

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕЛАНИНА В КОЖЕ НА ФОРМИРОВАНИЕ СИГНАЛА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2016 г. В. В. Дрёмин, аспирант; А. В. Дунаев, канд. техн. наук

Государственный университет – учебно-научно-производственный комплекс, Орел

E-mail: dremin_viktor@mail.ru

Экспериментально изучено влияние содержания меланина на интенсивность эндогенной флуоресценции биоткани, выполнено моделирование сигналов флуоресценции методом Монте-Карло.

Моделирование основано на четырехслойной оптической модели кожи, базирующейся на известных оптических параметрах кожи с различным содержанием меланина. Спектры флуоресценции, полученные методом Монте-Карло, согласуются с результатами экспериментальных исследований.

Ключевые слова: оптическая неинвазивная диагностика, флуоресцентная спектроскопия, меланин, метод Монте-Карло, медико-технические требования.

Коды OCIS: 170.6280, 170.6510

Поступила в редакцию 14.04.2015

Введение

Значительный прогресс и достижения в фотонике и биофотонике в последние годы привели к бурному развитию оптической неинвазивной диагностики в биомедицине [1]. К одному из таких методов относится флуоресцентная спектроскопия (ФС).

Биологические ткани содержат различные эндогенные флуорофоры, такие как NADH, FAD, ароматические аминокислоты, структурные белки и др. Оптические свойства этих флуорофоров чувствительны к метаболическому статусу биоткани, что делает ФС ценным инструментом исследования состояния биологических тканей [2–4].

До выхода из ткани и достижения детектора с зондирующим излучением в коже происходит ряд процессов: преломление на границе сред, поглощение меланином и фракциями гемоглобина, а также рассеяние Ми на крупных волокнах коллагена и рэлеевское на более мелких. Таким образом, флуоресценция биоткани сильно зависит от ее оптических свойств, поэтому теоретическая оценка их влияния на формирование сигнала является весьма важной задачей. Актуальность моделирования сигналов в ФС обусловлена в том числе и необходимостью

обоснования медико-технических требований (МТТ) к приборам ФС [5]. Так, ранее было исследовано влияние кровенаполнения ткани на регистрируемые сигналы в оптической тканевой оксиметрии и ФС [6, 7].

В данной работе было исследовано влияние на формирование сигнала флуоресценции одного из хромофоров биоткани – меланина, который является одним из наиболее распространенных природных пигментов и в значительной степени ответственен за оптические свойства кожи [8].

В ряде публикаций рассматривается подобный вопрос. Так, в работе [9] описана оптическая модель диффузного отражения кожи для анализа пигментированных и депигментированных участков кожи у пациентов с витилиго. В публикации [10] рассматривается влияние меланина на спектры пропускания и отражения. В работах [11, 12] проводились исследования отражения и флуоресценции кожи в трех состояниях (нормальная кожа, синий витилиго и витилиго). Исследований же спектров эндогенной флуоресценции на представителях с различными этническими типами кожи найти не удалось. В связи с этим данная работа будет полезна для последующего развития метода ФС, в том числе для ее приборной

реализации на базе обоснованных МТТ с учетом различного содержания меланина в коже пациентов.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования

Для экспериментальных исследований использовали многофункциональный лазерный неинвазивный диагностический комплекс (МЛНДК) “ЛАКК-М” (ООО НПП “ЛАЗМА”, Россия) [13]. Он предназначен для исследования состояния биологической ткани путем одновременного использования нескольких оптических неинвазивных технологий: лазерной доплеровской флоуметрии, оптической тканевой оксиметрии, пульсоксиметрии и ФС. В представленной работе анализировались только данные канала ФС при расстоянии между зондирующим и приемным волокнами 1 мм.

Тестовые экспериментальные исследования проводились с участием восьми условно здоровых добровольцев (в том числе один из авторов статьи). Было исследовано влияние содержания меланина на спектры флуоресценции на различных этнических типах кожи, включая европейский (3 добровольца), индийский (1), арабский (1) и африканский (3). При этом процентное содержание меланина в базальном слое эпидермиса может изменяться от 1 до 43% [14].

