

УДК 535.3,616-006

ВОЗМОЖНОСТИ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ

© 2015 С.В. Козлов¹, В.П. Захаров², А.А. Морятков¹, И.А. Братченко², Д.Н. Артемьев²

¹ Самарский государственный медицинский университет

² Самарский государственный аэрокосмический университет им. акад. С.П. Королева
(национальный исследовательский университет)

Поступила в редакцию 29.03.2015

В статье приведены сведения об эпидемиологии меланомы кожи, анализ методов диагностики. Представлен первый опыт применения нового метода диагностики опухолей кожи. Проанализированы результаты спектроскопии комбинационного рассеяния опухолей кожи человека *in vitro* и *in vivo*. Показано, что комбинационное рассеяние с оригинальным двухэтапным фазовым анализом параметров обладает высокими показателями чувствительности и специфичности. Предложен новый способ ранней диагностики новообразований кожи.

Ключевые слова: новообразование, кожа, меланома, спектроскопия комбинационного рассеяния, неинвазивная диагностика

Среди других новообразований злокачественная меланома кожи (МК) занимает особое положение, обладая агрессивными свойствами, она ответственна за более чем 85% летальности от злокачественных новообразований кожи. МК распространена неравномерно, наиболее высокие показатели заболеваемости характерны для Австралии и новой Зеландии (до 40 на 100 тыс. населения), Соединенных штатов Америки (до 21,1 на 100 тыс.), некоторых стран Европы [3]. В частности, в США в 2013 г. заболевание выявлено у 76,600 американцев, причем 35% заболевших – это люди моложе 45 лет. В России ежегодно выявляется более полумиллионов новых больных злокачественными новообразованиями (ЗНО), из них 14% это злокачественные новообразования кожи. МК в России встречается реже, ежегодно заболевает около 8500 человек – 3,97 новых заболеваний на 100 тыс. человек, но характерен высокий уровень ежегодного прироста заболеваемости от 4,55 до 6,1% ежегодно за последнее десятилетие [1]. В Самарской области

высокие показатели заболеваемости ЗНО – 446,6 на 100 тыс., одной из особенностей региона является высокий уровень заболеваемости новообразованиями кожи – 18,6%, первое место в структуре онкопатологии в 2013 г.

Цель исследования: разработать новый метод ранней неинвазивной дифференциальной диагностики новообразований кожи.

Скрининг и диагностика. МК – уникальная опухоль, для которой характерно многообразие клинических проявлений, особенно сложно дифференцировать меланому с другими новообразованиями кожи в начальных стадиях заболевания. Потенциально опасные пигментные или пигментированные новообразования кожи при визуальном осмотре можно выявить более, чем у 90% населения [5]. Следствием гиподиагностики меланомы может быть длительное наблюдение или неадекватное лечение, приводящее к диссеминации новообразования с предсказуемым исходом. Гипердиагностика меланомы приводит к неоправданно завышенному объёму хирургического вмешательства и серьезным косметическим дефектам. Несмотря на существенные успехи, достигнутые в системной лекарственной терапии МК, результаты 5-летней выживаемости более всего зависят от своевременной и эффективной диагностики и адекватного объёма хирургического лечения. Поэтому актуальным остается поиск методов ранней и уточняющей диагностики меланомы кожи.

Большинство МК при их визуальном исследовании обладают одним или несколькими

Козлов Сергей Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии. E-mail: KozlovSV@samaraonko.ru

Захаров Валерий Павлович, доктор физико-математических наук, профессор. E-mail: ssauvz@mail.ru

Морятков Александр Александрович, кандидат медицинских наук, доцент. E-mail: ata78@mail.ru

Братченко Иван Алексеевич кандидат физико-математических наук, ассистент. E-mail: ud_liche@mail.ru

Артемьев Дмитрий Николаевич, инженер НИЛ «Фотоника». E-mail: artemyevdn@gmail.ru

характерными признаками – правило ABCDE [6]. Однако использование правила ABCDE не исключает множество субъективных оценок и не имеет достаточной специфичности. В России массовые исследования позволяют выявлять до 15% всех новых случаев МК. Эффективность визуальной диагностики, в том числе с использованием правила ABCDE напрямую зависит от опыта и специализации врачей и от частоты встречаемости таких новообразований в их повседневной практике [4]. Одним из возможных способов преодоления упомянутых недостатков и повышения качества диагностики является использование стандартных приборов и инструментов, наиболее распространенным является метод дерматоскопии (эпидиоминесцентная микроскопия) [8, 10]. Использование метода позволяет достигнуть диагностической точности 92,2%, чувствительность – 97,9% и специфичность – 90,3%. Ультразвуковое исследование МК направлено на определения уровня инвазии и обследования зон регионарного метастазиро-

