

На правах рукописи

ВЛАДИМИРОВА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**Исследование УФ - лазер индуцированной аутофлуоресценции тканей
глаза человека *in vivo***

03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2012

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Сибирский Федеральный Университет» г. Красноярск на кафедре фотоники и лазерных технологий, института инженерной физики и радиоэлектроники

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук,
доцент кафедры фотоники и лазерных
технологий сибирского федерального
университета

Салмин Владимир Валерьевич

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук
профессор кафедры оптики и биофотоники
Саратовского государственного
университета им. Н.Г.Чернышевского

Кочубей Вячеслав Иванович

доктор физико-математических наук
профессор, главный научный сотрудника
Института лазерной физики СО РАН
(г. Новосибирск)

Мешалкин Юрий Петрович

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский
Государственный Политехнический Университет» (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится « 4 » октября 2012 г. в ____ часов ____ мин
на заседании Диссертационного Совета Д 212.243.05 при ФГБОУ ВПО
«Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского» по
адресу г. Саратов ул. Университетская, 40, корпус III, ком. 34.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им.
В.А. Артисевич Саратовского государственного университета им. Н.Г.
Чернышевского

Автореферат разослан « ____ » _____ 2012 года.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,

профессор



_____ В.Л. Дербов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. В последнее время в медицине для диагностики все чаще используются методы оптической биопсии (Bigio, 2003). Достоинствами оптической биопсии, наряду с большой скоростью проведения измерений (включая диагностику в реальном времени), высоким пространственным разрешением (размер аналитической области может быть порядка длины волны), является так же возможность прижизненного анализа живых тканей без их извлечения и повреждения (Wang, 2004). В оптической биопсии используется большое количество различных методов - это и спектроскопия комбинационного рассеяния света, и флуоресцентная спектроскопия, и абсорбционная, и калориметрическая спектроскопия (Приезжев, 1989.). Из методов оптической биопсии измерение люминесценции живых тканей занимает одну из ведущих позиций благодаря своей высокой чувствительности даже к малым количествам анализируемого вещества, а так же чувствительности к микроокружению флуорофора (Brau, 2006). В методах флуоресцентного анализа можно выделить основанные на измерении аутофлуоресценции (измерение флуоресценции эндогенных флуорофоров) и методы, использующие флуоресцентные метки. Зачастую, в настоящее время из-за высокой токсичности или неустойчивости флуоресцентных зондов, для прижизненной диагностики рациональнее и безопаснее использовать методики, основанные на измерении аутофлуоресценции тканей.

В последнее время флуоресцентные методы получили широкое распространение в медицине в качестве аналитических и диагностических методов за счёт своей чувствительности, универсальности и относительной простоты реализации, причём, зачастую, динамику изменения интенсивности излучения удаётся зарегистрировать даже тогда, когда никакие другие методы не улавливают каких-либо структурных и функциональных изменений в тканях.

При флуоресцентном анализе живых клеток, наибольший интерес представляют восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидов (НАДН и НАДФН) и окисленные формы флавопротеидов. Эти вещества участвуют в таких процессах как: гликолиз, пентозный цикл, цикл Кребса, окисление жирных кислот, а также терминальное окисление – клеточное дыхание. Поэтому, практически любые сдвиги в клеточном метаболизме отражаются в динамике свойств НАД(Ф)Н и флавопротеидов, а она, в свою очередь, может быть выявлена при флуоресцентном анализе живых тканей. Усиление клеточного дыхания сопровождается, как правило, изменением соотношения восстановленных и окисленных форм компонентов дыхательной цепи в сторону преобладания вторых. Угнетение дыхания приводит к противоположному эффекту (Лещенко, 2002).

Катаракта – одно из самых распространенных заболеваний глаза (Веселовская, 2002, Корабаева, 2011). По расчётным данным ВОЗ число слепых в мире достигает 28,1 млн. человек с остротой зрения менее 0,05; слепых и слабовидящих – 42,2 млн. (Корабаева, 2011). В последние

десятилетия в большинстве стран мира, в том числе и в России, отмечается тенденция к повышению уровня заболеваемости катарактой. Это обусловлено, с одной стороны – увеличением продолжительности жизни, а с другой – неблагоприятным влиянием различных факторов окружающей среды (Веселовская, 2002, Полунин, 2001).

До сих пор основной метод лечения катаракты – оперативное удаление помутневшего хрусталика. Медикаментозное лечение катаракты является не слишком эффективным в виду диагностирования катаракты уже на поздних стадиях, когда его применение не приносит заметных результатов (Багиров, 2000).

Основным существующим на данный момент методом диагностики катаракты является биомикроскопия с помощью щелевой лампы. Главный недостаток которого – субъективность: исследуемый участок глаза, освещенный щелевой лампой, наблюдается и оценивается под микроскопом врачом. Поэтому для постановки точного диагноза необходимы дополнительные офтальмологические обследования, требующие больших финансовых затрат и привлечения к работе квалифицированного медицинского персонала. Кроме того, возможности диагностических приборов узко специализированы, предполагают определенные условия для проведения достоверного обследования и лишены мобильности (Плисов, 2010).

В настоящее время проблеме поздней диагностики катаракты уделяется большое внимание. Разрабатываются новые методы диагностики катаракты, но, тем не менее, до сих пор не внедрены в медицинскую практику приборы, сочетающие в себе объективность, возможность постановки диагноза на начальных стадиях (когда стандартные методики не улавливают ни каких изменений), возможность прогнозировать вероятности развития катаракты, а так же общедоступность.

Другим важным компонентом глаза является роговица. Она несёт как защитную функцию, так и имеет большую преломляющую силу. При проведении неинвазивной редокс-флуориметрии роговицы на животных, выявлено, что сигнал аутофлуоресценции изменяется при ношении контактных линз (Tsubota, 1992). Так же выявлена зависимость изменений в флуоресценции от проницаемости контактных линз. Как следствие, редокс-флуориметрия может являться индикатором метаболических изменений роговицы при ношении контактных линз. К сожалению, информации о применении данного метода для диагностики состояния роговицы человека при ношении контактных линз нет, поэтому было принято решение восполнить данный пробел.

Цель исследования – разработка прибора и метода для регистрации флуоресценции для диагностики стадии возрастной катаракты и состояния роговицы.

Задачи исследования:

1. Разработка методик регистрации флуоресценции хрусталика и роговицы с использованием экспериментального автоматизированного лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения.
2. Исследование аутофлуоресценции хрусталиков людей больных зрелой катарактой при различных стадиях заболевания.
3. Исследование аутофлуоресценции роговицы при ношении контактных линз.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

1. Впервые показано, что при фронтальном возбуждении аутофлуоресценции хрусталика человека *in vivo* излучением с длиной волны 337,1 нм в нормированных спектрах флуоресценции здоровых хрусталиков и хрусталиков людей, страдающих катарактой, максимальное различие наблюдается на длине волны 440 нм, тогда как длины волн 400 нм и 500 нм являются изобестическими точками.
2. Впервые предложен спектральный критерий - индекс помутнения хрусталика, определяемый по значениям интенсивности флуоресценции на длинах волн 400 нм, 440 нм, 500 нм, нормированный таким образом, что для здорового хрусталика он равен нулю, а для хрусталика пораженного зрелой возрастной катарактой единице
3. Впервые показано, что индекс помутнения хрусталика, имеет высокую корреляцию со стадиями развития возрастной катаракты.
4. Впервые показано, что окисление аскорбиновой кислоты, находящейся в хрусталике, не может вносить существенный вклад в его спектр флуоресценции при развитии возрастной катаракты в диапазоне длин волн от 370 нм до 600 нм.
5. Впервые выполнено сравнение и показана более высокая точность УФА лазерно-индуцированной аутофлуоресцентной спектроскопической методики диагностики стадий возрастной катаракты с распространенным методом диагностики с использованием щелевой лампы.
6. Впервые показано, что при длительном ношении контактных линз происходят изменения в спектре флуоресценции роговицы.

