

ФЛУОРЕСЦЕНТНА СПЕКТРОСКОПИЯ ПРИ ДИАГНОСТИКА НА СПИНОЦЕЛУ- ЛАРНИ КАРЦИНОМИ НА КОЖАТА

Е. Павлова¹, П. Троянова² и Е. Борисова³

¹МДЦ „Царица Йоанна – ИСУЛ”,

²УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”,

³Институт по електроника – БАН

FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN DIAGNOSTICS OF SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE SKIN

E. Pavlova¹, P. Troyanova² and E. Borisova³

¹Medical-Dental Center “Tsaritsa Yoanna – ISUL”

²University Multiprofile Hospital for Active Treatment “Tsaritsa Yoanna – ISUL”

³Institute of Electronics – Bulgarian Academy of Sciences

Резюме: Флуоресцентната спектроскопия е модерен диагностичен метод, който се основава на флуоресценцията – свойството на веществата и тъканите да излъчват светлина при възбуждането им със светлинни кванти. Поради променения метаболизъм на туморните клетки и специфичните концентрации на някои вещества в тях флуоресцентните им спектри се различават значително от тези на здравата тъкан. Целта на проучването е да се анализират възможностите за приложение на автофлуоресцентната спектроскопия за диагностика на спиноцелуларните кожни карциноми (СЦК). Настоящото проучване обхваща 37 случая със спиноцелуларни карциноми, при които е проведено спектрално измерване и са определени флуоресцентните спектри. Сравнени са измерените показатели, характеризиращи спектрите на здравата кожа, СЦК и базоцелуларните карциноми (БЦК). Анализът на флуоресцентните спектри не намира промени във формата, а в интензитета на флуоресцентния сигнал на СЦК спрямо здравата кожа и спрямо БЦК. СЦК, независимо от степента на диференциация, се характеризират с флуоресценция с висок интензитет и със зелена светлина. При тези тумори се наблюдава висок интензитет на флуоресцентния сигнал, дори по-висок от този на околната здрава кожа. Получените резултати показват, че съществува статистически значима корелация между немеланомните кожни карциноми и особеностите на флуоресцентните им спектри, както и сигнификантна разлика между спектралните особености на СЦК, БЦК и здравата кожа. Следователно флуоресцентната спектроскопия може да се използва за диагностика на СЦК, както и за разграничаването им от БЦК.

Ключови думи: флуоресцентна спектроскопия, флуоресцентен спектър, спиноцелуларен карцином, базоцелуларен карцином

Адрес за кореспонденция: Доц. д-р Петранка Троянова, УМБАЛ “Царица Йоанна – ИСУЛ”, ул. „Бяло море” № 8, 1527 София, тел.: 0888 876 482, факс: 9432144

Summary: Fluorescence spectroscopy is a modern diagnostic technique based on the fluorescence emission – the property of substances and tissues to emit light upon their excitation with light. Due to the altered metabolism of tumour cells and the specific concentrations of certain substances in the tumour cells, their fluorescence spectra differ considerably from the fluorescence spectra of the healthy tissue. The purpose of this study is to analyze the possibilities for application of autofluorescence spectroscopy for diagnosis of squamous cell skin carcinomas (SCCs). This study included 37 cases of SCCs wherein spectral measurement was performed, and fluorescence spectra were determined. It compares the measured parameters characterizing the spectra of normal skin and basal cell carcinoma (BCC) as well. Analysis of the

fluorescence spectra did not find any significant changes of the shape but there are changes of the intensity of the fluorescent signal of SCC relative to healthy skin and to BCC. SCCs, regardless of the degree of differentiation, are characterized by a high fluorescence intensity and a green light added peak. In SCCs there is a high intensity of fluorescent signal, even higher than that of the surrounding healthy skin. The obtained results show a statistically significant correlation between non-melanoma skin cancer and the characteristics of their fluorescence spectra. There are significant differences between the spectral characteristics of SCCs, of BCC and normal skin. Therefore, fluorescence spectroscopy can be used to diagnose SCCs and to distinguish them from the BCC.

