

**Оценка минимально определяемого числа клеток злокачественных опухолей методами оптической спектроскопии с применением оптоволоконного зонда
УДК 53.082.531**

Бойченко Екатерина Сергеевна, Панченко Андрей Владимирович, Суркова Анастасия Алексеевна, Кирсанов Дмитрий Олегович

Аннотация

Цель работы – разработка методики оценки минимального числа злокачественных клеток, распознаваемых по их спектрам диффузного отражения, полученным в ближней инфракрасной области (БИК) посредством компактной спектрометрической аппаратуры. В ходе исследования была подготовлена культура злокачественных клеток рака яичников для подкожного введения лабораторным мышам и приготовлены растворы с различной концентрацией таких клеток для создания калибровочной шкалы. Измерение БИК спектров проводилось на живых лабораторных мышах под анестезией в заранее отмеченных точках до прокола и после введения клеточной культуры. Были выявлены спектральные характеристики, чувствительные к изменению числа клеток в точке измерения (интенсивность пика, сдвиг базовой линии), и оценено минимальное надежно распознаваемое число клеток злокачественных опухолей по графику зависимости величины поглощения на длине волны 1200 нм от логарифма числа клеток в растворе.

Ключевые слова

Оптоволоконный зонд, оптическая спектроскопия, злокачественные клетки, онкология, ближняя инфракрасная область

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ №МК-2192.2021.4. Авторы благодарят к.х.н. Хайдукову М.М. за ценные комментарии о работе.

Введение

Бурное развитие технологий приборостроения в последние десятилетия позволило перейти на новый уровень диагностики и хирургического лечения онкологических заболеваний. Многие технологии, ранее казавшиеся недоступными, теперь широко применяются в клиниках всего мира: малоинвазивные операции с использованием роботизированных систем, радиохирurgia, позволяющая удалять опухоли головного мозга без разрезов, и др. Тем не менее, в хирургическом лечении опухолей до сих пор остается потребность в серьезных технологических разработках, в частности, в создании приборов для эффективного решения задачи определения границ опухоли в ходе операции на микроскопическом уровне. В настоящее время установление границ опухоли проводится либо визуально, либо с помощью гистологического исследования методом окрашивания тканей. Такая оценка требует привлечения квалифицированных специалистов и специализированного оборудования [1]. Кроме того, эти методы не позволяют получать информацию о составе ткани в режиме реального времени, что значительно увеличивает продолжительность хирургических вмешательств или долю повторных операций, если постоперационное исследование покажет наличие опухолевых клеток в срезе ткани [2].

В последние годы активно развивается исследовательское направление, посвященное применению различных видов оптической спектроскопии в области диагностики и лечения злокачественных опухолей [3-5]. В частности, применение оптоволоконных технологий позволяет проводить неразрушающий спектральный анализ в режиме реального времени для установления точных границ опухоли в ходе хирургического вмешательства [6]. Использование выносных зондов позволяет проводить исследование непосредственно на пациенте, без взятия образцов тканей. Коммерческая доступность гибких оптоволоконных зондов разного диаметра и длины позволяет интегрировать их в существующие хирургические инструменты в том числе для малоинвазивных операций [7,8]. В работе Амири и др. предпринята успешная попытка интегрировать

оптоволоконный зонд в электрохирургический нож [9], авторы также изучили эффект ухудшения сигнала и изменения морфологии поверхности волокон, вызванные проведением электрохирургии. В работе Биджио и др. были представлены две конструкции оптоволоконного зонда [10]; первый зонд был внедрен в стандартные иглы для биопсии рака молочной железы, а второй был разработан для открытой хирургии молочной железы. Для обеспечения хирургической асептики были также предложены процедуры дезинфекции зондов [11].