Практическая значимость

1. Разработан окулярный зонд для лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения обеспечивающий фронтальное возбуждение флуоресценции хрусталика.
2. Разработана лазерно-флуоресцентная методика диагностики состояния хрусталика позволяющая оценивать стадию возрастной катаракты.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При фронтальном возбуждении флуоресценции длинной волны 337,1 нм в спектрах флуоресценции катарактальных и здоровых хрусталиков максимальное различие в нормированных спектрах наблюдается на длине волны 440 нм, а длины волн 400 нм и 500 нм соответствуют изобестическим точкам.

2. Значение индекса помутнения хрусталика имеет высокую корреляцию с номером стадии развития катаракты.

3. Флуоресценция окисленной аскорбиновой кислота не вносит существенный вклад в спектр флуоресценции катарактального хрусталика в диапазоне длин волн от 370нм до 600нм.

4. При длительном ношении контактных линз происходят изменения в спектре УФА лазер-индуцированной аутофлуоресценции роговицы.

Апробация материалов диссертации и публикации

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены на конференции Technical Digest ICONO/LAT (Minsk 2007) с докладом «Laser fluorescent method for differential diagnostics of cataract»; на всероссийской научно технической конференции студентов и аспирантов «Молодежь и наука: начало XXI века» (Красноярск, 2009) с докладом «Исследование аутофлуоресценции биологических тканей хрусталика для разработки новых методов оптической биопсии»; на конференции студентов, аспирантов и молодых ученых-физиков НКСФ-XXXVIII (Красноярск, 2009) с докладом «Разработка лазерно-флуоресцентного метода дифференциальной диагностики ядерной катаракты»; на научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых физиков НКСФ – XXXVI (Красноярск 2007) с докладом «Методика диагностики ранней катаракты»; на Тринадцатой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых ВНКСФ-13 (Ростов-на-Дону, Таганрог, 2007) с докладом «Методика дифференциальной диагностики старческой катаракты»; на Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2007) с докладом «Лазерно-флуоресцентная методика дифференциальной диагностики катаракты»; на научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых физиков НКСФ – XXXV (Красноярск, 2006) с докладом «Разработка флуоресцентного метода для ранней диагностики катаракты».

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ. Получено 2 патента РФ на изобретение и удостоверение на рационализаторское предложение.

Личный вклад автора

Проделанная работа представляет из себя самостоятельный труд автора. Соискателем лично проведено теоретическое исследование состояния темы, разработка методики эксперимента, проведена обработка и анализ результатов. В подборе и предварительном офтальмологическом обследовании пациентов большое содействие оказано Оскирко С.А.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации составляет 119 страниц машинописного текста. Список литературы содержит 172 источников, из которых 58 отечественных и 114 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 7 таблицами.

Краткое содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность поставленных задач, обозначена цель работы, научная новизна проведенного исследования, научно-практическая значимость, основные результаты и положения выносимые на защиту.

Глава 1. Основы флуоресцентной диагностики

Данная глава содержит обзор литературы по современным методам диагностики катаракты. Дается характеристика используемым в настоящее время приборам и методам диагностики катаракты, указываются их преимущества и недостатки. Описываются основы флуоресцентной диагностики и основные тканевые флорофоры содержащиеся в хрусталике, а так же применение флуоресцентных методики для диагностики различных патологий.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Установка для лазерно-флуоресцентного анализа

Для проведения исследований использовался экспериментальный автоматизированный лазерный спектрофлуориметр с оптоволоконной доставкой излучения, схема которого представлена на рисунке 1. Данный прибор можно использовать для регистрации флуоресценции ткани, причём при использовании окулярного зонда удобна регистрация флуоресценции хрусталика. Так же разработано программное обеспечение, автоматизирующее первичную обработку полученных данных при работе на лазерном спектрофлуориметре.

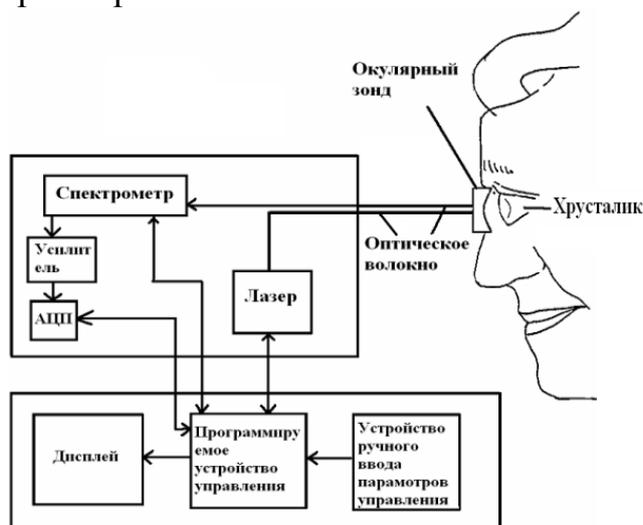


Рис. 1. Принципиальная схема экспериментального автоматизированного лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения для регистрации флуоресценции хрусталика.

В качестве источника возбуждения используется импульсно-периодический УФ лазер на молекулярном азоте, имеющий следующие технические характеристики: длина волны излучения 337,1 нм; энергия импульса излучения 50 мкДж; длительность импульса генерации 2 нс; максимальная частота следования импульсов 500 Гц.

Отличительной особенностью данного типа световода является сниженная собственная люминесценция в области длин волн 350-500 нм за счет использования неорганической светоотражающей оболочки, а также малые потери на длине волны излучения азотного лазера, (менее 100 дБ/км).

Окулярный зонд состоит из нескольких основных частей. В него входит пластина (3), в которой закрепляются оптические волокна (1), для доставки лазерного излучения к исследуемой ткани, а также излучение исследуемой ткани через оптическое волокно (2) попадает к спектрометру. Оптические волокна (1) и (2) представляют собой два спаянных на одном конце волокна с диаметром сердцевины 400 мкм, числовой апертурой 0,14 и длиной 2 м. Торцев датчика был закрыт оптической пластиной из плавленного кварца, которая фиксировала расстояние между торцами световодов (1), (2) и объектом.

Схема окулярного зонда для регистрации флуоресценции хрусталика представлена на рис. 2.

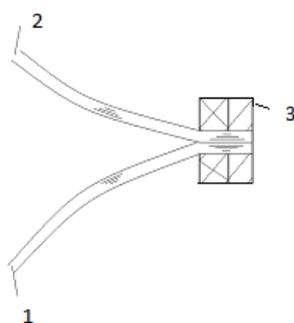


Рис. 2. Окулярный зонд для регистрации флуоресценции хрусталика.

Работа экспериментального автоматизированного лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения для регистрации флуоресценции хрусталика осуществляется по следующей схеме: лазер генерирует на длине волны 337,1 нм импульсно-периодическое УФ излучение. Излучение лазера через оптическое волокно доставляется к окулярному зонду. Из окулярного зонда с закрепленным в нем оптическим волокном излучение лазера падает на объект исследования. В нем излучение лазера возбуждает флуоресценцию. Излучение флуоресценции исследуемой ткани, попадающее на торец оптического волокна, подводится к спектрометру. Со спектрометра электрический сигнал попадает в усилитель. Далее на вход аналого-цифрового преобразователя подается усиленный сигнал. В устройство управления поступают данные с аналого-цифрового преобразователя для их дальнейшей обработки.

Весь комплекс в целом управляется устройством управления. Устройство управления пускает сигнал на спектрометр для установки необходимой длины волны, выдает на лазер импульс запуска, посылает на аналого-цифровой преобразователь команду на считывание данных. Кроме того в устройстве управления осуществляется получение и обработка полученных данных исследования.

Вся представленная выше схема работы прибора, а так же запись и обработка спектров, полностью автоматизированы.

Так же необходимо отметить следующие особенности данной установки: использование оптоволоконной доставки излучения до объекта исследования позволяет расширить рабочую зону до всей поверхности хрусталика, что позволяет применять методику для катаракт любой локализации; оптическое волокно позволяет не использовать жёсткую фиксацию головы пациента относительно корпуса прибора, и, как следствие, избежать необходимой в таком случае юстировки прибора под каждого пациента.