Измерения проводились в двух точках биоткани: на коже подушечки среднего пальца правой руки – слабо пигментированная область у всех добровольцев, и на коже предплечья (на срединной линии в 3–4 см выше шиловидных отростков локтевой и лучевой костей) в зоне с выраженными различиями в содержании меланина относительного каждого типа кожи.

Анализируемыми регистрируемыми параметрами были интенсивности флуоресценции NADH I_{NADH} (пик в диапазоне 460–470 нм) и FAD I_{FAD} (около 550 нм) при возбуждении ультрафиолетовым (УФ) излучением (длина волны $\lambda = 365$ нм) и показатель тканевого кислородного метаболизма – редокс-отношение RR [15]

$$RR = I_{\text{NADH}}/I_{\text{FAD}}. \quad (1)$$

Далее параметры усреднялись и вычислялись среднее арифметическое M_n и среднеквадратическое отклонение σ .

Моделирование

Для описания и прогнозирования влияния меланина на сигнал флуоресценции была предложена модель распространения света в биоткани.

В целом интенсивность флуоресценции кожи определяется флуоресценцией NADH эпидермиса и флуоресценцией коллагена дермы [8]. NADH обладает характерными спектрами поглощения, включающими две полосы в УФ области ($\lambda = 260$ и $\lambda = 340$ нм), а также типичным спектром собственной флуоресценции с максимумом в интервале от 460 до 480 нм [2, 8, 16]. В работе [17] возбуждение и регистрация наивысших значений интенсивности излучения коллагена осуществлялись соответственно на 280 и 310 нм, 265 и 385, 330 и 390 нм, 450 и 530 нм. Спектры поглощения и флуоресценции NADH и коллагена на длине волны возбуждения 365 нм представлены на рис. 1.

Одновременное присутствие в тканях нескольких флуорофоров приведет к сложному регистрируемому суммарному спектру флуоресценции этих веществ с разным количеством

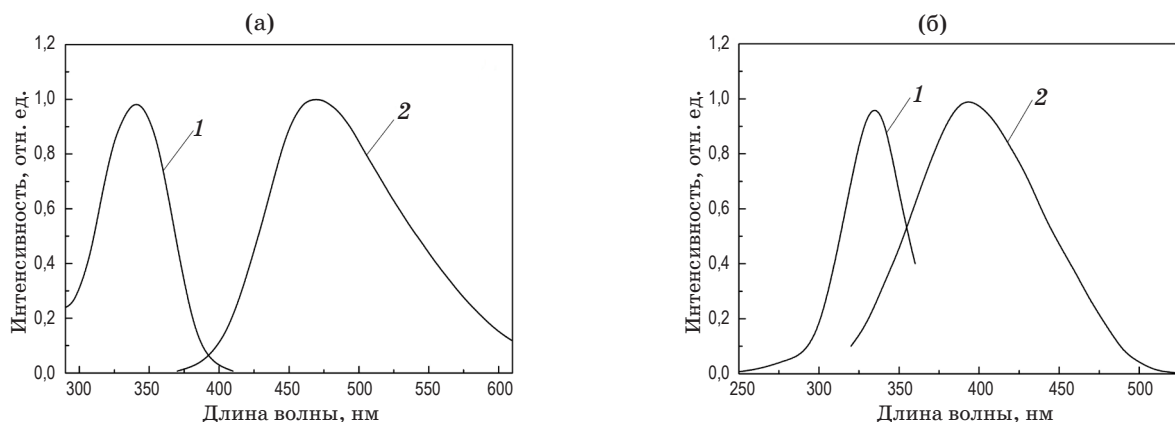


Рис. 1. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) NADH (а) и коллагена (б).

максимумов и минимумов [18]. В модели предлагается учитывать сигналы флуоресценции от основных флуорофоров биоткани – NADH и коллагена, при этом, как видно из рис. 1, часть спектра коллагена перекрывается спектром NADH. В результате в анализируемом диапазоне 400–550 нм будет регистрироваться суммарный сигнал. В зависимости от интенсивности флуоресценции каждого из учитываемых флуорофоров вид суммарного спектра может изменяться.