Одними из основных характеристик оптоволоконных зондов являются длина кабеля, диаметр зонда, количество волокон и их расположение. Однако, на этапе создания измерительной установки необходимо принять во внимание и требования существующих клинических рекомендаций. Например, при удалении опухоли молочной железы необходимо обеспечить отсутствие злокачественных клеток на расстоянии 2 мм от края резекции [2]. Таким образом, для корректного описания возможностей методики и последующего конструирования прибора необходимо оценить, какое минимальное число злокачественных клеток может быть надежно распознано в ткани по их спектральным сигналам. Это позволит не только дать понимание о пределах применимости методики в клинической практике, но и сравнивать ее с другими разрабатываемыми методиками. Такие эксперименты рекомендуется проводить *in vivo* (на человеке или животных моделях) для получения более реалистичной оценки в условиях, приближенных к реальному использованию методики. Поскольку биологические ткани представляют собой сложные клеточные структуры, использование стандартных образцов или модельных смесей *in vitro* (вне живого организма) для оценки минимального распознаваемого числа клеток затруднено или вовсе не применимо.

Целью данной работы являлась разработка методики оценки минимального числа злокачественных клеток, распознаваемых по их спектрам диффузного отражения, полученным в ближней инфракрасной области (БИК) посредством компактной

спектрометрической аппаратуры. Тестирование методики проведено на животной модели рака яичников.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на пяти здоровых самках мышей линии BALB/c. С кожи спины животных предварительно удаляли шерсть. Перед началом эксперимента каждая мышь получала анестезию. В процессе манипуляций мышам подкожно вводили растворы, содержащие клетки рака яичника. Число клеток в первом растворе было определено методом подсчета в камере Горяева, далее выполняли поэтапное разведение раствора физиологическим раствором (0,9% NaCl). Всего было приготовлено 9 растворов с различным числом клеток (Табл.1). Каждый раствор вводили пять раз в различные точки на спине мыши. На одну особь приходилось по два раствора. В качестве нулевого образца вводился чистый физиологический раствор (0,9% NaCl).

Таблица 1. Содержание клеток рака яичника в инъекционных растворах

Установка для съемки спектров в ближней ИК-области состояла из портативного спектрометра AvaSpec-NIR256-1.7-USB2 (Avantes, Нидерланды), оснащенного гибким оптоволоконным зондом (artphotonics, Германия) диаметром 3 мм и галогеновой лампой в качестве источника света (MobiLight SN LABPOD-1624—1506). В состав спектрометра входили симметричный монохроматор Черни-Тернера и линейный детектор на основе арсенида индия-галлия (256 пикселей). Оптоволоконный зонд состоял из нескольких волокон, передающих излучение от источника к образцу, и центрального волокна, проводящего отраженный свет от поверхности образца к детектору.

Исследуемый спектральный диапазон составил от 938 до 1799 нм с шагом в 4 нм. Спектры были получены в режиме диффузного отражения, поскольку этот режим является подходящим для неоднородной поверхности кожи животного, а также обеспечивает проникновение излучения на толщину около 1-2 мм, что

соответствует толщине подкожной папулы. Подкожная папула – локальное уплотнение небольшого размера, вызванное местным повреждением нижних слоёв кожи в результате инъекции. Один спектр записывался в течение 56 мсек, после чего 9 последовательно сохраненных в памяти программного обеспечения спектров автоматически усреднялись и сохранялись как одно измерение. Время регистрации спектров выбрано посредством функции автоматической оптимизации в программном обеспечении AvaSoft 7.8.

Рисунок 1. А - Общая схема измерительной установки для регистрации спектров в режиме диффузного отражения в ближней инфракрасной области. Б – Схема расположения точек инъекции на спине мыши. На первом этапе спектр регистрировали в точке до инъекции, на втором – после инъекции. Двумя цветами обозначены растворы с разным числом клеток.