вания [2] для правильного выбора объема хирургического лечения [7]. Возможным недостатком метода может быть некорректное завышение оценки глубины опухолевой инвазии при развитии её на фоне пигментного невуса или изъязвлении опухоли. Флуоресцентная диагностика – метод, основанный на выявлении характерной флуоресценции злокачественных клеток, помогает активному поиску скрытых, небольших по размерам опухолевых очагов на поверхности кожи (сателлиты или транзиторные метастазы). К сожалению, реализация перечисленных методов возможна только на базе крупных специализированных центров, с участием подготовленных специалистов, дорогостоящих методов или реактивов, что затрудняет их широкое применение. Возможным решением проблемы будет поиск способа повышения эффективности ранней диагностики новообразований кожи путем изучения диагностических возможностей новых оптических методов анализа строения тканей человека.

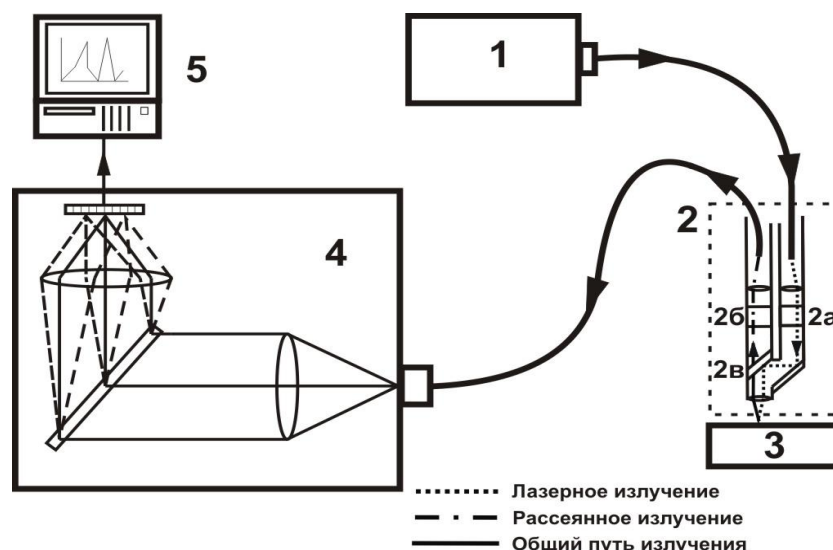


Рис. 1. Оптическая схема экспериментальной установки:

1 – лазер, 2 – оптический модуль, включающий узкополосный фильтр 2а, широкополосный фильтр 2б, дихроичное зеркало 2в, 3 – исследуемый образец, 4 – спектрограф с цифровой камерой, 5 – компьютер

Материалы и методы. Ранее проведенные исследования [11] показали возможные перспективы использования методов спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) для дифференциальной диагностики новообразований кожи, в том числе для организации массовых исследований и мониторинга новообразований кожи. В данной работе использовалась экспериментальная установка, реализующая принципы КР. Принципиальная схема установки представлена на рис. 1. Основные элементы: полупроводниковый лазер 1 (LML-785.0RB-04), оптический КР модуль 2 (PBL 785), спектрограф

(Sharnrock SR-303i) с интегрированной цифровой камерой (ANDOR DV-420A-OE) и компьютер. Для выделения комбинационного рассеяния использовался оптический модуль 2, который отрезал вклад оптического волокна и предотвращал попадание возбуждающего излучения в регистрирующий тракт спектрографа 4. Использование данного спектрографа обеспечивает разрешение 0,05 нм при низком уровне собственных шумов. Для исключения вклада автофлуоресценции в КР спектре использовался метод полиномиальной аппроксимации с дополнительной фильтрацией случайных шумовых эффектов

и автоматическим определением степени полинома по заданному спектральному интервалу. В данной работе анализ КР спектров производился в диапазоне 1200-1800 см^{-1} .