Использование в качестве источника возбуждения импульсно периодического лазера позволило повысить отношение «сигнал-шум», а так же увеличить число измерений в единицу времени, вследствие чего снижается длительность измерения и уменьшается влияние физиологических факторов. Кроме того, использование лазера также позволяет исключить коротковолновую (менее 300 нм) область спектра и за счет этого уменьшить вероятность радиационного повреждения глаза.

2.2. Объект исследования. Хрусталик

Исследование выполнялись на базе НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и были одобрены этическим комитетом КрасГМУ.

Первичный осмотр пациентов и постановка диагноза осуществлялась с использованием стандартных методик. Предварительно каждый пациент давал добровольное согласие на проведение исследования в письменном виде.

В соответствии с целями и задачами исследования эксперимент по диагностике катаракты был разделён на три этапа. Всего в ходе эксперимента было обследовано 257 человек, из которых сформированы 6 групп.

На первом этапе для исследования флуоресценции хрусталика было выделено две группы:

1 группа состояла из 18 человек, в возрасте до 25 лет – люди без патологий хрусталика, признанные по результатам дополнительных анализов условно здоровыми;

2 группа состояла из 29 человек, в возрасте после 50 лет – с диагнозом возрастной катаракты различной степени зрелости.

На втором этапе для разработки критериев оценки возрастных изменений хрусталика и при возрастной катаракте на разных стадиях развития сформированы 3, 4 и 5 группы:

3 группа состояла из 43 человек (исследования производились на каждом глазу), средний возраст до 25 лет – люди, без патологий хрусталика, признанные по результатам дополнительных анализов условно здоровыми;

4 группа состояла из 28 человек (исследования производились на каждом глазу), средний возраст 58 ± 9 лет – люди без нарушения функций

зрения, с развившимся факосклерозом (центр хрусталика уже уплотнился настолько, что образовал ядро), признанные по результатам дополнительных анализов условно здоровыми;

5 группа состояла из 96 человек (исследования производились на каждом глазу), средний возраст 63 ± 9 года – больные старческой катарактой трех степеней зрелости, из которых у 50 человек (66 глаз) – начальная катаракта; у 40 человек (61 глаз) – незрелая катаракта; а у 57 человек (65 глаз) – зрелая катаракта.

На третьем этапе для оценки возможностей методики диагностики была сформирована группа №6.

6 группа состояла из 43 человек разного пола. В данной группе для постановки диагноза использовалась биомикроскопия на щелевой лампе. Первоначально диагноз в 6 группе был поставлен по характеру помутнений без дополнительных обследований. В эксперименте участвовали пациенты разных полов.

2.3. Разработка методики регистрации спектров флуоресценции хрусталика. Этап 1

Для удобства крепления оптического зонда было принято решение усовершенствовать универсальную пробную очковую оправу, путём закрепления специально разработанных металлических дисков в держатели для диагностических линз. Диски были оснащены специальным отверстием в центре для удержания окулярного зонда.

Преимущества данного способа: возможность регулировать височную длину дужек оправы и межзрачковое расстояние под анатомические особенности каждого пациента, а так же возможность контролировать направление взгляда пациента. Оправа не только удобна в использовании, но и на результат измерения не влияют произвольные движения головы пациента.

Спектры флуоресценции регистрировались в интервале длин волн от 370 нм до 600 нм с шагом в 10 нм. Длина волны возбуждения 337,1 нм. После записи спектры имели вид: $I = I(\lambda)$, где I – интенсивность флуоресценции каждого участка ткани в произвольных единицах; λ – длина волны в нм. Применение ультрафиолетового излучения с длиной волны 337,1 нм обосновано тем, что именно излучение этого диапазона максимально поглощается хрусталиком (далее проходит только около 1%) и не вызывает флуоресценцию других сред глаза (Voke, 1999), например, роговицы и влаги, что позволяет избежать паразитной флуоресценции других его сред и кроме того, не вызывает повреждения тканей глаза.

Спектры флуоресценции хрусталика *in situ* снимались с каждого глаза в отдельности, после чего, производилось усреднение по всем полученным спектрам. При анализе данных была проведена нормировка спектров флуоресценции на суммарные значения интенсивностей по всем измеренным точкам спектра.

Обработка полученных спектров выполнялась с помощью Microsoft Excel и Microcal Origin 7.0.

2.4 Алгоритм обработки спектров

Спектры, записанные от каждого хрусталика здоровых и больных зрелой катарактой людей, собирались в массив данных, имеющий вид (Обработка информации осуществлялась в MS Excel 2007):

$$\begin{pmatrix} \lambda_1 & I_1^1 & \cdots & I_1^k \\ \lambda_2 & I_2^1 & \cdots & I_2^k \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \lambda_n & I_n^1 & \cdots & I_n^k \end{pmatrix}, \quad (2.1)$$

где $I_p^k = I_p^k(\lambda_p)$ – интенсивность флуоресценции k-го хрусталика на длине волны λ_p , произвольные единицы;

λ_p – длина волны, нм;

p – номер строки в массиве данных, $p = 1, \dots, n$;

n – количество опорных точек для записи спектра, $n = 24$.

В итоге получилось 2 массива данных для здоровых и катарактальных хрусталиков соответственно.

Поскольку различные серии экспериментов имели разную интенсивность флуоресценции, для последующего анализа необходимо было выявить наиболее характерное поведение спектров флуоресценции. Для решения этой задачи на первом этапе решено было осуществлять нормировку интенсивности флуоресценции на площадь под спектральной кривой. Данная нормировка позволила устранить амплитудные искажения, вызванные не постоянным расстоянием от датчика до объекта измерения (в виду анатомических особенностей) и представила возможность сравнивать разные серии экспериментов. Нормировка осуществлялась делением значений интенсивности на разных участках спектра на среднее значение интенсивности, полученное по всему спектру.

Площадь под спектральной кривой для k-го хрусталика равна:

$$S^k = \sum_{p=1}^n I_p^k(\lambda_p). \quad (2.2)$$

После нормировки получаем:

$$i^k(\lambda_p) = N \frac{I^k(\lambda_p)}{\sum_{p=1}^N I^k(\lambda_p)}. \quad (2.3)$$

Итак получаем массив данных вида:

$$\begin{pmatrix} \lambda_1 & i_1^1 & \cdots & i_1^p \\ \lambda_2 & i_2^1 & \cdots & i_2^p \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \lambda_N & i_N^1 & \cdots & i_N^p \end{pmatrix}. \quad (2.4)$$

Дальнейшая обработка спектров для каждого состояния хрусталика проводится отдельно для здоровых и больных зрелой возрастной катарактой.

В итоге получается два массива данных. Каждый массив анализируется отдельно.

Интенсивность флуоресценции в каждом массиве нормируется на площадь под спектральной кривой согласно выражению (2.2). После этого находится усредненный по всем участкам спектр для каждого состояния хрусталика, отдельно для больных и прозрачных хрусталиков:

$$J_d(\lambda_p) = \bar{J}_d(\lambda_p) \pm \sigma_{J_d}(\lambda_k), \quad (2.5)$$

где $J_d(\lambda_k)$ – интенсивность флуоресценции;

$$\bar{J}_d(\lambda_p) = \frac{1}{M} \sum_{m=1}^M i_m(\lambda_p) - \text{усредненная интенсивность};$$

M – размер выборки

d – диагноз: катарактальные (кат) или прозрачные (зд) хрусталики.