Key words: fluorescence spectroscopy, autofluorescence spectra, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma

Address for correspondence: Assoc. Prof. P. Troyanova, DM, UMHAT "Tsaritsa Yoanna – ISUL", 8 Byalo more St., Bg – 1527 Sofia, tel.: +359 888 876 482, fax: +359 2 9432144

УВОД

Съвременната диагностика на кожните неоплазии изисква използването на ефективни, обективни, възпроизводими, неинвазивни методи, които да дадат точна диагноза *in vivo* и в реално време. През последните години в клиничната онкология се появяват различни оптични техники като обещаваща алтернатива или допълнителни инструменти за ранна и прецизна диагностика на злокачествените тумори [4, 7, 9]. Те се основават на променените оптични свойства на тъканите в процеса на канцерогенезата. Изследванията показват, че по време на туморната прогресия се увеличава митохондриалната автофлуоресценция, намаляват колагеновата автофлуоресценция и отражението поради хемоглобиновата абсорбция. Тези оптични промени могат да се използват за образна диагностика, основана на отразената светлина и флуоресценцията, както и за спектроскопска диагностика, използваща отражателна и флуоресцентна спектроскопия [1, 3].

Многобройни съвременни проучвания [2, 5] показват потенциала на автофлуоресцентната спектроскопия да извлича диагностично полезна информация относно кожните тумори. Касае се за модерен диагностичен метод, който се основава на флуоресценцията – свойството на веществата и тъканите да излъчват светлина при възбуждането им със светлинни кванти. Поради променения метаболизъм на туморните клетки и специфичните концентрации на някои вещества в тях флуоресцентните им спектри се различават значително от тези на здравата тъкан.

Целта на проучването е да се анализират възможностите за приложение на автофлуоресцентната спектроскопия за диагностика на спиноцелуларните карциноми на кожата (СЦК).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Настоящото проучване обхваща 74 болни (38 мъже и 36 жени) с немеланомни кожни карциноми

(НМКК), от които 37 са спиноцелуларни (СЦК) и 37 – базоцелуларни (БЦК).

Средната възраст на изследваните лица е 68 години за мъжете и 67 за жените.

Всеки пациент е регистриран като отделен случай само с едно кожно образувание. Всички болни имат първични тумори от категория Т1 (диаметър до 2 cm) и нямат лимфни и хематогенни метастази.

За всеки изследван случай е попълнена специално разработена карта. В нея са обозначени: паспортни данни, пол, възраст, местоживееене, клинична и морфологична диагноза, както и резултатите от измерването на флуоресцентните спектри при здрава кожа и кожни новообразувания. Всяка изследвана лезия е хистологично изследвана и резултатът е използван, като „златен стандарт“, спрямо който се изчислява диагностичната значимост на проучваните методи. От наблюдаваните 37 случая със спиноцелуларни карциноми се установяват 34 диференцирани тумори (G1-2) и 3 недиференцирани (G3-4).

При всичките наблюдавани случаи е проведено спектрално измерване и са определени флуоресцентните спектри на изследваните лезии. Спектрални изследвания са направени и в областта на околната здрава кожа, на разстояние 10 cm от видимия външен ръб на тумора.

Методът на флуоресцентната спектроскопия се основава на сравняването на флуоресцентните спектри на изследваните лезии с тези на нормалната кожа или друг вид кожни промени. Определени са интензитетът и формата на флуоресцентните сигнали и са сравнени измерените показатели, характеризиращи спектрите на здравата кожа, СЦК и БЦК.

За анализ на флуоресцентните спектри, получени от патологичните лезии, са избрани параметри, които по литературни данни [9] и наши предшестваци проучвания [6] най-точно описват флуоресцентните и отражателните свойства на кожата.

При флуоресцентната спектроскопия са измервани следните показатели:

1. При вълна на възбуждане с дължина 365 nm

Полученият флуоресцентен сигнал в зависимост от свойствата на изследваната тъкан може да бъде със:

- нисък интензитет
- висок интензитет
- висок интензитет със зелена светлина.

2. При вълна на възбуждане с дължина 385 nm

Полученият флуоресцентен сигнал може да бъде със:

- нисък интензитет
- висок интензитет
- нисък интензитет с минимума на 540 и 570 nm.

3. При вълна на възбуждане с дължина 405 nm

Полученият флуоресцентен сигнал може да бъде със:

- висок интензитет
- висок интензитет със зелена светлина
- нисък интензитет с минимума на 540 и 570 nm
- червена светлина с максимум на 630 nm
- нисък интензитет.

