

# Исследование *ex vivo* и *in vivo* меланоцитарных новообразований кожи с помощью флуоресцентной спектроскопии в ближней ИК области

Ю.А. Христофорова<sup>1</sup>, И.А. Братченко<sup>1</sup>, Е.Г. Борисова<sup>2</sup>, Л.А. Братченко<sup>1</sup>,  
Т.И. Генова<sup>2</sup>, А.И. Гисбречт<sup>2</sup>, А.А. Морятов<sup>3</sup>, С.В. Козлов<sup>3</sup>, П.П. Троянова<sup>4</sup>,  
В.П. Захаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34А, Самара, Россия, 443086

<sup>2</sup>Болгарская академия наук, бульвар Царя-освободителя 72, София, Болгария, 1784

<sup>3</sup>Самарский государственный медицинский университет, Чапаевская 89, Самара, Россия, 443099

<sup>4</sup>Университетская больница «Царица Йоанна — ИСУЛ», Бяло море 8, София, Болгария, 1527

**Аннотация.** В данной работе представлено применение автофлуоресцентной спектроскопии в ближней ИК области для *in vivo* и *ex vivo* исследований меланоцитарных злокачественных и доброкачественных опухолей кожи. При *in vivo* исследовании проводилась регистрация спектров автофлуоресценции опухолей кожи с использованием возбуждающего излучения 785 нм. Был проведен анализ спектральной формы автофлуоресцентного отклика различных типов опухолей. При *ex vivo* исследовании были построены матрицы возбуждения/эмиссии опухолей кожи с использованием возбуждающего излучения в диапазоне 635-785 нм с шагом 10 нм и последующей регистрацией автофлуоресцентного сигнала в диапазоне 650-850 нм. Получено, что наибольший вклад в автофлуоресцентный сигнал в ближней ИК области дает меланин, при этом наблюдающиеся различия автофлуоресцентных сигналов различных типов опухолей могут быть связаны с различной концентрацией меланина в исследуемых тканях. Также на *ex vivo* образцах биотканей проведен анализ динамики спада флуоресцентного сигнала при непрерывном возбуждении 785 нм излучением в течении 3 минут за счет эффекта фотообесцвечивания. Показано, что скорость фотообесцвечивания может служить информативным параметром для диагностики опухолей кожи.

## 1. Введение

Злокачественная меланома занимает особое положение среди различных опухолей кожи из-за ее быстрого развития и высокой метастатической активности [1]. Уровень смертности от заболевания злокачественной меланомой достигает 85% от общей смертности, вызванной злокачественными опухолями кожи. Важную роль в этиологии меланомы играет повышенная пигментация кожи, поскольку первичное поражение развивается из клеток, продуцирующих меланин – меланоцитов. Поэтому на начальных стадиях развития заболевания очень сложно отличить меланому на фоне других меланоцитарных новообразований кожи. В особенности

очень важно диагностировать и дифференцировать меланому от доброкачественных меланоцитарных новообразований кожи, в том числе диспластического невуса, который обладает склонностью к малигнизации.

Методы, которые позволят провести качественную или количественную оценку содержания меланина представляю повышенный интерес для исследования меланоцитарных опухолей кожи. В последние десятилетия для обнаружения опухолей кожи используются методы оптической биопсии [2], в том числе спектроскопия диффузного отражения [3], спектроскопии комбинационного рассеяния [4] и / или автофлуоресценции (АФ) [5] за счет чувствительности методов к биохимическому составу кожи.

Интересно отметить, что обычно при регистрации комбинационного рассеяния флуоресцентная составляющая рассеянного излучения отсекается как малоинформативная. Однако, флуоресцентный отклик биоткани на лазерное облучение также может быть использован для исследования опухолей кожи [6], поскольку автофлуоресценция (АФ) в ближней инфракрасной области содержит информацию о количественных и качественных изменениях состава природных флуорофоров в области злокачественных новообразований по сравнению с окружающей нормальной кожей. Такой подход свободен от ограничений метода комбинационного рассеяния по времени накопления сигнала и допускает возможность работы в режиме реального времени без повреждения исследуемой ткани, позволяя быстро и экономично решать задачи медицинской практики. В некоторых исследованиях АФ составляющая использовалась в качестве дополняющего метода для классификации различных типов опухолей [5, 7]. Однако для того чтобы определить эффективность данного метода для диагностики опухолей кожи, необходимо проводить работы по комплексному изучению АФ особенностей различных типов опухолей. Таким образом, целью данного исследования является изучение применимости АФ в ближней ИК области для дифференциации меланоцитарных опухолей кожи. Исследование проводилось на *in vivo* и *ex vivo* меланоцитарных опухолях кожи с помощью анализа спектральной формы АФ отклика, матриц возбуждения/эмиссии и эффекта фотообесцвечивания в ближней ИК области.