Среднеквадратичное отклонение от среднего находится по формуле:

$$\sigma_J(\lambda_p) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{m=1}^M (i_m(\lambda_p) - J_d(\lambda_p))^2}. \quad (2.6)$$

На следующем этапе для определения длин волн, при которых максимально различаются спектры катарактальных и прозрачных хрусталиков строились нормированные разностные спектры. Интенсивность нормированного разностного спектра для длины волны λ_p (где $p = 1, \dots, 24$) имеет следующий вид:

$$\Delta J_s(\lambda_p) = \frac{(J_{кат}(\lambda_p) - J_{пр}(\lambda_p))}{\sqrt{(\sigma_{J_{кат}}^2(\lambda_p) + J_{пр}^2(\lambda_p))}}. \quad (2.7)$$

Нормированный разностный спектр позволяет выявить наиболее значимо различающиеся участки спектров в исследуемых выборках. В качестве этих участков выбирались длины волн, соответствующие максимумам и минимумам нормированного разностного спектра. Критерием значимости выбиралось превышение амплитуды нормированного разностного спектра на величину большую или равную 1, что соответствовало различию между спектрами на выбранном интервале на величину, превышающую стандартное отклонение σ . Нулевые точки разностного спектра также использовались нами в качестве реперных, при этом интенсивности флуоресценции на этих длинах волн служили в качестве внутреннего эталона в разрабатываемой методике.

Из разностных спектров находились длины волн, соответствующие их максимальному и минимальному значению λ_{max} и λ_{min} .

Из исходных спектральных данных определялось отношение вида:

$$\mathfrak{J}_d = \frac{J_d(\lambda_{min})}{J_d(\lambda_{max})} \quad (2.8)$$

и с помощью Т-теста производилась оценка достоверности различий между $\mathfrak{J}_{кат}$ и $\mathfrak{J}_{пр}$ для прозрачных и катарактальных хрусталиков.

2.5. Разработка методики дифференциальной диагностики катаракты. Этап 2

Для разработки методики дифференциальной диагностики катаракты было обследовано 167 человек разного пола, из которых сформированы группы: 3, 4 и 5.

Так как при анализе спектров флуоресценции ранее проведённого исследования было выявлено, что максимальное отличие в спектре флуоресценции катарактального и здорового хрусталика наблюдается на длине волны 440 нм, а длины волн 400 нм и 500 нм, являются изобестическими точками, было решено регистрировать собственную флуоресценцию хрусталика в этих точках.

Эксперимент проводился на 3, 4 и 5 группах людей. Каждому человеку предварительно был поставлен точный диагноз стадии развития катаракты либо подтверждено здоровое состояние хрусталика. Для каждого хрусталика в группах был рассчитан критерий помутнения хрусталика (α) по формуле (2.9). Для стандартизации критерий α был принят таким, чтобы бы равнялся нулю для идеально здорового и единицы для максимально катарактального хрусталика.

Регистрация флуоресценции производилась последовательно с каждого глаза. Интенсивность флуоресценции рассчитывалась путём программного усреднения 500 импульсов на каждой длине волны, причём вырезались точки с аномально высокой и низкой интенсивностью. Выборка точек с аномальной интенсивностью производилась путём сравнения средней интенсивности всего измерения с каждой точкой в отдельности. Все значения, не попадающие в допустимый 20% интервал, вырезались, после чего происходило повторное усреднение оставшихся значений.

Для количественной оценки патологических изменений хрусталика был разработан спектральный критерий (индекс помутнения хрусталика) изменений в спектре флуоресценции хрусталика, позволяющий, зная интенсивности флуоресценции на трёх длинах волн (400 нм, 440 нм, 500 нм), охарактеризовать степень помутнения хрусталика.

Расчёт значения индекса помутнения хрусталика производился по формуле (2.9).

$$\alpha = \frac{\eta_H - \eta_0}{\eta_H - \eta_K} \quad (2.9)$$

где: $\eta_{0,K,H}$ - форм-фактор спектральной кривой для исследуемого, катарактального и здорового хрусталика, рассчитываемый по формуле (2.10):

$$\eta_{0,K,H} = \frac{I_{440}^{0,K,H}}{I_{400}^{0,K,H} - I_{500}^{0,K,H}} \quad (2.10)$$

где: $I_{400}^{0,K,H}$ - интенсивность флуоресценции исследуемого, катарактального и здорового хрусталика на длине волны 400 нм;

$I_{440}^{0,K,H}$ - интенсивность флуоресценции исследуемого, катарактального и здорового хрусталика на длине волны 440 нм;

$I_{500}^{0,K,H}$ - интенсивность флуоресценции исследуемого, катарактального и здорового хрусталика на длине волны 500 нм.

Рассчитанный критерий позволяет количественно оценить степень помутнения хрусталика.

2.6. Апробация возможностей методики лазерно-флуоресцентной диагностики катаракты. Этап 3

Для апробации методики была сформирована шестая группа, состоящая из 43 человек разного пола. Всем участвующим в эксперименте лицам поставлен диагноз по характеру помутнений только с применением биомикроскопии на щелевой лампе без дополнительных обследований.

Далее всей группе была проведена диагностика катаракты с помощью лазерно-флуоресцентного анализа. В результате чего было проведено сравнение диагноза поставленного с помощью лазерно-флуоресцентного анализа и с помощью стандартной методики с применением щелевой лампы. По результатам сравнения была составлена таблица 3 включающая в себя данные двух методик. Далее всем пациентам было проведено полное офтальмологическое обследование и поставлен окончательный диагноз.

2.7. Исследование роли тканевых флуорофоров в формировании спектра флуоресценции хрусталика при ядерной катаракте

Многие важные биомолекулы хрусталика характеризуются собственной флуоресценцией. Так на длине волны 440-480 нм флуоресцирует НАДН. Это вещество участвует в таких важнейших внутриклеточных процессах, как гликолиз и дыхание. Поэтому практически любые сдвиги в клеточном метаболизме отображаются на динамике свойств НАДН. Витамин С также обладает собственной флуоресценцией на длине волны 440 нм. Он считается одним из основных факторов влияющих на развитие катаракты. Окисляясь в течении жизни человека аскорбиновая кислота изменяет структуру хрусталика и вносит существенный вклад в спектр его флуоресценции (Lohmann, 1989). Было принято решение проверить данное утверждение

Для этого на спектрофлуориметре СМ 2203 последовательно снимались спектры флуоресценции аскорбиновой кислоты с различными степенями окисления.

Измерения спектров и флуоресценции аскорбиновой кислоты производились в диапазоне длин волн 370-600 нм в соответствии с интервалами регистрации спектров флуоресценции хрусталика. В кювету, для измерения флуоресценции веществ с высокой оптической плотностью, помещали раствор НАДН концентрации 10^{-5} М, либо 5% аскорбиновую кислоту различной степени окисления. Аскорбиновая кислота была взята в ампулах для инъекций, и для получения необходимой степени окисления осуществлялся свободный доступ кислорода. После чего производилась запись спектров. При анализе данных была проведена нормировка спектров флуоресценции для получения единичной площади под каждой кривой.

Все спектры были аппроксимированы с использованием контура Лоренца.

Анализ и обработка результатов проводились с применением пакетов прикладных программ Microsoft Excel и Microcal Origin 7.0.

2.8. Исследование состояния роговицы при ношении контактных линз

Для регистрации флуоресценции роговицы были внесены изменения в лазерный спектрофлуориметр с оптоволоконной доставкой излучения. Необходимость внесения изменений была обусловлена особенностями диагностического объекта: при снятии спектров флуоресценции большое значение имеет угол попадания излучения возбуждения на исследуемую ткань, а так же важна зона регистрации, так как если не учитывать эти особенности можно получить искажённые спектры, например с примесной флуоресценцией хрусталика. В виду всего вышесказанного угол падения луча возбуждения на роговицу подбирался таким образом, чтобы пройдя через роговицу, он полностью отразился от радужки, не достигая хрусталика. Причём надо заметить, что отражённое излучение не будет вносить вклад в спектр флуоресценции в виду не совпадения диапазонов возбуждения и регистрации. Кроме того в эксперименте использовалось увеличение фоновой освещённости для максимального сужения зрачка и, как следствие, увеличения зоны перекрытия радужной оболочки.

Учитывая все вышесказанное, возникла потребность в доработке держателя для диагностического зонда. Для этого была использована щелевая лампа, а так же устройство для закрепления окулярного зонда.