Използвана е апаратура, състояща се от два модула – светодиодна и детектираща система. Параметрите на оптичното лъчение на изхода на системата за възбуждане на флуоресценция са дължини на вълната на излъчването (I): 365, 380, 405, 450, 490, 630 nm. За регистриране на спектралните особености на тъканите се използва микроспектрометър USB4000 (OceanOptics Inc., Dunedin, USA). Апаратурата е изобретена в Института по електроника на БАН и се характеризира с определени технически параметри.

Проучването е одобрено от Етична комисия.

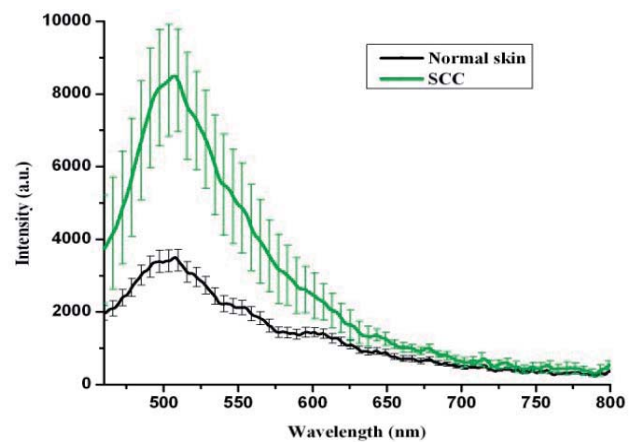
С помощта на статистическа програма SPSS (версия 13.0, SPSS Inc, USA) са изчислени честотите на променливите величини и връзките между тях. Статистическа значимост се приема при стойности на $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**Особености на флуоресцентните спектри на SCC спрямо околната здрава кожа**

При облъчване с дължина на вълната 365 nm най-често са измерени флуоресцентни сигнали с висок интензитет със зелена светлина – 21 случая, или 56,8%. Следващи по честота са туморите, при които са измерени флуоресцентни сигнали с висок интензитет – 10, или 27%, и най-малко са тези, при които получените сигнали имат нисък интензитет – 6, или 16,2%. Установява се статистически значима корелация между спиноцелуларните карциноми и особеностите на флуоресцентните им спектри ($p = 0,000$). Резултатите са обобщени в табл. 1 и фиг. 1.

Таблица 1. Флуоресцентни спектри, снети от СЦК и здрава кожа, при облъчване с вълна с дължина 365 nm

Вълна 365 nm	СЦК		Здрава кожа		P
	Брой	Процент	Брой	Процент	
Нисък интензитет	6	16,2	0	0	p = 0,000
Висок интензитет	10	27,0	33	89,2	
Висок интензитет със зелена светлина	21	56,8	4	10,8	
Не може да се определи	0	0	0	0	
Общо	37	100	37	100	



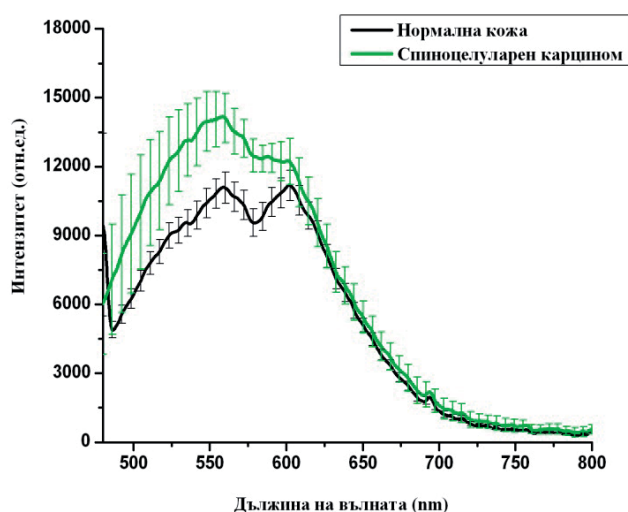
Фиг. 1. Флуоресцентни спектри на здрава кожа и спиноцелуларен карцином, осреднени за всички пациенти при възбуждане на 365 nm

Тъй като най-чести са случаите, при които получените флуоресцентни сигнали се характеризират с висок интензитет и зелена светлина, изследваме значението на този параметър като предиктор, определящ вероятността дадена лезия да бъде СЦК. Намираме, че флуоресцентният сигнал с висок интензитет и със зелена светлина е асоцииран сигнификантно със СЦК – OR = 2,8 (95% CI = 1,72-4,54).

