работното поле на прибора, но от друга страна позволява създаването на компактен спектрометър с минимални изкривявания във фокалната плоскост. Главното предимство обаче е оперативността на работата. Практически в реално време се получава резултат, при това в цифров вид (готов за всяка по нататъшна обработка). Предвидена е възможността синхронно с четенето на кадри да се инициират външни събития (в реализацията на спектрометъра за флуоресцентна диагностика се командва "стрелбата" на лазера от РС и с регулируемо закъснение се включва приемането на флуоресцентния сигнал за по нататъшна обработка).

При работа на прибора в режим единични кадри за обслужването му е достатъчен персонален компютър от класа на ХТ, докато в режим на последователни кадри и темп на следване на кадрите под 20 ms е необходимо поне AT286/20MHz. При недостатъчна производителност от страна на поддържащото РС трябва да се работи с по-големи времена за обработка на кадър.

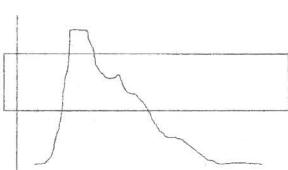
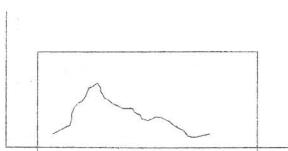
Въпреки малката разрядност на използваното АЦП, благодарение на гъвкавостта на системата, може да се постигне много добро описание на получаваните спектри.

При усилване, когато целият сигнал е в рамките на обхвата на АЦП-то, може да се окаже, че част от спектъра не е добре разрешена. В този случай е възможно да се вдигне усилването,

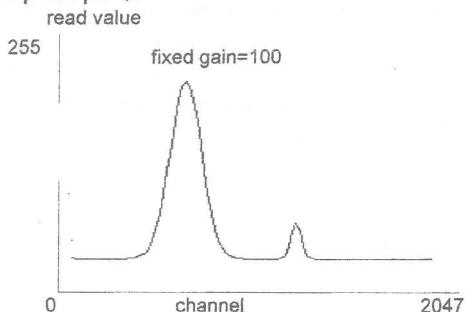
прозореца за измерване да се установи върху това парче от спектъра и то да бъде разгледано с по-добро разрешение (спектрална лупа).

В този случай за сметка на разрешаването на интересуващия ни участък губим информацията за останалата част от спектъра.

Ако искаме едновременно да разрешим част от спектъра и да запазим общия вид на останалата, можем да работим в режима, който дава възможност



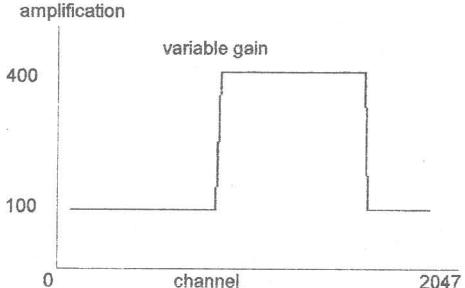
да установим за всеки канал усилването и положението на прозореца.



Заснели сме кадър с постоянно усилване ($\text{Gain}=100$). В кадъра има две ясно изразени линии, като едната по амплитуда е в границите на 90% от пълната скала, а другата е относително около пет пъти по-слаба по интензивност.

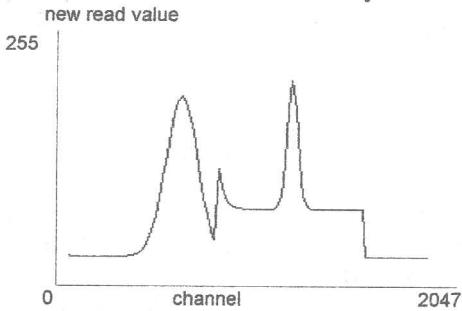
Ако целта ни е относително фотометриране, за нас това е достатъчно, но ако поискаме да направим по-точна оценка на формата на двете линии (дали например във втората не е маскирана трета, доколко са симетрични и т.н.).

В този случай е много удобно да работим не с еднакъв, фиксиран за всички канали коефициент на усилване, а динамично в процеса на "заснемане" на един кадър, да променим коефициента на



усилване, така че, да получим двете ивици съизмерими по използване на обхвата на АЦП. Съответно визуално (на екрана на монитора) съизмерими по височина. За каналите, върху които е разположена по-ярката линия запазваме по-малкия

коefficient на усилване, докато за разполага по-слабата линия увеличаваме усилването.

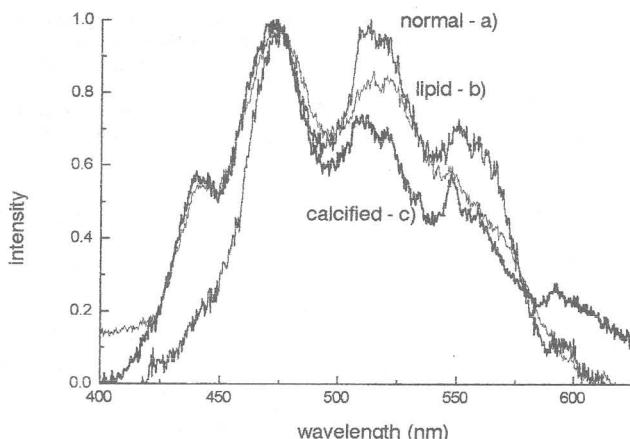


От така получения кадър веднага вече можем да оценим, че втората линия е симетрична, в нея няма скрити други линии и относителната им интензивност е почти 4:1. Предвид по нататъшната обработка е удобно да се работи именно със скокообразно изменение

на усилването. Тъй като промяната на усилването води до промяна на „базовата линия“, скокообразната промяна помага в „съшиването“ на парчетата от спектъра.

Като демонстрация на възможностите на спектрометъра сме представили по-долу три типични нормирани спектъра от флуоресцентната диагностика на артериални съдове с възбудждане с гореспоменатия ексимерен лазер. Спектрите са записани само с един лазерен изстрел, което говори добре за чувствителността на системата. Продължителността на флуоресцентния сигнал почти повтаря тази на лазерния импулс, която е около 100 нс.

Експериментите са извършени в условията *in vitro* със колекторен световод с диаметър 200 мкм. Разработен е и метод за сравняване на получените спектри със съответните критерии и софтуер извършващ цялото управление на системата, обработка на получените спектри, сравняването им и даването на заключителен резултат за вида на обличваната артериална стена.



Типични флуоресцентни спектри на нормална, липидна и калцирана артериална стена