Устройство для крепление зонда сконструировано так, что позволяет перемещать диагностический зонд не только в горизонтальном и вертикальном положении, но так же позволяет регулировать угол наклона датчика относительно объекта исследования. В результате чего возможна юстировка прибора, так, что при наведении щелевой лампы на исследуемую область, автоматически происходит точная установка зонда, а при необходимости есть возможность дополнительно регулировать расстояние до объекта. При исследовании зонд располагался чуть ниже диагностической области по углом в 45 градусов к исследуемому объекту. Это, с одной стороны, позволяло избежать паразитной флуоресценции хрусталика за счет отражения излучения от радужной оболочки, а с другой стороны, позволяло избежать влияния таких физиологических особенностей органа зрения как моргание и попадание ресничек в область регистрации.

В приспособлении используется манипулятор стереотаксической рамки, в которой на укороченной штанге закрепляется световод.

Спектры флуоресценции роговицы регистрировались с двух участков роговицы, расположенных за пределами видимой проекции хрусталика в положении 3 и 9 часов. Положение 6 часов не использовалось из-за высокой вероятности попадания излучения накачки в хрусталик, а положение 12 часов не использовалось по причине прикрытия этой зоны веком, а также высокой вероятности перекрытия луча при моргании.

Регистрация спектров производилась однократно с каждой зоны обоих глаз.

Объектом исследования являлась роговица.

В эксперименте принимали участие 3 группы добровольцев сформированные из 49 человек из которых:

1 группа - 23 человека, люди не носящие контактные линзы;

2 группа - 17 человек, обследуемые со сроком ношения менее 5 лет;

3 группа - 9 человек со сроком ношения от 5 до 10 лет.

Для всех испытуемых регистрировались спектры флуоресценции роговицы обоих глаз с различных зон роговицы (выбор зон регистрации описан ранее). Далее для всех групп спектров производилась нормировка на среднее значение под кривой. После чего рассчитывались средние нормированные спектры по группе, строился спектр корреляции с целью выявления длин волн, на которых изменения люминесценции в наибольшей степени коррелируют со сроком ношения контактных линз. Корреляционный спектр позволил определить точку положительного максимума на длине волны 410 нм и отрицательного максимума на длине волны 460 нм. Далее производился расчёт интенсивностей люминесценции роговицы на указанных длинах волн. Определялись средние отношения, строилась диаграммы зависимости от срока ношения линз, а также вычислялись вероятности различия средних отношений интенсивностей люминесценции на указанных длинах волн по Т-тесту.

Глава 3. Результаты и обсуждения

3.1 Регистрация флуоресценции хрусталика

Усреднённые спектры катарактального и прозрачного хрусталика после нормировки с учётом погрешности согласно формулам (2.1)-(2.8) приведены на рис. 3. Из графика видно, что на длине волны 450 нм наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции катарактального хрусталика. Уменьшение интенсивности флуоресценции на этой длине волны предположительно вызвано разрушением клеток хрусталика и, соответственно, снижением выработки в нем НАДН за счет уменьшения количества митохондрий. На длине волны 390 нм видно появление пика, скорее всего, причиной его появления является образование в хрусталике соединительной ткани и, как следствие, флуоресценцией коллагена.

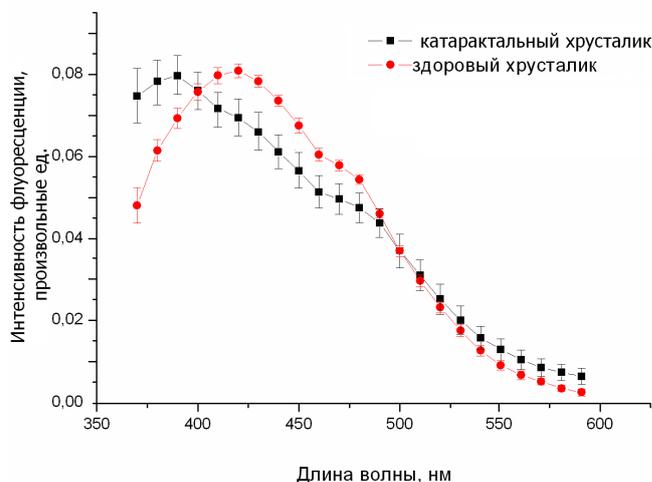


Рис. 3. Усредненные спектры

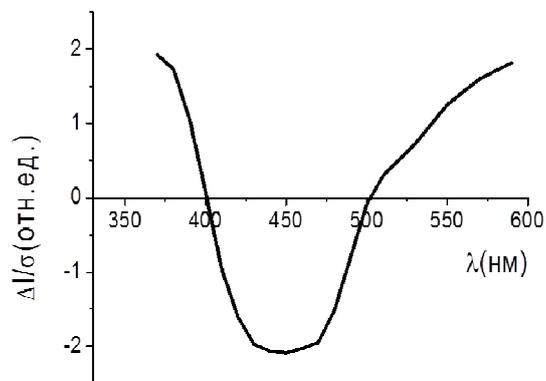


Рис. 4. Нормированный

флуоресценции хрусталиков здоровых людей и больных зрелой возрастной катарактой

разностный спектр катарактального и здорового хрусталика

По усредненным спектрам флуоресценции был построен разностный спектр, нормированный на стандартное отклонение этих кривых (рис. 4.).

Анализ разностного спектра флуоресценции здоровых и катарактальных хрусталиков показал, что максимальное отличие в спектрах флуоресценции хрусталика наблюдается на длине волны 440 нм, в то время как 400 нм и 500 нм являются изобестическими точками. Поэтому собственную флуоресценцию хрусталика для уменьшения световой нагрузки на глаз было решено регистрировать в трех точках с длинами волн 400, 440 и 500 нм.

3.2. Диагностика состояния хрусталика

На втором этапе исследования эксперимент проводился на 3, 4 и 5 группах людей. Каждому человеку предварительно был поставлен точный диагноз стадии развития катаракты, либо подтверждено здоровое состояние хрусталика. В результате измерения для каждого хрусталика в группах был рассчитан спектральный критерий по формуле (2.10.). Средние значения форм-факторов и стандартные отклонения представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Средние значения формфакторов спектра люминесценции хрусталика и их стандартные отклонения при различных стадиях развития катаракты

| Стадия | η (отн.ед.) | $\Delta\eta$ (отн.ед.) |
|---------------------|------------------|------------------------|
| Здоровые | 0,608 | 0,011 |
| Факосклероз | 0,522 | 0,012 |
| Начальная катаракта | 0,509 | 0,017 |
| Незрелая катаракта | 0,467 | 0,008 |
| Зрелая катаракта | 0,445 | 0,026 |

Значение индекса помутнения хрусталика α и стандартные отклонения вычислялись по формуле (2.9) с использованием форм-факторов, приведенных в таблице 1. Значения индекса помутнения хрусталика для различных стадий развития возрастной катаракты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Значения индекса помутнения хрусталика для различных стадий развития возрастной катаракты:

| N | Стадия развития катаракты | α (отн.ед.) |
|---|---------------------------|--------------------|
| 0 | норма | $0 \pm 0,069$ |
| 3 | факосклероз | $0,52 \pm 0,075$ |
| 4 | начальная катаракта | $0,6 \pm 0,1$ |
| 5 | незрелая катаракта | $0,864 \pm 0,047$ |
| 6 | зрелая катаракта | $1 \pm 0,16$ |

Как оказалось при соответствующем представленном в таблице выборе номера стадии возрастной катаракты получается довольно высокая

корреляция стадии развития катаракты и средним значением индекса помутнения хрусталика. Данные представлены на графике (Рис. 5).

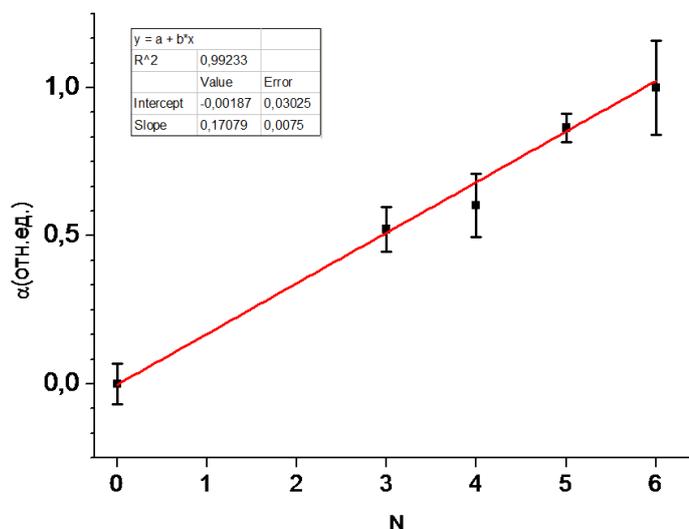


Рис. 5. Зависимость индекса помутнения хрусталика от стадии развития возрастной катаракты.