Кровенаполнение дермы при моделировании считалось на постоянном среднем уровне в 0,2% [19].

Как известно, кожа имеет очень сложную структуру, и поэтому для теоретического моделирования была построена упрощенная четырехслойная оптическая модель кожи. Падающее излучение, проходя через эпидермис, поглощается в большей степени меланином и возбуждает флуоресценцию NADH. Прошедшая часть попадает в дерму, где поглощается преимущественно фракциями гемоглобина и возбуждает флуоресценцию коллагена. Оставшееся зондирующее излучение и вторичное излучение флуоресценции диффузно отражаются от волокон коллагена и вновь проходят через слои кожи, поглощаясь гемоглобином и меланином.

Основные параметры, определяющие оптические свойства биотканей и связи между ними [14], представлены на рис. 2.

Расчет указанных транспортных параметров проводился на основе данных, приведенных в работе [14]. Параметры модели представлены в табл. 1.

Численное моделирование осуществлялось методом Монте-Карло. В настоящее время это один из самых часто используемых методов описания распространения света в биологических тканях [20, 21]. Его главной идеей являет-

ся учет поглощения и рассеяния на всем оптическом пути фотона через непрозрачную среду. В качестве инструмента моделирования были использованы новые возможности программной среды TracePro (*Lambda Research Corporation*), предназначенной для анализа распространения света в оптико-механических системах.

На основе заданных параметров поглощение в биоткани учитывается законом Бугера–Ламберта–Бера

$$\Phi = \Phi_0 \exp(-\mu_a t), \quad (2)$$

где Φ и Φ_0 – прошедший и падающий потоки, μ_a – коэффициент поглощения, t – толщина образца.

Для учета преломления или отражения на границе раздела двух сред используется закон Френеля.

В качестве фазовой функции рассеяния выбрана наиболее часто применяемая функция Хени–Гринштейна

$$SDF = p(\theta) = \frac{1 - g^2}{4\pi(1 + g^2 - 2g \cos \theta)}, \quad (3)$$

где g – фактор анизотропии. Параметр g может принимать значения от -1 до 1 . При $g > 0$ лучи в большей степени рассеиваются в прямом направлении, при $g < 0$ – в обратном. Если $g = 0$, рассеяние изотропно, т.е. одинаково во всех направлениях.

Поглощение	μ_a	[мм ⁻¹]
Рассеяние	μ_s	[мм ⁻¹]
Функция рассеяния	$p(\theta)$	[ср ⁻¹]
Фактор анизотропии	g	[–]
Индекс преломления	n	[–]
Приведенное рассеяние	$\mu'_s = \mu_s(1 - g)$	[мм ⁻¹]

Рис. 2. Основные оптические параметры биологических тканей.

Таблица 1. Четырехслойная модель кожи

Слой	Толщина, мкм	Показатель преломления	μ_a , см ⁻¹	μ_s , см ⁻¹	g
Роговой слой	10	1,55	300	2200	0,9
Эпидермис	100	1,4	24,2	1000	0,72
Папиллярная дерма	200	1,37	4,7	460	0,73
Ретикулярная дерма	1000	1,4	4,7	460	0,74

Примечание. Параметры распространения излучения (μ_a , μ_s , g) приведены только при длине волны 365 нм. Оптические параметры при других длинах волн отсутствуют в таблице, но были получены аналогичным образом с использованием опубликованных данных.

Когда луч проходит рассеивающую среду, он распространяется на случайное расстояние x , регулируемое распределением вероятностей

$$P(x)dx = \exp(-\mu_s x)dx, \quad (4)$$

где μ_s – коэффициент рассеяния.

Когда луч взаимодействует с материалом, который является тонким по сравнению с длиной свободного пробега, он проходит через материал без рассеяния. И наоборот, если толщина материала велика, луч с большой вероятностью рассеется.