## 2. Материалы и методы

В данной работе представлено исследование флуоресцентных свойств биотканей в ближней ИК области для *in vivo* и *ex vivo* спектральных измерений с различными источниками возбуждающего излучения.

### 2.1. *In vivo* исследование опухолей кожи

В рамках данного *in vivo* исследования была проведена регистрация спектров автофлуоресценции различных типов опухолей кожи у пациентов Самарского областного клинического онкологического диспансера. Были получены спектры злокачественных меланом (ММ) на 1 и 3 стадиях, пигментного базальноклеточного рака, беспигментного базальноклеточного рака, плоскоклеточного рака, диспластического невуса (ДН), себорейного кератоза (СК). Проводимые экспериментальные исследования были одобрены этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ, Самара).

*In vivo* исследование опухолей кожи осуществлялось с использованием спектроскопической установки для регистрации сигнала автофлуоресценции в ближней ИК области с помощью источника возбуждения 785 нм. Экспериментальная установка включает термостабилизированный полупроводниковый лазерный модуль LML-785.0RB-04 (центральная длина волны 785, 150 мВт, NECSEL, США), портативный спектрометр QE65Pro (Ocean Optics Inc., США), включающий матричный ПЗС-детектор с термоэлектрическим охлаждением до -15°C, оптический пробник inPhotonics.

Экспериментальная схема лабораторной установки представлена в работе [7]. Лазерное излучение подается на оптический пробник с помощью подводящего оптоволокну (диаметр 100 мкм, числовая апертура 0,22) и коллимирующей линзы. Полосовой фильтр отсекает шумовой вклад и засветки оптоволокну. Дихроичное зеркало пропускает лазерное излучение с длиной волны 785 нм на линзу, которая фокусирует возбуждающее излучение на участке опухоли. Эта

же линза собирает обратно рассеянное излучение, которое включает флуоресцентный отклик от исследуемой опухоли. Дихроичное зеркало направляет сигнал в проходной канал, который включает в себя длинноволновой фильтр для фильтрации возбуждающего излучения 785 нм, и далее на соответствующие линзы и собирающее оптоволокно (диаметр 200 мкм, числовая апертура 0,22), подключенные к спектрометру.

С использованием данного спектроскопического оборудования в режиме реального времени были зарегистрированы спектры автофлуоресценции нормальной кожи и опухолей в спектральном диапазоне 800-1000 нм.

## 2.2. *Ex vivo* исследование опухолей кожи

*Ex vivo* исследование флуоресцентных свойств пигментных опухолей кожи было проведено на хирургически иссеченных участках кожи, включающих область патологии: меланомы, базальноклеточного рака, доброкачественных патологий, диспластических невусов. Хирургически иссеченные участки кожи были разделены на 2 части: для гистологического и спектрального анализа. Для исследования флуоресцентных свойств образцы были доставлены из больницы «Царица Йоанна-ИСУЛ» (г. София, Болгария) в лабораторию. Проводимые экспериментальные условия были одобрены комитетом по этике университетской больницы «Царицы Йоанны-ИСУЛ».

В рамках *ex vivo* изучения флуоресцентных свойств патологий кожи в ближней ИК области были использованы две спектроскопические системы. Первая система со спектральным флуориметром FluoroLog 3 (HORIBA Jobin Yvon, Франция) использовалась для построения матрицы возбуждения/эмиссии на основании возбуждения биотканей излучением в области 635-785 нм и последующей регистрацией флуоресценции в диапазоне 650-850 нм с шагом 10 нм. Источником возбуждающего света спектрофлуориметра является ксеноновая лампа с выходной оптической мощностью 300 Вт, спектральный рабочий диапазон 200-800 нм. Детектором сигнала является фотоэлектронный умножитель с диапазоном характеристик 220-850 нм.