Равномерный характер увеличения индекса помутнения хрусталика с увеличением стадии развития катаракты позволяет предложить использование равномерной шкалы для установления стадии развития катаракты по значению индекса помутнения. В этом случае номер стадии вычисляется по величине индекса помутнения в соответствии со следующей формулой:

$$N = \text{OKРУГ}\left(\frac{\alpha}{0,17}; 0\right) \quad (3.1)$$

3.3. Апробация возможностей методики лазерно флуоресцентной диагностики катаракты

Для апробации методики была сформирована шестая группа состоящая из 43 человек разного пола. Всем участвующим в эксперименте лицам поставлен диагноз по характеру помутнений с применением биомикроскопии на щелевой лампе без дополнительных обследований.

Далее всей группе была проведена диагностика катаракты с помощью лазерно-флуоресцентного анализа.

После чего было проведено сравнение диагнозов поставленных с использованием щелевой лампы и лазерно-флуоресцентного анализа. Результаты сравнения этих двух методик представлены в таблице 3.

Сравнительная характеристика традиционного осмотра и флуоресцентной диагностики

| Диагноз, поставленный врачом, при биомикроскопии на щелевой лампе | Диагностика с использованием лазерно-флуоресцентного анализа | Полное офтальмологическое обследование |
|---|--|---|
| Катаракта не выявлена, хрусталик в стадии факосклероза – 13 глаз | 10 глаз – факосклероз хрусталика; 3 глаза стадия начальной катаракты. | 10 глаз – факосклероз хрусталика; 3 глаза стадия начальной катаракты. |
| Стадия начальной катаракты - 21 глаз | 16- стадия начальной катаракты; 5 – стадия незрелой катаракты. | 16- стадия начальной катаракты; 5 – стадия незрелой катаракты. |
| Стадия незрелой катаракты - 29 глаз | 5глаз – стадия начальной катаракты; 13 – стадия незрелой катаракты; 3 – стадия зрелой катаракты. | 5глаз – стадия начальной катаракты; 13 – стадия незрелой катаракты; 3 – стадия зрелой катаракты. |
| Стадия зрелой катаракты - 23 глаза | 19 глаз – стадия зрелой катаракты; 4 – стадия незрелой катаракты | 19 глаз – стадия зрелой катаракты; 4 – стадия незрелой катаракты |

В дальнейшем всем пациентам из шестой группы было проведено полное офтальмологическое обследование. Результаты обследования подтвердили диагнозы поставленные с помощью лазерно-флуоресцентного анализа.

Данный результат подтверждает объективность лазерно-флуоресцентного исследования. Причём данное исследование значительно менее затратно по сравнению с рутинными методами обследования применяемыми в настоящее время в клинике. Предложенная методика позволяет сократить время как врачей так и пациентов для постановки точного диагноза. В силу небольшой длительности диагностики состояния хрусталика одного пациента возможно проводить скрининговые исследования больших групп людей, для выявления групп риска по заболеванию.

3.4. Исследование роли тканевых флуорофоров на формирование спектра флуоресценции хрусталика при ядерной катаракте

Спектры нормированы на площадь под спектральной кривой. Все спектры аппроксимированы с использованием контура Лоренца.

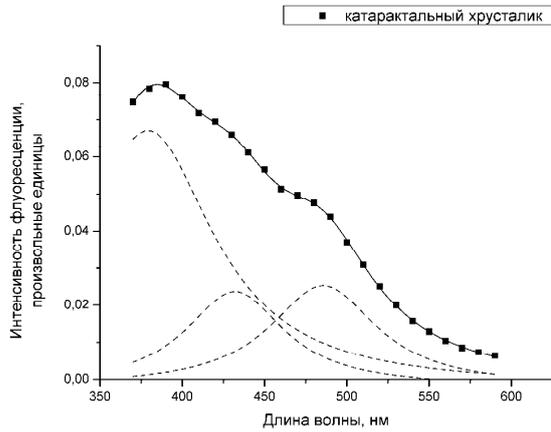


Рис. 6. Аппроксимированный график флуоресценции катарактального хрусталика контуром Лоренца

Из представленного графика (рис. 6) можно увидеть, что: основные пики флуоресценции катарактального хрусталика находятся на длинах волн 379 ± 2 нм, 432 ± 3 нм, 486 ± 2 нм; полуширина соответственно 97 ± 12 нм, 73 ± 15 нм, 79 ± 5 нм; коэффициент корреляции 0,9998.

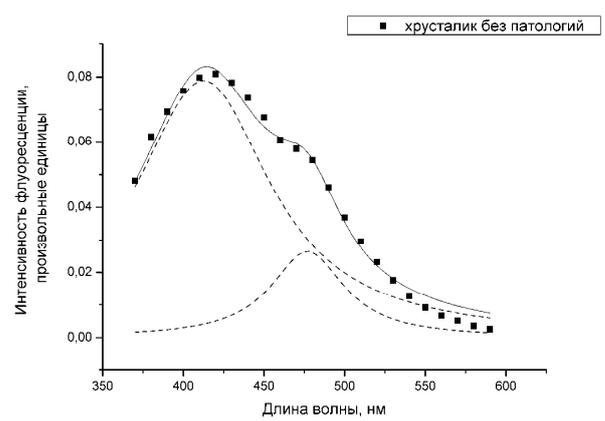


Рис. 7. Аппроксимированный график флуоресценции прозрачного хрусталика с помощью контура Лоренца

Из представленного графика (рис. 7) можно увидеть: основные пики флуоресценции хрусталика без патологий находятся на длинах волн 413 ± 3 нм, 477 ± 4 нм; полуширина соответственно 101 ± 10 нм, 55 ± 15 нм; коэффициент корреляции 0,99086.

Для проверки утверждения из патента (Lohmann, 1989) в котором описывается метод определения зрелости возрастной катаракты, где основным флуорофором хрусталика считают аскорбиновую кислоту, которая, при окислении в хрусталике влияет на нативность его структуры и вносит основной вклад в спектр его флуоресценции. В связи с этим было решено проверить данное предположение, для чего были сняты спектры флуоресценции аскорбиновой кислоты с разной степенью окисления, так как в хрусталике при катаракте наблюдается увеличение соотношения окисленной к не окисленной аскорбиновой кислоты. Так же был прописан спектр флуоресценции НАДН с концентрацией 10^{-5} М, что соответствует физиологической концентрации НАДН в хрусталике.

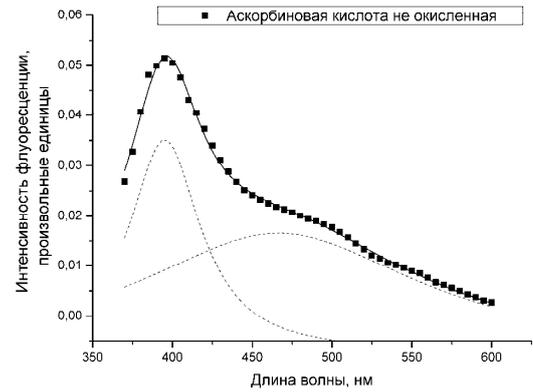
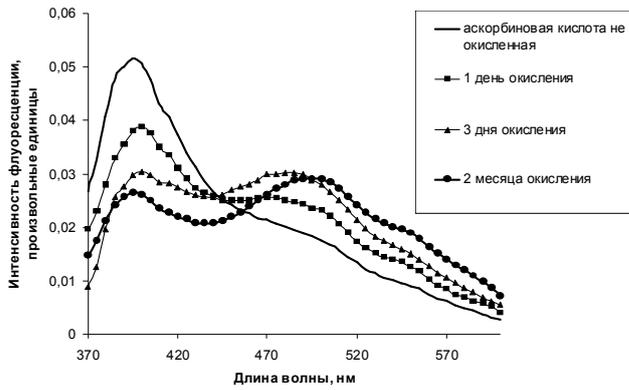


Рис. 8. Флуоресценция аскорбиновой кислоты различной степени окисления

Рис. 9. Аппроксимированный график флуоресценции не окисленной аскорбиновой кислоты с помощью контура Лоренца

Из представленных графиков (рис. 8) видно, что аскорбиновая кислота со временем окисляется (насыщается кислородом), вследствие чего интенсивность флуоресценции уменьшается на длине волны 393 нм и увеличивается на 495 нм. Наиболее информативными для нас являются спектры флуоресценции не окисленной аскорбиновой кислоты и с предположительно максимальным окислением (2 месяца).