В качестве объектов исследований были использованы образцы различных новообразований кожи человека, полученные после хирургического лечения в отделениях Самарского областного клинического онкологического диспансера (СОКОД). Регистрацию спектра КР выполняли, располагая рабочую часть спектрометра (рис. 1 оптический модуль) непосредственно над исследуемой областью на расстоянии 3-4 мм. Последовательно проводили регистрацию спектра с патологически измененного участка, далее участка здоровой кожи. Время обследования одного пациента составляло не более 3-5 минут. В серии экспериментов *ex vivo* была проведена регистрация спектров КР с образцов новообразований кожи с диагнозом: меланома – 24, базальноклеточный рак – 25, плоскоклеточный рак – 7, пигментный невус – 9, другие доброкачественные новообразования – 6.

Следующий этап – проведение экспериментов *in vivo*, были проанализированы КР-спектры полученных при исследовании: меланома – 9 наблюдений, базальноклеточный рак – 8, пигментный невус – 2, другие доброкачественные новообразования – 2. Все пациенты,

участвующие в исследовании, были старше 18 лет, были предварительно обследованы в СОКОД и подготовлены к хирургическому лечению в отделениях. Участие в исследовании было добровольным и сопровождалось информированным согласием, исследование получило положительную оценку комитета по биоэтике.

Анализ КР спектров новообразований и кожи. Ввиду высокой вариативности значений данных интенсивностей для разных пациентов, связанной, в том числе, с различной концентрацией кожных пигментов, КР спектр исследуемых образцов может существенно отличаться друг от друга. Для компенсации данного эффекта произведена нормировка всех спектров на максимум интенсивности пика в полосе 1430-1460 см^{-1} . Характерные нормированные спектры комбинационного рассеяния для новообразований и нормальной кожи представлены на рис. 2. Максимум спектра комбинационного рассеяния соответствует сдвигу КР 1450 см^{-1} , которому отвечает изгибная мода колебаний группы CH_2/CH_3 . Наряду с данной полосой уверенно регистрируются полосы 1240-1280 см^{-1} (продольная мода колебаний $\text{C}=\text{N}$), 1300-1340 см^{-1} (изгибные и скручивающие моды связи CH_2), 1540-1580 см^{-1} (деформационная мода связи $\text{C}=\text{C}$ и триптофана), 1640-1680 см^{-1} (продольная колебательная мода $\text{C}=\text{O}$ в амидах).

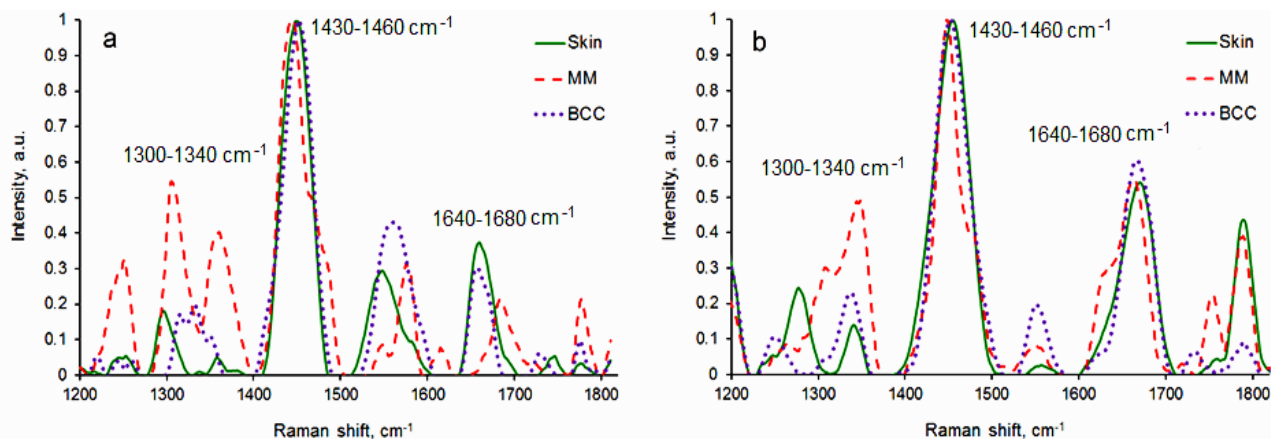


Рис. 2. Нормализованные спектры комбинационного рассеяния здоровой кожи, меланомы и базальноклеточного рака (a – *ex vivo*, b – *in vivo*) в области 1200-1800 см^{-1}

Существующие различия в интенсивностях КР пиков для нормальной кожи и различных видов новообразований кожи могут объясняются структурными нарушениями тканей при развитии ЗНО либо изменением концентрации отдельных биологических молекул в опухолевых клетках. Основные спектральные различия между здоровой кожей и ЗНО, зарегистрированы как *in vivo* так и *ex vivo* в полосах 1300 и 1750-1780 см^{-1} . Наличие существенных различий в КР спектрах исследуемых образцов но-

вообразований и здоровой кожи позволяет провести дифференциацию типов данных тканей с использованием КР спектроскопии. Для определения типа исследуемой ткани предложен метод фазового анализа интенсивностей КР исследуемых тканей.