Флуоресценция моделируется в TracePro с учетом флуоресцентных свойств в сочетании со свойствами материала объекта и использованием приведенных выше законов. Задаваемые параметры включают относительное поглощение $ab(\lambda)$ и относительное возбуждение $ex(\lambda)$, нормированные на молярный коэффициент экстинкции K_{peak} , и относительную эмиссию $em(\lambda)$. Концентрация флуоресцирующего вещества устанавливается путем ввода молярной концентрации C_{molar} .

Коэффициент поглощения флуорофоров определяется в среде как

$$\mu_a(\lambda) = ab(\lambda)K_{\text{peak}}C_{\text{molar}}, \quad (5)$$

длина пути до поглощения –

$$d(\lambda) = -\lg(x) / \mu_a(\lambda), \quad (6)$$

где x – случайное число от 0 до 1.

Отношение количества фотонов, участвующих в процессе, к количеству фотонов, предварительно поглощенных системой, определяется заданием в среде квантовой эффективности.

Результаты и обсуждение

Экспериментальные исследования

В области предплечья с увеличением пигментации кожи уменьшается интенсивность флуоресценции, статистические различия были подтверждены по U-критерию Манна–Уитни (рис. 3 и табл. 2).

У добровольца Г сигнал флуоресценции фактически зафиксирован не был.

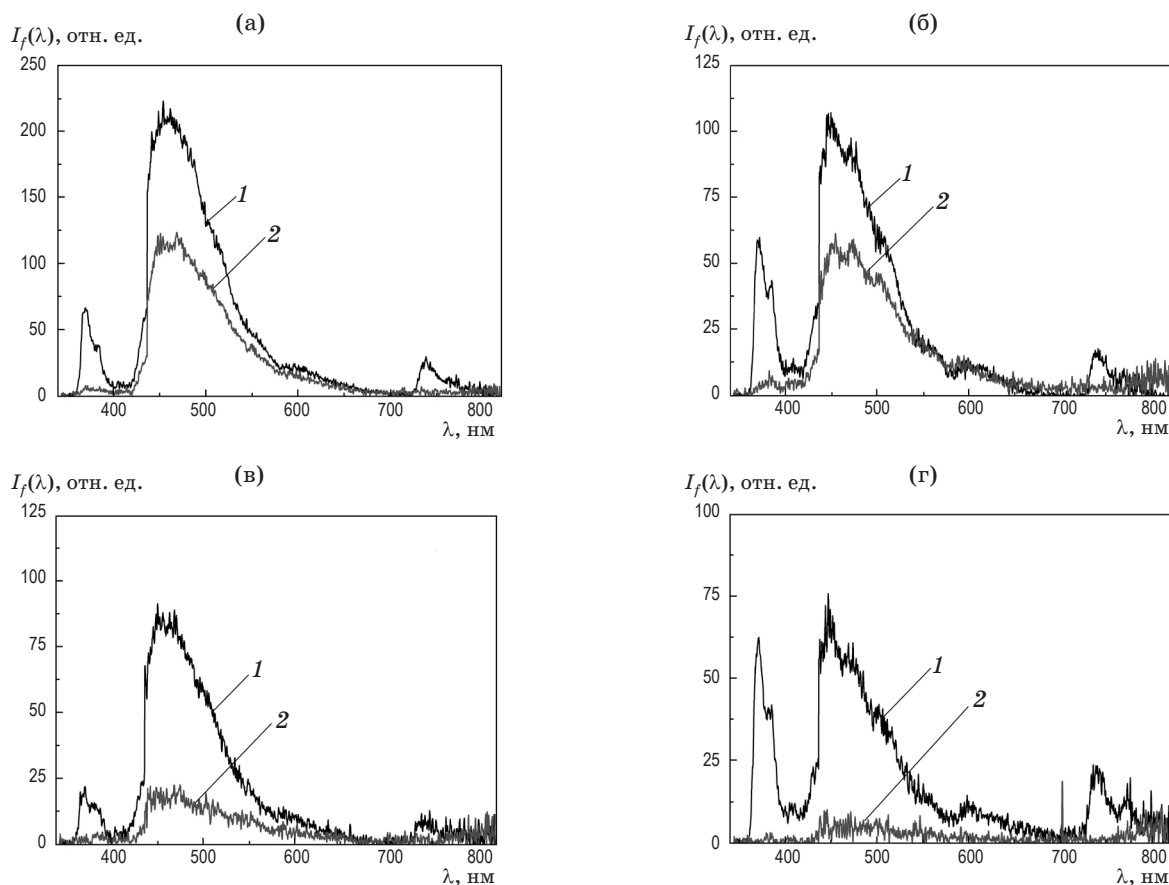


Рис. 3. Примеры спектров флуоресценции кожи различных этнических типов на поверхности пальца (1) и предплечья (2). Пояснения в тексте.