Другая система была использована для регистрации спектров флуоресценции в ближней ИК области *ex vivo* патологий кожи с помощью источника возбуждения 785 нм, спектрометра QE65000 (Ocean Optics Inc., США), и оптоволоконного пробника 6+1 для доставки возбуждающего и собранного излучения. Исследование эффекта фотообесцвечивания тканей проводилось на основании анализа спада уровня флуоресценции *ex vivo* образцов биотканей на длине волны 820 нм при возбуждении источником 785 нм. Измерение динамического затухания флуоресценции осуществлялось в течение 5 минут в моменты времени 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 сек относительно момента возбуждения сигнала. Все *ex vivo* измерения проводились при одинаковых геометрических конфигурациях.

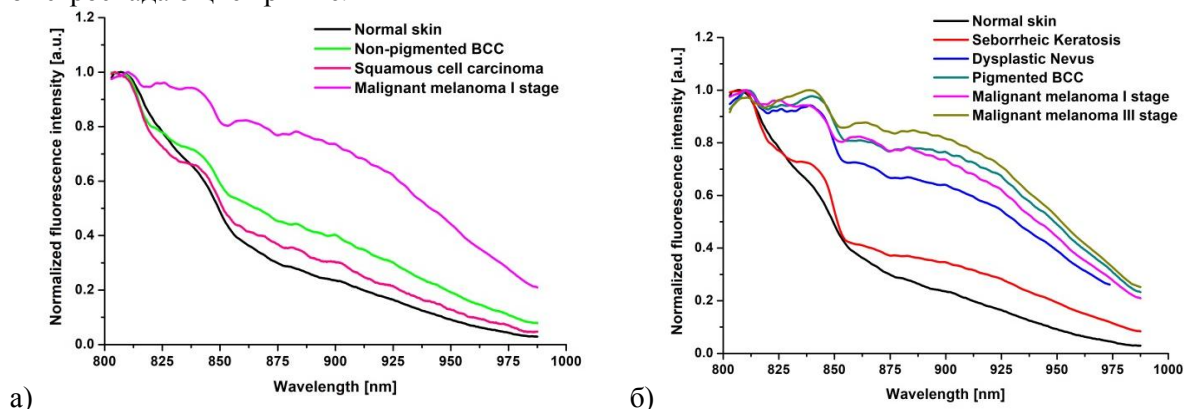
## 3. Результаты исследования

### 3.1. *In vivo* флуоресцентная спектроскопия опухолей кожи

Явление автофлуоресценции широко изучено в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, поскольку основные биомолекулы, поглощающие и переизлучающие возбуждающую энергию, имеют пики возбуждения и эмиссии в данных спектральных диапазонах. Автофлуоресценция в ближней ИК области характеризуется определенными преимуществами, связанными с глубиной проникновения и минимальным рассеянием ближнего ИК излучения в биоткани. Результаты многих проведенных исследований [8] подтверждают, что наибольший вклад в результирующий АФ спектр в ближней ИК области вносит меланин, однако помимо меланина есть другой возможный состав флуорофоров с излучением в ближней ИК области, который до конца не ясен на сегодняшний момент.

Сложность применения АФ особенностей как возможных идентификаторов типов опухолей возникает при анализе АФ спектров меланоцитарных новообразований, за счет повышенного содержания меланина. На рисунке 1 представлены спектры злокачественных, доброкачественных, и предраковых опухолей. Для качественного анализа спектральных

различий АФ откликов опухолей в ближней ИК области имеет место рассматривать нормированные на максимальное значение интенсивности спектры АФ [6]. Согласно рисунку, принципиальные различия формы сигнала АФ различных опухолей кожи наблюдаются в области 800-900 нм. Как видно из рисунка 1а, спектры злокачественной меланомы на I стадии развития существенно отличаются от других типов злокачественных опухолей (базальноклеточного рака и плоскоклеточного рака). Спектры АФ меланоцитарных образований характеризуются выпуклой формой и медленной скоростью спада. Спектры немеланоцитарных опухолей, в свою очередь, можно охарактеризовать как вогнутые быстроспадающие кривые.