Из представленного графика (рис. 9) можно увидеть что: основные пики флуоресценции не окисленной аскорбиновой кислоты находятся на длинах волн $395 \pm 0,5$ нм, 467 ± 7 нм; полуширина соответственно 55 ± 3 нм, 8 ± 2 нм; коэффициент корреляции 0,99735.

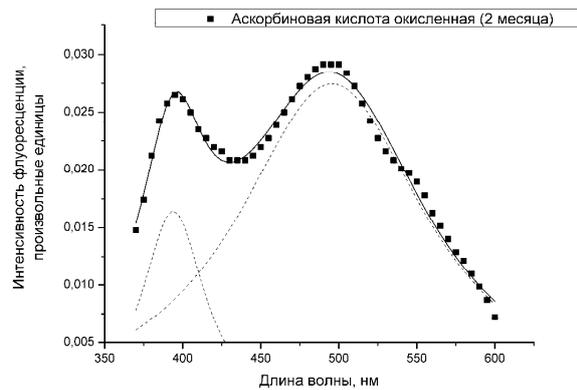


Рис. 10. Аппроксимированный график флуоресценции окисленной аскорбиновой кислоты с помощью контура Лоренца

Из представленного графика (рис. 10) можно увидеть что:

Основные пики флуоресценции окисленной аскорбиновой кислоты находятся на длинах волн 394 ± 1 нм, 496 ± 1 нм; полуширина соответственно 50 ± 3 нм, 150 ± 8 нм; коэффициент корреляции 0,98649.

Из выше представленных графиков видно, что длина волны пиков флуоресценции не окисленной аскорбиновой кислоты не соответствуют пикам флуоресценции, как для прозрачного хрусталика, так и для

катарактального. Из чего можно сделать вывод, что аскорбиновая кислота не вносит существенного вклада в спектр флуоресценции хрусталика.

В свою очередь пик флуоресценции НАДН приходится на длину волны 479 нм, что соответствует пику флуоресценции хрусталика без патологий на длине волны 477 нм и пику флуоресценции катарактального хрусталика с длиной волны 486 нм. Из литературных данных известно, что при связывании с белком пик флуоресценции НАДН сдвигается в коротковолновую область 430 нм, что в свою очередь соответствует пикам флуоресценции катарактального 431 нм, и прозрачного хрусталиков 412 нм. Сдвиг пиков флуоресценции катарактального и прозрачного хрусталиков обусловлен композицией флуоресценций различных веществ. В свою очередь интенсивность флуоресценции НАДН в катарактальном хрусталике уменьшается из-за разрушения клеток ткани. Так же можно наблюдать на графике флуоресценции катарактального хрусталика появление пика на длине волны 379 нм, что предположительно вызвано появлением большого количества коллагена.

3.5. Оценка безопасности разработанного метода диагностики катаракты

Уровень энергетической экспозиции разработанной методики для длины волны 337,1 нм равен $H = 336,7 \text{ Дж/м}^2$, что значительно ниже предельно допустимого уровня $8 \cdot 10^3 \text{ Дж/м}^2$ (СанПиН_5804-91, 1991). Облученность $E = 11,2 \text{ Вт/м}^2$ не превышает предельно допустимого уровня в 226 Вт/м^2 (СанПиН_5804-91, 1991), выполняется условие для первого класса. Таким образом, лазерное излучение не приносит вреда при облучении глаз и кожи.

3.6. Исследование аутофлуоресценции роговицы

Для выяснения применимости флуоресцентной диагностики для мониторинга состояния роговицы при ношении контактных линз было сформировано несколько групп добровольцев, разделенных по длительности ношения контактных линз. Все испытуемые были разделены на 3 группы: не носившие контактные линзы, носившие сроком до 5 лет и носившие от 5 до 10 лет. В соответствии с методикой эксперимента спектры флуоресценции роговицы снимались с двух точек на каждом глазу, далее для каждой группы спектры заносились в один массив данных, после чего производилась их нормировка и усреднение.

На рис. 25 отражены нормированные спектры флуоресценции роговицы для 0 лет (не носившие контактные линзы), до 5 лет (со сроком ношения до 5 лет), до 10 лет ношения контактных линз. Из спектров флуоресценции виден сдвиг максимума полосы люминесценции 420-430 нм в коротковолновую область в сравнении с пиком NADH (470 нм).

Для обнаружения изменений в спектрах флуоресценции роговицы эффективнее использовать разностные спектры построенные между выборками не носивших и носивших в течении 5 лет и между не носивших

линзы и носивших в течении 10 лет. Соответствующая диаграмма представлена на рис. 26.

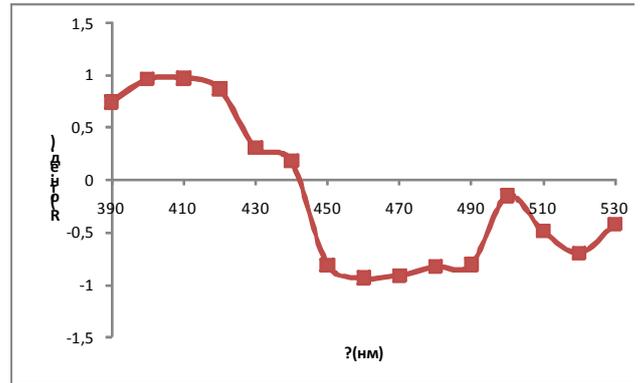
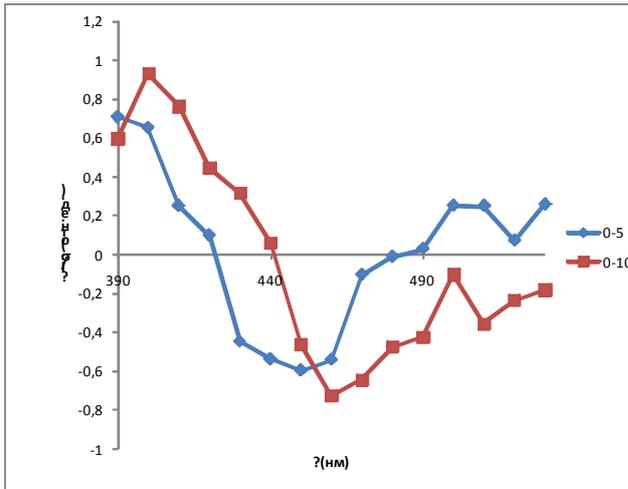


Рис. 11. Нормированные разностные спектры между выборками не носивших и носивших в течении 5 лет и между не носивших линзы и носивших в течении 10 лет.

Рис. 12 Спектр корреляций.

На рис. 11 виден сдвиг спектра флуоресценции (до 40 нм) в длинноволновую область при увеличении срока ношения контактных линз. Далее был построен спектр корреляций (рис. 12), который позволил определить наиболее информативные точки спектра флуоресценции роговицы. Из графика видно, что максимальную корреляцию можно наблюдать на длинах волн 410 и 460 нм и они имеет различные знаки. Поэтому для определения срока ношения контактных линз было решено использовать отношения интенсивностей флуоресценции на этих длинах волн. Для трех групп учувствовавших в эксперименте было вычислено данное соотношение рис. 13.