Таблица 2. Результаты экспериментальных исследований

λ , нм	Этнический тип кожи	$M_k \pm \sigma$, отн. ед.					
		Поверхность пальца			Предплечье		
		NADH	FAD	RR	NADH	FAD	RR
365	европейский (А), $n = 50$	220,2 \pm 48,9	49,2 \pm 11,8	4,4 \pm 0,5	120,1 \pm 11,8	21,3 \pm 3,3	5,6 \pm 0,6
	индийский (Б), $n = 27$	110,1 \pm 22,3	25,2 \pm 6,6	4,9 \pm 0,7	60,9 \pm 14,2	15,4 \pm 5,1	4,0 \pm 0,5
	арабский (В), $n = 13$	84,3 \pm 37,7	25,5 \pm 12,6	3,3 \pm 0,3	25,9 \pm 3,9	8,9 \pm 2,5	2,9 \pm 0,4
	африканский (Г), $n = 3$	75,4 \pm 30,5	22,3 \pm 17,5	3,4 \pm 0,4	$\rightarrow 0$	$\rightarrow 0$	–

Моделирование

Данные, полученные в отдельном дополнительном исследовании в тех же областях кожи темнокожей женщины 25 лет, показывают, что при возбуждении светом с $\lambda = 365$ и 532 нм флуоресценция также отсутствует. При возбуждении излучением с $\lambda = 635$ нм флуоресценция была более заметной, чем в первых двух случаях. Это говорит о целесообразности применения метода для определения флуорофоров, возбуждаемых и флуоресцирующих в области спектра, начиная с ближнего инфракрасного диапазона, а также о возможности регистрации флуоресценции непосредственно самого меланина. В подтверждение приведенного выше предположения последние результаты многофотонной спектроскопии (780–820 нм) выявили существенные различия в флуоресценции эу- и феомеланина в нормальных тканях и пораженных меланомой [22].

Разброс результатов измерений (в том числе в работах [7, 23]) говорит о необходимости создания адекватной математической модели, описывающей свойства биоткани и непосредственно флуоресценции.

Полученное с помощью TracePro изображение распространения флуоресцентных лучей внутри ткани с отфильтрованной длиной волны возбуждения (365 нм) приведено на рис. 4.

По результатам моделирования было получено семейство модельных спектров при изменении содержания меланина в диапазоне 1–43% (рис. 5а). Как видно, после 15%-го содержания сигнал флуоресценции меланина практически отсутствует.

Стоит отметить некоторое отличие представленных модельных спектров от полученных экспериментальным путем суммарных спектров различных компонентов (рис. 5б). Более интенсивный экспериментальный сигнал в области длин волн 500–570 нм может быть обусловлен тем, что в суммарный спектр флуоресценции кожи в реальных условиях могут вносить вклад другие флуорофоры (FAD, пиридоксин и др.), не учитываемые при моделировании. Также на вид реального экспериментального спектра в диапазоне 400–480 нм влияют и другие хромофоры (билирубин, порфирины,