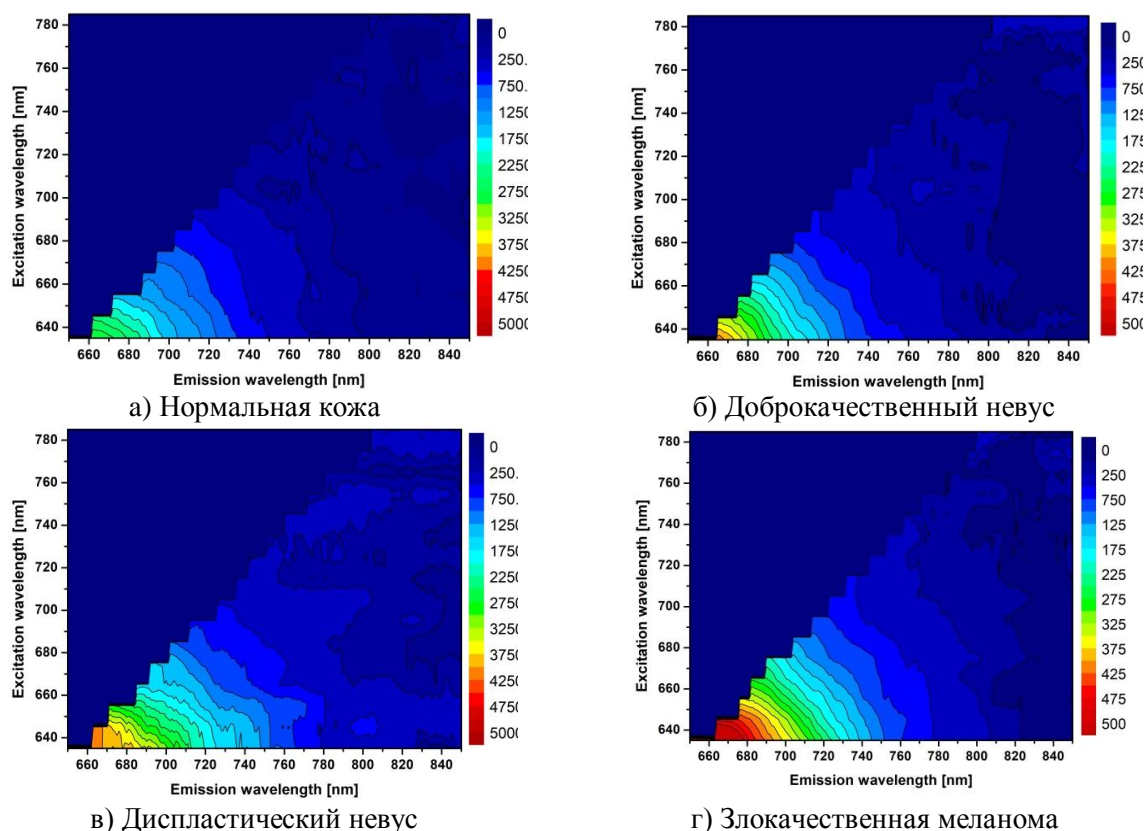


**Рисунок 1.** *In vivo* АФ спектры опухолей кожи при возбуждении 785 нм излучением: а) злокачественные патологии; б) меланоцитарные патологии.