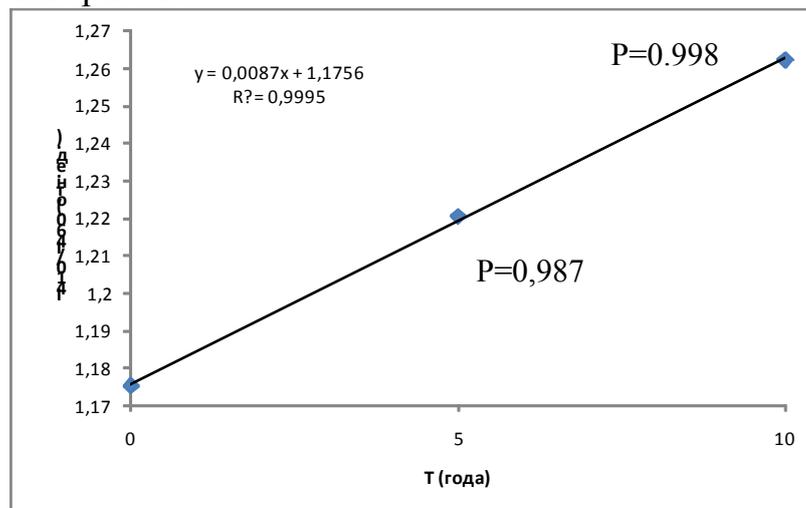


Рис. 13 Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 430 нм и 460 нм от срока ношения контактных линз. Достоверность различия с контрольной группой для различных сроков

ношения контактных линз по Т-тесту представлена на диаграмме возле соответствующих точек.

На рис. 13 наблюдается линейная зависимость отношения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 430 нм и 460 нм от срока ношения контактных линз, что может свидетельствовать о возможности решения обратной задачи т.е определения длительности ношения контактных линз зная интенсивность флуоресценции на указанных длинах волн.

Основные результаты работы.

1. Разработана методика регистрации флуоресценции хрусталика и роговицы с использованием экспериментального автоматизированного лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения.

2. Разработан окулярный зонд для доставки излучения лазера и сбора излучения флуоресценции исследуемой ткани.

3. Установлено, что при фронтальном возбуждении флуоресценции длиной волны 337,1 нм в спектрах флуоресценции катарактальных и здоровых хрусталиков максимальное различие в нормированных спектрах наблюдается на длине волны 440нм, а длины волн 400нм и 500нм соответствуют изобестическим точкам.

4. Определено, что значение индекса помутнения хрусталика имеет высокую корреляцию с номером стадии развития катаракты.

5. Выполнено, сравнение разработанной методики диагностики катаракты с распространенным методом диагностики с использованием щелевой лампы. Сравнительная характеристика двух этих исследований показала большую точность лазерно-флуоресцентной методики для диагностики катаракты по сравнению с исследованием на щелевой лампе.

6. Выявлено, что флуоресценция окисленной аскорбиновой кислоты не вносит существенный вклад в спектр флуоресценции катарактального хрусталика в диапазоне длин волн от 370нм до 600нм.

7. Показано, что при длительном ношении контактных линз происходят изменения в спектре УФА лазер-индуцированной аутофлуоресценции роговицы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vladimirova E.S., Salmin V.V., Salmina A.B., Oskirko S.A., Lazarenko V.I., Provorov A.S. Fluorescence diagnostics of human lens status in vivo // Journal Of Applied Spectroscopy. - 2012. - N 1: V 79. - p 135-139.

2. Salmin V.V., Provorov A.S., Lazarenko V.I., Salmina A.B., Oskirko S.A., Fokina D.S., Vladimirova E.S. Laser fluorescent method for differential diagnostics of cataract // International Conference on Lasers, Applications, and Technologies 2007: Laser Technologies for Medicine. / Proceedings of SPIE, 2007. - Vol. 6734. - P. 67341S.

3. Салмин В.В., Салмина А.Б., Лазаренко В.И., Проворов А.С., Оскирко С.А., Владимирова Е.С., Фокина Д.С. Лазерно-флуоресцентная диагностика стадий возрастной катаракты // Сибирский медицинский журнал -2007. - №6. - С. 9-11.

4. Оскирко С.А., Салмин В.В., Лазаренко В.И., Проворов А.С., Владимирова Е.С., Фокина Д.С., Салмина А.Б. О роли пиридиновых нуклеотидов в диагностике катаракты // Сибирское медицинское обозрение - 2007. - №3. - С. 33-36.

5. Оскирко С.А., Лазаренко В.И., Салмин В.В., Салмина А.Б., Проворов А.С., Владимирова Е.С., Фокина Д.С. Способ диагностики возрастной катаракты: пат. 2326582. - Российская Федерация, опубл. 20.06.08, Бюл. № 17, 2007.

6. Салмин В.В., Лазаренко В.И., Проворов А.С., Оскирко С.А., Салмина А.Б., Владимирова Е.С., Фокина Д.С. Устройство регистрации флуоресценции хрусталика (in vivo): пат. 2338454. - Российская Федерация, опубл. 20.11.08, Бюл. № 32, 2007.

7. Владимирова Е.С. Способ диагностики возрастной катаракты. Удостоверение на рационализаторское предложение, выданное БРИЗ Красноярской государственной медицинской академии (№2429 от 20.11.2007) (соавт.: В.В. Салмин, А.Б. Салмина, В.И. Лазаренко, С.А. Оскирко, Д.С. Фокина).

8. Владимирова Е.С. Разработка лазерно-флуоресцентного метода дифференциальной диагностики ядерной катаракты // Тезисы докладов научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых-физиков НКСФ-XXXVIII (2009)/ под ред. С.Ф. Тегая. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, Институт инженерной физики и радиоэлектроники, 2009.-122с (118с)

9. Владимирова Е.С. Исследование аутофлуоресценции биологических тканей хрусталика для разработки новых методов оптической биопсии // Тезисы докладов всероссийской научно технической конференции студентов и аспирантов «Молодежь и наука: начало XXI века» 2009.

10. Владимирова Е.С. Лазерно-флуоресцентная методика дифференциальной диагностики катаракты // Материалы XLV Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Физика / Новосибир. гос. Университет. Новосибирск, 2007.- 218 стр. с. 204-205.

11. Владимирова Е.С., Оскирко С.А., Фокина Д.С. Методика дифференциальной диагностики возрастной катаракты / Е.С. Владимирова, // материалы Тринадцатой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых (ВНКСФ-13, Ростов-на-Дону, Таганрог): В 1 т.Т.1 - 2007г. с. 461

12. Vladimirova E.S. Laser fluorescent method for differential diagnostics of cataract /E.S. Vladimirova, V.V.Salmin, A.B.Salmina et al. // Technical Digest ICONO/LAT 2007 Minsk, Belarus May 28–June 1, 2007 - L04-27

13. Vladimirova E.S. Laser fluorescent method for differential diagnostics of cataract /E.S. Vladimirova, V.V.Salmin, A.B.Salmina et al. // Technical Digest on CD-ROM ICONO/LAT 2007 Minsk, Belarus May 28–June 1, 2007 - L04-27

14. Владимирова Е.С. Методика диагностики ранней катаракты // НКСФ – 2007: тезисы докладов научной конференции студентов, аспирантов

и молодых ученых физиков НКСФ – XXXVI (2007) / под ред. П.П. Турчина.- Красноярск: Сибирский федеральный университет, Институт естественный и гуманитарный наук, 2007. -120 с. с. 38

15. Владимирова Е.С., Фокина Д.С. Разработка флуоресцентного метода для ранней диагностики катаракты // НКСФ – 2006: тезисы докладов научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых физиков НКСФ – XXXV (2006) / Краснояр. гос ун-т; под ред. доц. П.П. Турчина.- Красноярск: РИО КрасГУ, 2006. -76 с. с. 24.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ККОКБ – Красноярская краевая офтальмологическая клиническая больница

НАД (NAD) – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ (NADP) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАДН (NADH) – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФН (NADPH) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

УФА – ультрафиолет диапазона А