При облъчване с дължина на вълната 385 nm най-често се получава флуоресцентен сигнал с висок интензитет, дори по-висок от този на околната здрава кожа – при 26 тумора, или 70,3%. Резултатите са показани в табл. 2 и фиг. 2. В този случай не се установява статистически значима връзка между спиноцелуларните карциноми и особеностите на флуоресцентните им спектри ($p = 0,326$) и следователно флуоресцентният сигнал с висок интензитет не може да служи като предиктор, определящ вероятността дадена лезия да бъде СЦК.

Таблица 2. Флуоресцентни спектри, снети от СЦК и здрава кожа, при облъчване с вълна с дължина 385 nm

Вълна 385 nm	СЦК		Здрава кожа		P
	Брой	Процент	Брой	Процент	
Нисък интензитет	7	18,9	1	2,7	p = 0,326
Висок интензитет	26	70,3	36	97,3	
Нисък интензитет с минимума на 540 и 570 nm	3	8,1	0	0	
Не може да се определи	1	2,7	0	0	
Общо	37	100	37	100	



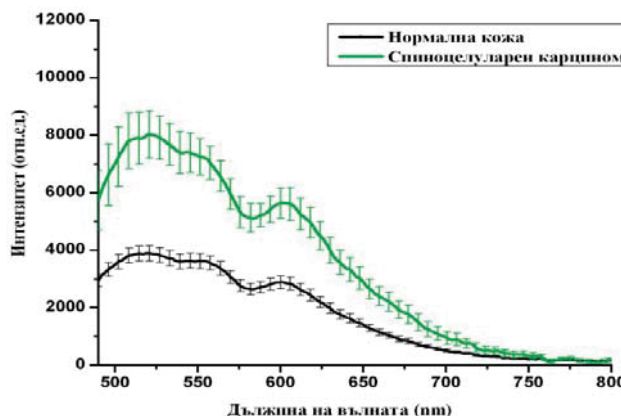
Фиг. 2. Флуоресцентни спектри на здрава кожа и спиноцелуларен карцином, осреднени за всички пациенти при възбуждане на 385 nm

Таблица 3. Флуоресцентни спектри, снети от СЦК и здрава кожа, при облъчване с вълна с дължина 405 nm

Вълна 405 nm	СЦК		Здрава кожа		P
	Брой	Процент	Брой	Процент	
Нисък интензитет	8	21,6	0	0	p = 0,534
Висок интензитет	16	43,3	35	94,5	
Висок интензитет със зелена светлина	9	24,3	2	5,5	
Нисък интензитет с минимума на 540 и 570 nm	3	8,1	0	0	
Червена светлина с максимум на 630 nm	1	2,7	0	0	
Не може да се определи	0	0	0	0	
Общо	37	100	37	100	

При облъчване с дължина на вълната 405 nm най-често се получава флуоресцентен сигнал с висок интензитет, дори по-висок от този на околната здрава кожа – при 17 тумора, или 38,6%. Резултатите са обобщени в табл. 3 и фиг. 3. Тук също не се

установява статистически значима връзка между СЦК и особеностите на флуоресцентните спектри спрямо околната здрава кожа (p = 0,534). Флуоресцентният сигнал с висок интензитет, получен при облъчване с дължина на вълната 405 nm, не може да служи като предиктор, определящ вероятността дадена лезия да бъде СЦК.



Фиг. 3. Флуоресцентни спектри на здрава кожа и спиноцелуларен карцином, осреднени за всички пациенти при възбуждане на 405 nm

Определяне на морфологичния тип на СЦК в зависимост от спектралните характеристики на тумора

При анализа на флуоресцентните спектри на СЦК в зависимост от степента на диференциация не се установява статистически значима връзка между флуоресцентните сигнали и морфологичните особености на тези тумори. В този случай сравняваме особеностите на флуоресцентните спектри на диференцираните спиноцелуларни карциноми спрямо спектрите на недиференцираните спиналиоми. Не се установяват статистически значими разлики между спектрите, получени при двете групи тумори и при трите дължини на вълната на възбуждане на флуоресценция. Получените флуоресцентни спектри с висок интензитет и със зелена светлина са сигнификантно свързани с наличието на СЦК (p < 0,05), но те не могат да служат със сигурност за разграничаване на диференцираните от недиференцираните спиналиоми (p > 0,05).