Что касается АФ спектров меланоцитарных патологий кожи (рисунок 1б), злокачественные, и доброкачественные меланоцитарные образования вызывают высокий уровень АФ, что несущественно отличает спектры меланомы среди них. Спектры меланомы и меланоцитарных образований характеризуются широкими локальными максимумами около 810, 840 и 860 нм и минимумами около 820, 850 нм. Спектры АФ меланомы на I и III стадиях роста, а также пигментного базальноклеточного рака имеют более выраженные локальные максимумы при 840 и 860 нм, что может быть связано с относительно высокой концентрацией меланина, относительного показателя злокачественности поражения. Однако пигментированный базальноклеточный рак не является показателем большей злокачественности по сравнению с непигментированным базальноклеточным раком. Спектр АФ диспластического невуса имеет форму АФ, сходную с меланомой, но имеет менее выраженные максимумы эмиссии АФ, что может быть объяснено более низким содержанием меланина, поскольку само по себе данное новообразование относится к доброкачественному, но имеет тенденцию к малигнизации. Спектр АФ пигментированного себорейного кератоза сильнее всего отличается от спектров АФ меланомы по сравнению с другими меланоцитарными образованиями. Себорейный кератоз представляет собой доброкачественное поражение с высокой концентрацией кератиноцитов, которые содержат меланиновый пигмент. Как правило, нормальная пигментация кожи возникает после транспорта меланина из меланоцитов в кератиноциты, в то время как меланома развивается из клеток меланоцитов. Потенциально, различия спектров АФ могут быть вызваны присутствием меланина в разных типах клеток (различное микроокружение для флуорофора) в случае меланомы и при доброкачественном кератозе.

### 3.2. *Ex vivo* флуоресцентная спектроскопия опухолей кожи

Матрицы возбуждения/эмиссии нормальной кожи и меланоцитарных патологий кожи (доброкачественных патологий, диспластического невуса, злокачественной меланомы) были построены при возбуждении образцов биотканей излучением из диапазона от 635 до 785 нм с шагом 10 нм, и регистрацией флуоресценции в области от 650 до 850 нм (рисунок 2). Ярковыраженных особенностей АФ формы различных типов патологий не наблюдалось, можно выделить общее увеличение интенсивностей для более пигментированных опухолей кожи.



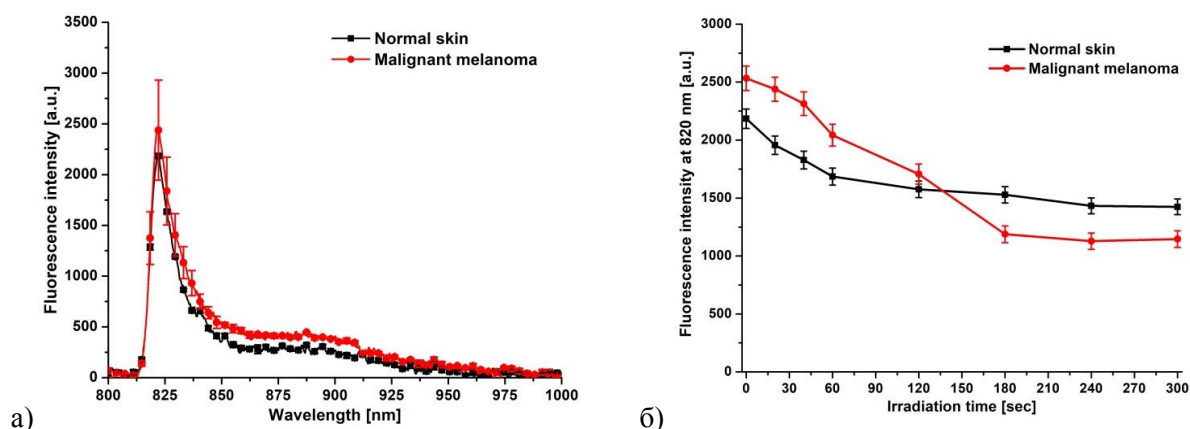
**Рисунок. 2** Матрицы возбуждения/эмиссии *ex vivo* опухолей кожи с возбуждающим излучением в диапазоне 635-785 нм с шагом 10 нм - (а) здоровая кожа, (б) доброкачественный невус, (в) диспластический невус и (г) злокачественная меланома.

Для всех меланокитарных опухолей кожи характерна схожая форма АФ отклика, при этом интенсивность главного максимума флуоресценции, наблюдающегося в области 810-820 нм, увеличивается от нормальной кожи через меланокитарные невусы и до злокачественной меланомы. Данная тенденция подтверждает влияние меланина на формирование флуоресцентного отклика кожи и патологий кожи в ближней ИК области. Отмечается, что увеличение сигнала флуоресценции коррелирует со степенью злокачественности меланокитарных опухолей кожи.