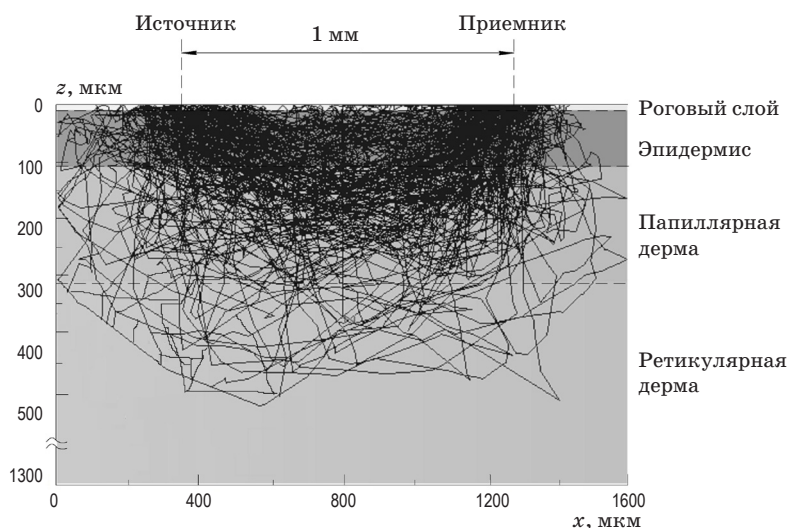


Рис. 4. Распространение флуоресцирующих лучей внутри ткани.

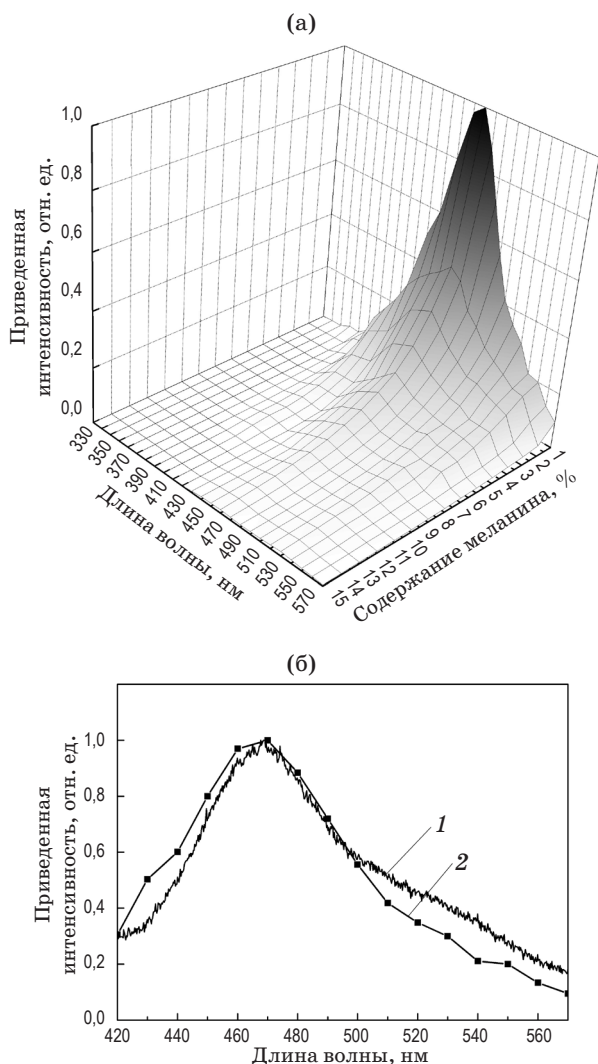


Рис. 5. Семейство модельных спектров, рассчитанных методом Монте-Карло (а), сравнение экспериментального (1) и модельного (2) спектров (б) в случае европейского типа кожи с 1%-м содержанием меланина.

каратиноиды и др.), не включенные в моделирование, что также приводит к отличиям модельных и экспериментальных спектров [24].

Одной из проблем метода ФС является учет потерь интенсивности возбуждающего излучения, что в конечном итоге затрудняет калибровку данного типа диагностических устройств, а именно установление зависимости между показаниями прибора и значениями измеряемой величины. Таким образом, влияние меланина следует учитывать как при калибровке средств регистрации сигнала флуоресценции, так и при обосновании МТТ к приборам ФС.

Полученные результаты необходимо учитывать при проектировании электронных узлов устройства. Так, например, необходимо предъ-

являть особые требования к выбору фотоприемника (ФП), так как необходима их высокая фотометрическая точность.