Особености на флуоресцентните спектри на СЦК спрямо БЦК

Сравнени са особеностите на флуоресцентните спектри при 37 СЦК и 37 БЦК. Разпределението на НМКК според тяхната морфология и особеностите на флуоресцентните им спектри при облъчване с дължина на вълната 365 nm е показано на табл. 4. При всички БЦК се получават флуоресцентни сигнали с нисък интензитет, при СЦК се из-

мерват най-често спектри с висок интензитет със зелена светлина или само с висок интензитет. Съществува статистически значима корелация между немеланомните кожни карциноми и особеностите на техните флуоресцентни спектри ($p = 0,0001$), а разликите между тях са значими.

Таблица 4. Флуоресцентни спектри, снети от СЦК и БЦК, при облъчване с вълна с дължина 365 nm

Вълна 365 nm	СЦК		БЦК		P
	Брой	Процент	Брой	Процент	
Нисък интензитет	6	16,2	27	72,9	p = 0,0001
Висок интензитет	10	27,0	3	8,2	
Висок интензитет със зелена светлина	21	56,8	7	18,9	
Не може да се определи	0	0	0		
Общо	37	100	37	100	

Разпределението на НМКК според морфологията и особеностите на флуоресцентните спектри при облъчване с дължина на вълната 385 nm е показано в табл. 5. При всички БЦК се получават предимно флуоресцентни сигнали с нисък интензитет. При СЦК се измерват предимно спектри с висок интензитет. Установява се статистически значима връзка между различните немеланомни кожни карциноми и особеностите на техните флуоресцентни спектри ($p = 0,005$).

Таблица 5. Флуоресцентни спектри, снети от СЦК и БЦК, при облъчване с вълна с дължина 385 nm

Вълна 385 nm	СЦК		БЦК		P
	Брой	Процент	Брой	Процент	
Нисък интензитет	7	18,9	27	73,0	p = 0,005
Висок интензитет	26	70,3	2	5,4	
Нисък интензитет с минимума на 540 и 570 nm	3	8,1	6	16,2	
Не може да се определи	1	2,7	2	5,4	
Общо	37	100	37	100	

Разпределението на НМКК според морфологията и особеностите на флуоресцентните спектри при облъчване с дължина на вълната 405 nm е показано в табл. 6. При повечето БЦК се получават флуоресцентни сигнали с нисък интензитет, а при СЦК се измерват предимно спектри с висок интензитет със зелена светлина и с висок интензитет. И в този случай е на лице сигнификантна асоциация между различните немеланомни кожни карциноми и особеностите на техните флуоресцентни спектри ($p = 0,0001$).

Таблица 6. Флуоресцентни спектри, снети от СЦК и БЦК, при облъчване с вълна с дължина 405 nm

Вълна 405 nm	СЦК		БЦК		P
	Брой	Процент	Брой	Процент	
Нисък интензитет	8	21,6	20	53,1	p = 0,0001
Висок интензитет	16	43,3	0	0	
Висок интензитет със зелена светлина	9	24,3	0	0	
Нисък интензитет с минимума на 540 и 570 nm	3	8,1	12	32,8	
Червена светлина с максимум на 630 nm	1	2,7	5	14,1	
Не може да се определи	0	0	0	0	
Общо	37	100	37	100	

Анализът на флуоресцентните спектри на СЦК и БЦК не намира промени в тяхната форма, но се установяват информативни промени в интензитета на флуоресцентния сигнал на СЦК спрямо здравата кожа и спрямо БЦК. СЦК се характеризират с флуоресценция с висок интензитет със зелена светлина, независимо от морфологичния вид. При тези тумори се наблюдава висок интензитет на флуоресцентния сигнал, дори по-висок от този на околната здрава кожа. Получените резултати показват, че съществува статистически значима корелация между НМКК и особеностите на флуоресцентните им спектри, както и разлика между особеностите на спектрите на СЦК, БЦК и здравата кожа. Следователно флуоресцентните спектри могат да се използват за диагностика на НМКК, както и за разграничаването на СЦК и БЦК.