Проведенные исследования позволяют сформулировать и предложить способ анализа КР спектра новообразований – метод расчета фазовых критериев определения ЗНО кожи и меланомы относительно других новообразований

кожи – двухэтапный фазовый метод. Исходно полученные параметры спектра КР последовательно анализируют. На первом этапе вводится две фазовые характеристики: отношение максимумов интенсивности рассеяния I_{1320} в полосе $1300-1340\text{ см}^{-1}$ и I_{1660} в полосе $1640-1680\text{ см}^{-1}$ по отношению к интенсивности КР в полосе $1440-1460\text{ см}^{-1}$. Тогда каждое измерение может быть представлено в виде точки на фазовой плоскости $I_{1320} - I_{1660}$ (рис. 3а, 4а). Используя в качестве эталонного метода гистологические исследования образцов, проводящиеся независимо от спектральных измерений, каждая экспериментальная точка на фазовой плоскости может быть отнесена к меланоме, раку кожи, здоровой коже или доброкачественным новообразованиям. Это позволяет реализовать способ оптической идентификации меланомы. Предварительно рассчитанные показатели чувствительность и специфичность метода для диагностики меланомы *ex vivo* на первом этапе составили 88% и 90%. При исследованиях *in vivo* чувствительность определения меланомы составила 78%, а специфичность 90%. Невысокое значение чувствительности на первом этапе метода по сравнению с экспериментами *ex vivo* может стать препятствием для проведения массовых

исследований. В связи с этим был предложен второй этап анализа.

На втором этапе диагностики рассматривались абсолютные изменения интенсивностей в полосах 1320 , 1450 и 1660 см^{-1} в ненормированных КР спектрах новообразований относительно здоровой ткани. Другими словами, выделились 3 координаты спектра новообразования (It_{1320} , It_{1450} и It_{1660}) и 3 координаты нормальной ткани (In_{1320} , In_{1450} и In_{1660}), и далее вычислялась разница соответствующих координат по абсолютной величине, нормированной на сумму интенсивностей в конкретной полосе ($\Delta I_{1320} = |It_{1320} - In_{1320}| / (It_{1320} + In_{1320})$ и т.д.). Последовательный анализ данных координат позволяет построить 3 фазовые плоскости (первая: оси ΔI_{1320} и ΔI_{1450} , вторая: оси ΔI_{1320} и ΔI_{1660} , третья: оси ΔI_{1450} и ΔI_{1660}), которые оказались полезными для определения вида новообразований кожи. Наблюдения с пигментными новообразованиями, подозрительными в отношении меланомы, но не попавшие в соответствующую область фазовой плоскости на первом этапе рассматривают на втором этапе анализа; положение расчетной точки в поле соответствующем меланоме на одном из этапов исследования является маркером МК.