### 3.3. Эффект фотообесцвечивания кожи и опухолей кожи

Одним из возможных индикаторов, использование которого может повысить диагностическую специфичность, является время фотообесцвечивания [9] эндогенных флуорофоров, которые вносят вклад в спектральный отклик автофлуоресценции в ближней ИК области.

Для оценки фотообесцвечивания биотканей были зарегистрированы спектры флуоресценции для нормальной кожи и меланомы (примеры двух граничных состояний кожи) при непрерывном 785 нм излучением участка биоткани в течение 5 минут. На основании зарегистрированных спектров была построена динамика спада максимального уровня флуоресценции (820 нм) с течением времени. В первые 180 секунд наблюдается резкий спад флуоресценции примерно в 1,5 раза для нормальной кожи и в 2,2 раза для злокачественной меланомы. Через 300 секунд спад сигнала прекращается как для нормальной кожи, так и для меланомы, и уровень сигнала выравнивается. При этом уровень максимальной интенсивности флуоресценции становится выше для нормальной кожи, по сравнению с меланомой, что противоположно исходной ситуации, когда уровень АФ меланомы из-за повышенной концентрации меланина превышал данное значение для спектра нормальной кожи.



**Рисунок 3.** (а) АФ спектры нормальной кожи и злокачественной меланомы с использованием возбуждающего излучения 785 нм; (б) Динамика спада уровня флуоресцентного максимума (фотообесцвечивание) на длине волны 820 нм в течение 5 минут для участков нормальной кожи и злокачественной меланомы.

Стоит отметить, что существенные различия фотообесцвечивания для АФ сигналов нормальной кожи и базальноклеточного рака не наблюдались.

Как было сказано выше, выделенные спектральные различия могут быть связаны с различной концентрацией клеток меланоцитов в исследуемых поражениях кожи. Однако сопоставление спектральных характеристик пигментированных поражений со степенью злокачественности является приблизительным описанием, поскольку мы не располагаем информацией о точной концентрации меланина и других флуорофоров в злокачественных и доброкачественных опухолях кожи. Более того, пороговые значения концентраций флуорофоров, определяющих стадию злокачественности, неизвестны. *In vivo* исследование опухолей кожи позволяет регистрировать общий спектр АФ от ткани, который является суперпозицией откликов большого количества компонентов тканей. Таким образом, одним из возможных путей развития исследования с правильной интерпретацией спектров является изучение оптических свойств, в частности флуоресцентных, чистых биохимических веществ. Сравнение АФ спектров чистых биохимических веществ со спектрами *ex vivo* и *in vivo* биотканей может дать представление о важных относительных биохимических изменениях при развитии опухоли.

#### 4. Выводы

Результаты данной работы показывают, что флуоресцентный сигнал в ближней ИК области несет полезную информацию для изучения спектральных особенностей пигментных опухолей кожи. Для *in vivo* и *ex vivo* исследований пигментных опухолей кожи установлена корреляция между уровнем флуоресцентного сигнала и степенью злокачественности пигментных опухолей. При *ex vivo* измерении опухолей кожи установлено, что скорость фотообесцвечивания нормальной кожи и злокачественной меланомы отличается, что может быть использовано для повышения специфичности при диагностике меланомы кожи. Устойчивые характеристики флуоресценции, полученные для нормальной кожи и различных пигментных опухолей кожи с использованием возбуждающего излучения 785 нм, могут быть преобразованы в диагностический алгоритм для развития в клинических условиях.

#### 5. Благодарности

Работа выполнена при поддержке совместной программы РФФИ и Болгарского научного фонда № 19-52-18001 Болг\_а и № КР06-Russia/19/28.09.2019 «Мультивариативная Рамановская и флуоресцентная диагностика кожных новообразований».