Флуоресцентната спектроскопия е атрактивен диагностичен подход, който по неинвазивен начин дава количествена информация за биохимичното и морфологичното състояние на тъканта, използвайки един сравнително евтин и лесен за приложение апарат [9]. Методът се основава на биохимичните промени, които настъпват в тъканите в хода на неопластичната трансформация [7, 9]. Наблюдава се максимум в диапазона 480-490 nm, дължащ се на флуоресценция на структурния колаген и на еластина, чиито количества са различни в здравата кожа и СЦК. Различните концентрации и състоянието на коензимите никотинамид аденин динуклеотид (NAD⁺/NADH) и флавин аденин динуклеотид (FAD/FADH₂) е свързано с различната метаболитна активност в нормалната и в туморната тъкан. Флуоресценцията, дължаща се на NADH и на кератин, съществено се увеличава спрямо тази на колагена. Това се изразява в относително увеличение на интензитета на флуоресцентния сигнал в областта 430-470 nm (NADH) спрямо максималния

пик на флуоресценция, който се наблюдава в областта 480-490 nm. Наблюдава се повишаване на сигнала в областта на 520-570 nm (кератин), особено значим за СЦК [8, 10].

Следователно при проявата на различни патологични изменения се наблюдава увеличение или намаление на концентрациите на различните флуорофори и поглътителни, което води до значими промени в интензитета на наблюдаваните флуоресцентни спектри. Това обуславя възможностите на флуоресцентната спектроскопия да открива на злокачествените новообразувания на кожата на ранен етап от развитието им. Получените през последните години резултати показват, че този метод може обективно да разграничава различните патологични лезии на основата на техните *in vivo* автофлуоресцентни спектри и да бъде полезен като ефективно средство за диагностика, което се характеризира с бързина, неинвазивност и обективност.

ИЗВОДИ

Флуоресцентната спектроскопия е метод, чрез който могат да се диагностицират ранните СЦК. Техните флуоресцентни спектри се характеризират с флуоресцентен сигнал с висок интензитет, а при облъчване с вълна с дължина 365 nm – с флу-

оресцентен сигнал с висок интензитет със зелена светлина, който не се наблюдава при нормална кожа и при други типове карциноми.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Chung-Chieh, Yu. et al. Quantitative spectroscopic imaging for noninvasive early cancer detection. – Opt. Express, **16**, 2008, № 20, 16227-16239.
2. Gregory, M. et al. Quantitative Diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy: a tool to monitor tumor physiology in vivo. – J. Biomed. Opt., **14**, 2009, № 2, 024010.
3. Jerjes, W. K. et al. The future of medical diagnostics: review paper. – Head & Neck Oncology, **3**, 2011, 38.
4. Marcu, L. Fluorescence lifetime techniques in medical applications. – Ann. Biomed. Eng., **40**, 2012, № 2, 304-331.
5. Narasimhan, R. et al. Pilot clinical study for quantitative spectral diagnosis of nonmelanoma skin cancer. – Lasers Surg. Med., **42**, 2010, № 10, 716-727.
6. Pavlova, P. et al. Investigation of relations between skin cancer lesion's images and their fluorescent spectra. – Laser Physics, **20**, 2010, № 3, 1-8.
7. Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and nonneoplastic tissues. – Neoplasia, **2**, 2000, 1-29.
8. Richards-Kortum, R. et E. Sevick-Muraca. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. – Ann. Rev. Phys. Chem., **47**, 1996, 556-606.
9. Sankaranarayanan, R. et al. Effect of sclerotherapy on oral cancer mortality in Kerala, India: A cluster-randomised controlled trial. – Lancet, **365**, 2005, 1927-1933.
10. Wagnieres, G. A., W. M. Star et B. C. Wilson. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. – Photochem. Photobiol., **68**, 1998, 603-632.

ОФЕРТИ ЗА РЕКЛАМНО УЧАСТИЕ В ИЗДАНИЯТА НА ЦМБ:

1. Отпечатване на многоцветна рекламна страница:

- на корица – 720 лв.;
- в книжното тяло – 600 лв.

2. Отпечатване на черно-бяла реклама и/или текст за 1 страница – 150 лв.

3. Разпространение на готова вложка със списание – 1.00 лв./брой.

При отпечатване на повече от една реклама се правят отстъпки по договаряне.

По желание на рекламодателя многоцветните реклами могат да бъдат придружени от безплатно отпечатване на 1 страница текст след съгласуване на съдържанието му с редколегията.

Всеки рекламодател получава книжки от списанието.