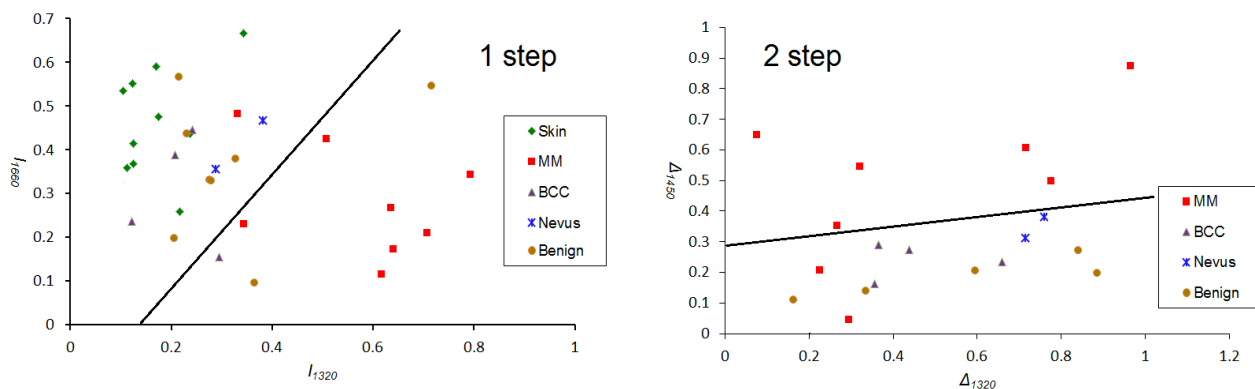


Рис. 3. Классификация новообразований двухстадийным фазовым методом *ex vivo*

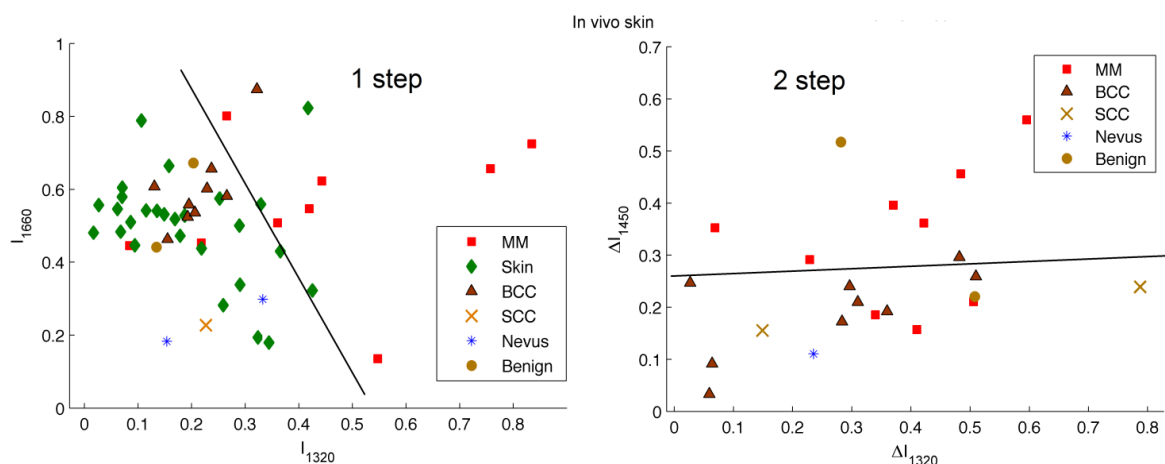


Рис. 4. Классификация новообразований двухстадийным фазовым методом *in vivo*

При введении второго этапа анализа КР спектров скорректированные предварительные показатели – чувствительность и специфичность – при исследованиях *ex vivo* составили 88% и 100% соответственно. Следует отметить, что специфичность двухстадийного фазового метода идентификации меланомы выше, чем в пороговых методах, что позволяет сделать вывод о низкой вероятности ложной идентификации заболевания, которая стремится к нулю на данном этапе. Для исследований *in vivo* использование двухстадийного метода позволило повысить чувствительность на 11% (89%), а специфичность при этом составила 88%. Таким образом, двухстадийный метод позволяет существенно повысить точность диагностики МК при исследованиях новообразований кожи с использованием абсолютных изменений интенсивностей в полосах 1320 и 1450 см⁻¹.

Эффективность предложенного двухстадийного метода диагностики новообразований кожи в среднем на 5-10% выше по сравнению с другими методами диагностики [4, 5, 8, 10], основанными на анализе комбинационного рассеяния. Важным является факт использования сравнения индивидуальных характеристик спектра КР полученных при исследовании новообразования и здоровой кожи, каждого пациента (второй этап исследования), что позволяет индивидуализировать метод. Высокие показатели чувствительности особенно важны для организации массового скрининга новообразований кожи при профилактических осмотрах, учитывая практически полное отсутствие ложных отрицательных результатов. Другим достоинством предложенного метода является его инвариантность относительно размеров опухоли: точность диагностики не снижается при анализе новообразований диаметром менее 5 мм, так как диаметр пятна лазерного луча спектрометра комбинационного рассеяния не превосходит 2 мм. При визуальном осмотре врачом малый размер новообразования является существенным затруднением и эффективность диагностики по результатам визуального осмотра снижается до 40%, а при использовании фазового метода точность диагностики злокачественного новообразования сохраняется на уровне 90%.