Для регистрации спектра сравнения использовали фторопластовый стандартный образец (Spectralon, labsphere, Inc., North Sutton, США), темновой спектр регистрировали при выключенном источнике излучения. Данные спектры далее использовались для вычисления величины поглощения на длине волны λ по формуле (1). Величины поглощения A_λ далее использовались при сохранении спектров, обработке данных и их графическом представлении.

$$A_\lambda = -\log\left(\frac{\text{sample}_\lambda - \text{dark}_\lambda}{\text{reference}_\lambda - \text{dark}_\lambda}\right) \quad (1),$$

где λ – длина волны, A – величина поглощения, *sample* – величина сигнала образца, *dark* – величина сигнала темнового фона, *reference* – величина сигнала стандартного образца.

На первом этапе регистрировали спектр кожи лабораторного животного в месте, намеченном для инъекции. Зонд плотно прижимали к коже и фиксировали вручную. Далее проводили инъекцию раствора и получали спектр папулы, образовавшейся после инъекции (Рис.2). Полученные данные усредняли по пяти повторениям для одного раствора и обрабатывались в программе Origin 2017.

Результаты и обсуждение

На Рис. 2 представлены полученные спектры в ближней ИК-области. Спектры кожи после инъекции усреднены по пяти повторениям для каждого раствора, спектр кожи усреднен по всем спектрам для пяти особей, полученных на первом этапе. Предобработка спектральных данных заключалась в удалении исходной базовой линии путем вычитания из каждого отдельного спектра минимальной величины поглощения в нем. Первый пик при 1200 нм соответствует второму обертому колебаний связи С-Н и может быть ассоциирован с содержанием липидов в клетках. Вторым пиком при 1455 нм, главным образом связанным с содержанием воды, соответствует первому обертому колебанию О-Н, N-H и С-Н [3].

На Рис. 3 представлен разностный спектр кожи мышей после инъекции и до инъекции. Наблюдается последовательное смещение базовой линии в зависимости от числа клеток в инъекции (пик на 1200 нм). Таким образом, в качестве спектральной характеристики, коррелирующей с количеством клеток в инъекционном растворе, была взята величина поглощения на длине волны 1200 нм.

Рисунок 2. БИК-спектры, снятые с подкожной папулы для каждого раствора (усреднение по пяти повторениям) и с кожи до инъекции (показан линией из точек). Штриховой линией показан спектр папулы после инъекции чистого физиологического раствора (0,9% NaCl).

Рисунок 3. Разностные БИК-спектры кожи мышей до и после инъекции (усредненный спектр кожи до инъекции вычитался из усредненных спектров кожи после инъекции для каждого раствора). Штриховой линией отмечена длина волны, равная 1200 нм.

Для изучения корреляции между величиной поглощения на длине волны 1200 нм в разностном спектре и количеством клеток в инъекционном растворе был построен график полулогарифмической зависимости (Рис. 4) и проведена линейная аппроксимация двух его участков методом наименьших квадратов. По графику можно отметить, что корреляция при числе клеток порядка 10^1 - 10^2 выражена слабо (коэффициент корреляции $r^2 = 0,20$, уравнение линейной регрессии, рассчитанное

в Origin – $y = 0,11 - 0,08x$). Начиная с раствора с числом клеток 2500, зависимость величины поглощения на длине волны 1200 нм и $\lg(N)$, где N – число клеток в растворе, приобретает выраженный линейный характер (коэффициент корреляции $r^2 = 0,99$, уравнение линейной регрессии, рассчитанное в Origin – $y = 0,26 - 0,05x$). Таким образом, минимально распознаваемое число злокачественных клеток для используемой измерительной установки оценивается как 3200 (значение получено пересечением двух прямых). Если принять за средние линейные размеры злокачественной клетки 15x15 микрон [12], то в первом приближении минимально распознаваемое число клеток соответствует опухоли площадью 0,7 мм².

Рисунок 4. Зависимость величины поглощения на длине волны 1200 нм от логарифма числа клеток рака яичников, введенных подкожно.