В работе были рассмотрены ФП на основе ПЗС TCD1304AP и ILX511, широко применяемые в современной спектроскопии, и с учетом результатов проведенного моделирования оценены их шумовые характеристики (отношение сигнал/шум – SNR). Целью расчета является определение пороговых (минимальных) значений потока излучения, попадающего на ФП, при которых уровень полезного сигнала равен значению темнового шума ПЗС, так как предполагается, что он вносит доминирующий вклад в общий шум ФП. Проведенные расчеты показали, что при низком содержании меланина в коже (на уровне 1%) и времени накопления 10 мс SNR составляет 60–70 дБ. При увеличении пигментации SNR уменьшается и на уровне содержания 11–12% составляет 0–5 дБ, что в результате затрудняет выделение полезного низкоинтенсивного сигнала флуоресценции на фоне шумов. В абсолютных фотометрических величинах этому соответствует значение потока излучения $2,92 \times 10^{-15}$ Вт для TCD1304AP и $6,15 \times 10^{-15}$ Вт для ILX511. Линейка ПЗС ILX511, несмотря на более высокую чувствительность в целом, обладает более низким отношением сигнал/шум, что иллюстрирует рис. 6.

Таким образом, полученные результаты подтверждают необходимость обоснования МТТ при проектировании оптико-электронных узлов приборов как для ФС, так и в целом для неинвазивной диагностики в медицине.

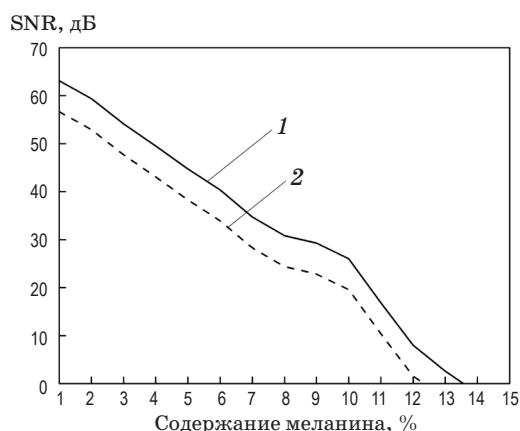


Рис. 6. Зависимости соотношения сигнал/шум от содержания меланина для ПЗС TCD1304AP (1) и ILX511 (2).

Заключение

Было оценено влияние содержания кожного меланина на интенсивность регистрируемых спектров флуоресценции и показана ограниченность современного подхода регистрации спектров флуоресценции у представителей различных этнических групп. На основании разработанной оптической модели кожи и моделирования методом Монте-Карло возможен анализ распространения излучения в биоткани в целом, что может быть полезно и в других неинвазивных оптических методах исследования.

Одним из направлений развития представленного моделирования является возможное определение оптических свойств интактных (здоровых) и пораженных различными деструктивными процессами тканей спектрофотометрическими методами с последующим использованием полученных данных при построении модели. Таким образом удастся получить априорную информацию для последующей качественной дифференциации здоровых и пораженных тканей при реальных клинических исследованиях.

Работа выполнена в рамках базовой части государственного задания Минобрнауки РФ для ФГБОУ ВПО «Тосуниверситет – УНПК» (№ 310).