## 6. Литература

- [1] Ермаков, А.В. Ранняя диагностика и профилактика злокачественной меланомы / А.В. Ермаков // Онкохирургия. – 2013. – Т. 5, № 3. – С. 52-58.
- [2] Borisova, E. Optical Biopsy of Human Skin – A Tool for Cutaneous Tumours' Diagnosis / E. Borisova, P. Pavlova, E. Pavlova, P. Troyanova, L. Avramov // Int. J. Bioautomation. – 2012. – Vol. 16(1). – P. 53-72.
- [3] Borisova, E. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy of pigment disorders in human skin / E. Borisova, E. Nikolova, P. Troyanova, L. Avramov // Journal of optoelectronics and advanced materials. – 2008. – Vol. 10(3). – P. 712-722.
- [4] Lui, H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis / H. Lui, J. Zhao, D. McLean, H. Zeng // Cancer Res. – 2012. – Vol. 72(10). – P. 2491-2500.
- [5] Cicchi, R. Combined fluorescence-Raman spectroscopic setup for the diagnosis of melanocytic lesions / R. Cicchi, A. Cosci, S. Rossari, D. Kapsokalyvas, E. Baria, V. Maio, D. Massi, V. De Giorgi, N. Pimpinelli, F. S. Pavone // Journal of Biophotonics. – 2013. – Vol. 7(1-2). – P. 86-95.
- [6] Khristoforova, Y. Method of autofluorescence diagnostics of skin neoplasms in the near infrared region / Y. Khristoforova, I. Bratchenko, D. Artemyev, O. Myakinin, S. Kozlov, A. Moryatov, V. Zakharov // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2015. – Vol. 1. – P. 186-192.
- [7] Khristoforova, Y. Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by Raman and autofluorescence analysis / Y. Khristoforova, I. Bratchenko, O. Myakinin, D. Artemyev, A. Moryatov, A. Orlov, S. Kozlov, V. Zakharov // J Biophotonics. – 2019. – Vol. 12(4). – P. e201800400.
- [8] Wang, S. In vivo near-infrared autofluorescence imaging of pigmented skin lesions: methods, technical improvements and preliminary clinical results / S. Wang, J. Zhao, H. Lui, Q. He, H. Zeng // Skin Res. Tech. – 2013. – Vol. 19. – P. 20-26.
- [9] Ferulova, I. Photobleaching effects on in vivo skin autofluorescence lifetime / I. Ferulova, A. Lihachev, J. Spigulis // J. Biomed. Opt. – 2015. – Vol. 20(5). – P. 051031.

## The study of *ex vivo* and *in vivo* melanocytic skin neoplasms using near-infrared fluorescence spectroscopy

Y.A. Khristoforova<sup>1</sup>, I.A. Bratchenko<sup>1</sup>, E.G. Borisova<sup>2</sup>, L.A. Bratchenko<sup>1</sup>, T.I. Genova<sup>2</sup>, A.I. Gisbrecht<sup>2</sup>, A.A. Moryatov<sup>3</sup>, S.V. Kozlov<sup>3</sup>, P.P. Troyanova<sup>4</sup>, V.P. Zakharov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara National Research University, Moskovskoe shosse34A, Samara, Russia, 443086

<sup>2</sup>Bulgarian Academy of Sciences, Tsarigradsko Chaussee Blvd. 72, Sofia, Bulgaria, 1784

<sup>3</sup>Samara State Medical University, Chapaevskaya str. 89, Samara, Russia, 443099

<sup>4</sup>University Hospital “Tsaritsa Yoanna – ISUL”, Byalo more Str. 8, Sofia, Bulgaria, 1527

**Abstract.** In this paper, we present the applicability of near infrared autofluorescence for *in vivo* and *ex vivo* melanocytic skin tumors. The *in vivo* spectra of skin tumors were registered using excitation at 785 nm. The analysis of the skin autofluorescence spectral shape was performed to differentiate malignant and benign tumors. The excitation-emission matrices was built for *ex vivo* skin tumors using excitation in the region of 635-785 nm, with step 10 nm and fluorescence emission in the region of 650-850 nm. It was achieved the melanin is the dominant near infrared fluorophore in human skin and the spectral differences of the different skin tumors can be associated with different concentration of melanin in the studied tissues. The fluorescence intensity dynamic fading at 820 nm wavelength of the autofluorescence was analyzed using excitation at 785 nm for *ex vivo* skin tumors during 3 minutes. Results demonstrated that the photo-bleaching speed can be informative indicator to diagnose of the skin tumors.