Выводы: первые результаты исследования, посвященного изучению разрешающих возможностей метода спектроскопии КР (Рамановской спектроскопии) с последующим двухэтапным фазовым анализом полученных параметров показывает высокую эффективность

метода для дифференциальной диагностики МК и других ЗНО, пигментных и других доброкачественных новообразований кожи. Безопасность и быстрота проведения исследования показывают высокие потенциальные возможности метода; возможность анализа подозрительного в отношении меланомы кожи очага независимо от размера и локализации; отсутствие необходимости сложного анализа субъективных признаков, и автоматический алгоритм интерпретации данных позволяют видеть перспективу широкого использования метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Каприн, Д.В. Состояние онкологической помощи населению в 2012 году / Д.В. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий» 2013. 250 с.
2. Сидоренко, Ю.С. Способ неинвазивной диагностики меланомы кожи / Ю.С. Сидоренко, Н.А. Максимова, В.В. Позднякова, Я.В. Дрейзина // патент на изобретение РФ №2318441, приоритет от 05.09.2006 г.
3. Worldwide Incidence for Melanoma of the Skin – Statistics from GLOBOCAN 2012.
4. Brochez, L. Diagnostic ability of general practitioners and dermatologists in discriminating pigmented skin lesions / L. Brochez, E. Verhaeghe, L. Bleyen, J.M. Naeyaert // J.Am. Acad. Dermatol. 2001. Jun; V. 44(6). P. 979-986.
5. Ermakov, A.V. Early diagnosis and prophylaxis for cutaneous melanoma // J. Oncosurgery. 2013. V. 5(3). P. 52-58.
6. Friedman, R. Early detection of malignant melanoma: role of physician examination and self-examination of the skin / R. Friedman, D. Rigel, A. Kopf // CA: Cancer Journal of Clinicians. 1985. Vol. 35. P. 130-151.
7. Krahn, G. Dermatoscopy and high frequency sonography: two useful non-methods to increase pre-operative diagnostic accuracy in pigmented skin lesions / G. Krahn et al. / Pigment Cell Res. 1998. V.11. P. 151-154).
8. Menzies, S.W. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma / S.W. Menzies, C. Ingvar, W. McCarthy / H Melanoma Res. 1996. Vol. 6. No. 1. P. 55-62.
9. Rubegni, P. Melanocytic skin lesions and pregnancy: digital dermoscopy analysis // P. Rubegni, P. Sbrano, V. Burroni et al. // Skin Res. Technol. 2007. Vol. 13(2). P. 143-147.
10. Sergeyev, Yu.V. Digital video dermoscopy: new approaches to the diagnosis, treatment and prevention of skin diseases / Yu.V. Sergeyev, O.L. Ivanov, A.Yu. Sergeyev et al. // Russian Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases. 2004. Vol. 1. P. 23.
11. Zhao, J. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis / J. Zhao, H. Lui, D.I. McLean, H. Zeng // Cancer Res. 2012. V. 72(10). P. 2491-2500.

POSSIBILITY BACKSCATTERING SPECTROMETRY FOR DIAGNOSTICS OF SKIN NEOPLASMS

© 2015 S.V. Kozlov¹, V.P. Zakharov², A.A. Moryatov¹, I.A. Bratchenko², D.N. Artemyev²

¹Samara State Medical University

²Samara State Aerospace University named after academician S.P. Korolyov
(National Research University)

The data on cutaneous melanoma epidemiology and diagnostic techniques. New method diagnosis of skin neoplasms is suggested. The results of resonance Raman spectroscopy of human skin neoplasms in vitro and in vivo are analyzed. Displayed: by means of original two-stage phase analysis of obtained parameters the method possesses high sensitivity and specificity scores. Conclusions: new technique of early non-invasive skin neoplasms diagnosis is suggested.

Key words: *skin, neoplasms, melanoma, backscattering spectrometry, noninvasive diagnosis*

*Sergey Kozlov, Doctor of Medicine, Professor, Head of the
Oncology Department. E-mail: KozlovSV@samaraonko.ru
Valeriy Zakharov, Doctor of Physics and Mathematics,
Professor. E-mail: ssauvz@mail.ru
Alexander Moryatov, Candidate of Medicine, Associate
Professor. E-mail: ama78@mail.ru
Ivan Bratchenko, Candidate of Physics and Mathematics,
Assistant. E-mail: ud_liche@mail.ru
Dmitriy Artemyev, Engineer at the SRL "Photonica". E-mail:
artemyevdn@gmail.ru*