* * * * *

ЛИТЕРАТУРА

1. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2-х т. Т. 1: Пер. с англ. под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. 560 с.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
3. Akbar N., Sokolovski S.G., Dunaev A.V., Belch J.J., Rafailov E.U., Khan F. *In vivo* noninvasive measurement of skin autofluorescence biomarkers relate to cardiovascular disease in mice // J. Microscopy. 2014. V. 255. № 1. P. 42–48.
4. Smirnova O.D., Rogatkin D.A., Litvinova K.S. Collagen as *in vivo* quantitative fluorescent biomarkers of abnormal tissue changes // J. Innovative Optical Health Science. 2012. V. 5. № 2. 1250010.
5. Rogatkin D.A., Смирнова О.Д. Математическое моделирование регистрируемых сигналов в медицинской лазерной неинвазивной флуоресцентной диагностике // Оптический журнал. 2013. Т. 80. № 9. С. 54–60.
6. Dunaev A.V., Zharebtsov E.A., Rogatkin D.A., Stewart N.A., Sokolovski S.G., Rafailov E.U. Substantiation of medical and technical requirements for non-invasive spectrophotometric diagnostic devices // J. Biomedical Optics. 2013. V. 18. № 10. 107009.
7. Dunaev A.V., Dremine V.V., Zharebtsov E.A., Rafailov I.E., Litvinova K.S., Palmer S.G., Stewart N.A., Sokolovski S.G., Rafailov E.U. Individual variability analysis of fluorescence parameters measured in skin with different levels of nutritive blood flow // Medical Engineering & Physics. 2015. V. 37. № 6. P. 574–583.
8. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2-х т. Т. 2: Пер. с англ. под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. 368 с.
9. Kollias N., Baqer A. Spectroscopic characteristics of human melanin *in vivo* // J. Investigative Dermatology. 1985. № 85. P. 38–42.
10. Petrov G.I., Doronin A., Whelan H.T., Meglinski I.V., Yakovlev V.V. Human tissue color as viewed in high dynamic range optical spectral transmission measurements // Biomed. Opt. Exp. 2012. V. 3. № 9. P. 2154–2161.
11. Hamzavi I., Shiff N., Martinka M., Huang Z., McLean D.I., Zeng H., Lui H. Spectroscopic assessment of dermal melanin using blue vitiligo as an *in vivo* model // Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine. 2006. № 22. P. 46–51.
12. Chen R., Huang Z., Lui H., Hamzavi I., McLean D.I., Xie S., Zeng H. Monte Carlo simulation of cutaneous reflectance and fluorescence measurements – The effect of melanin contents and localization // J. Photochemistry and Photobiology. 2007. № 86. P. 219–226.
13. Rogatkin D.A., Sokolovski S.G., Fedorova K.A., Sidorov V.V., Stewart N.A., Rafailov E.U. Basic principles of design and functioning of multifunctional laser diagnostic system for non-invasive medical spectrophotometry // Proc. SPIE. 2011. V. 7890. 78901H.
14. Jacques S.L. Optical properties of biological tissues: A review // Physics in Medicine and Biology. 2013. № 58. P. 37–61.

15. Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F., Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals // J. Biological Chemistry. 1979. V. 254. № 11. P. 4764–4771.
16. Wagnieres G.A., Star W.M., Wilson B.C. *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications // J. Photochemistry and Photobiology. 1998. V. 68. № 5. P. 603–632.
17. Richards-Kortum R., Rava R.P., Baraga J., Fitzmaurice M., Kramer J., Feld M. In *Optronic Techniques in Diagnostic and Therapeutic Medicine*. NY: Plenum, 1990. P. 129–138.
18. Рогаткин Д.А. Физические основы лазерной клинической флюоресцентной спектроскопии *in vivo*. Лекция // Медицинская физика. 2014. № 4. С. 78–96.
19. Jacques S.L. Origins of tissue optical properties in the UVA, visible, and NIR regions // *Advances in Optical Imaging and Photon Migration*. 1996. V. 2. P. 364–369.
20. Churmakov D.Y., Meglinski I.V., Piletsky S.A., Greenhalgh D.A. Analysis of skin tissues spatial fluorescence distribution by the Monte Carlo simulation // J. Physics D: Appl. Phys. 2003. V. 36. № 14. P. 1722–1728.
21. Jacques S.L., Wang L. Monte Carlo modeling of light transport in tissues // *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissues*. 1995. V. 12. P. 73–100.
22. Silveira J.L., Silveira F.L., Bodanese B., Zângaro R.A., Pacheco M.T.T. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma *in vitro* based on the Raman spectra of selected biochemical // J. Biomedical Optics. 2012. V. 17. № 7. 077003.
23. Дунаев А.В., Дрёмин В.В., Жеребцов Е.А., Палмер С.Г., Соколовский С.Г., Рафаилов Э.У. Анализ индивидуальной variability параметров в лазерной флуоресцентной диагностике // Биотехносфера. 2013. Т. 26. № 2. С. 39–47.
24. Anderson R.R. *In vivo* fluorescence of human skin [letter, comment] // Arch. Dermatol. 1989. V. 125. P. 999–1000.