Заключение

В данной работе продемонстрирована методика оценки минимального числа злокачественных клеток, надежно распознаваемых по их спектрам, полученным в ближней инфракрасной области с помощью компактного спектрометра с оптоволоконным зондом. Разработанная методика была продемонстрирована на лабораторных животных *in vivo*. Методика позволяет оценить, обеспечивает ли конкретный прототип спектрометрической аппаратуры достаточную чувствительность для определения границ опухолей в режиме реального времени в ходе операции в соответствии с клиническими рекомендациями.

Список литературы

- [1] Jaafar H. Intra-operative frozen section consultation: concepts, applications and limitations //The Malaysian journal of medical sciences: MJMS. – 2006. – Т. 13. – №. 1. – С. 4.
- [2] Brown J. Q. et al. Optical assessment of tumor resection margins in the breast //IEEE Journal of selected topics in Quantum Electronics. – 2009. – Т. 16. – №. 3. – С. 530-544.

- [3] Kondepati V. R., Heise H. M., Backhaus J. Recent applications of near-infrared spectroscopy in cancer diagnosis and therapy //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2008. – T. 390. – №. 1. – C. 125-139.
- [4] Oleneva E. et al. In vivo and in vitro application of near-infrared fiber optic probe for Ehrlich carcinoma distinction: Towards the development of real-time tumor margins assessment tool //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2019. – T. 213. – C. 12-18.
- [5] Evers D. J. et al. Optical spectroscopy: current advances and future applications in cancer diagnostics and therapy //Future oncology. – 2012. – T. 8. – №. 3. – C. 307-320.
- [6] Mackanos M. A., Contag C. H. Fiber-optic probes enable cancer detection with FTIR spectroscopy //Trends in biotechnology. – 2010. – T. 28. – №. 6. – C. 317-323.
- [7] Canpolat M. et al. Intra-operative brain tumor detection using elastic light single-scattering spectroscopy: a feasibility study //Journal of biomedical optics. – 2009. – T. 14. – №. 5. – C. 054021.
- [8] De Boer L. L. et al. Towards the use of diffuse reflectance spectroscopy for real-time in vivo detection of breast cancer during surgery //Journal of translational medicine. – 2018. – T. 16. – №. 1. – C. 1-14.
- [9] Amiri S. A. et al. Intraoperative tumor margin assessment using diffuse reflectance spectroscopy: the effect of electrosurgery on tissue discrimination using ex vivo animal tissue models //Biomedical Optics Express. – 2020. – T. 11. – №. 5. – C. 2402-2415.
- [10] Bigio I. J. et al. Diagnosis of breast cancer using elastic-scattering spectroscopy: preliminary clinical results //Journal of biomedical optics. – 2000. – T. 5. – №. 2. – C. 221-228.
- [11] Ollesch J. et al. Clinical application of infrared fibre-optic probes for the discrimination of colorectal cancer tissues and cancer grades //Vibrational Spectroscopy. – 2017. – T. 91. – C. 99-110.
- [12] Shashni B. et al. Size-based differentiation of cancer and normal cells by a particle size analyzer assisted by a cell-recognition PC software //Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2018. – T. 41. – №. 4. – C. 487-503.

Таблица 1. Содержание клеток рака яичника в инъекционных растворах

Номер раствора	Число клеток, ед.
1	50000
2	25000
3	12500
4	5000
5	2500
6	500
7	200
8	100
9	50

А



Б

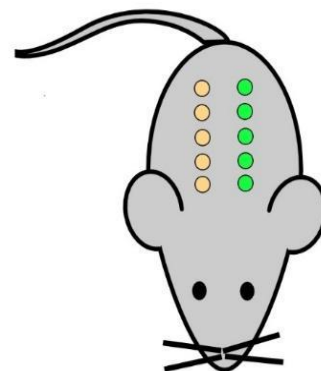


Рисунок 1. А - Общая схема измерительной установки для регистрации спектров в режиме диффузного отражения в ближней инфракрасной области. Б – Схема расположения точек инъекции на спине мыши. На первом этапе спектр регистрировали в точке до инъекции, на втором – после инъекции. Двумя цветами обозначены растворы с разным числом клеток.

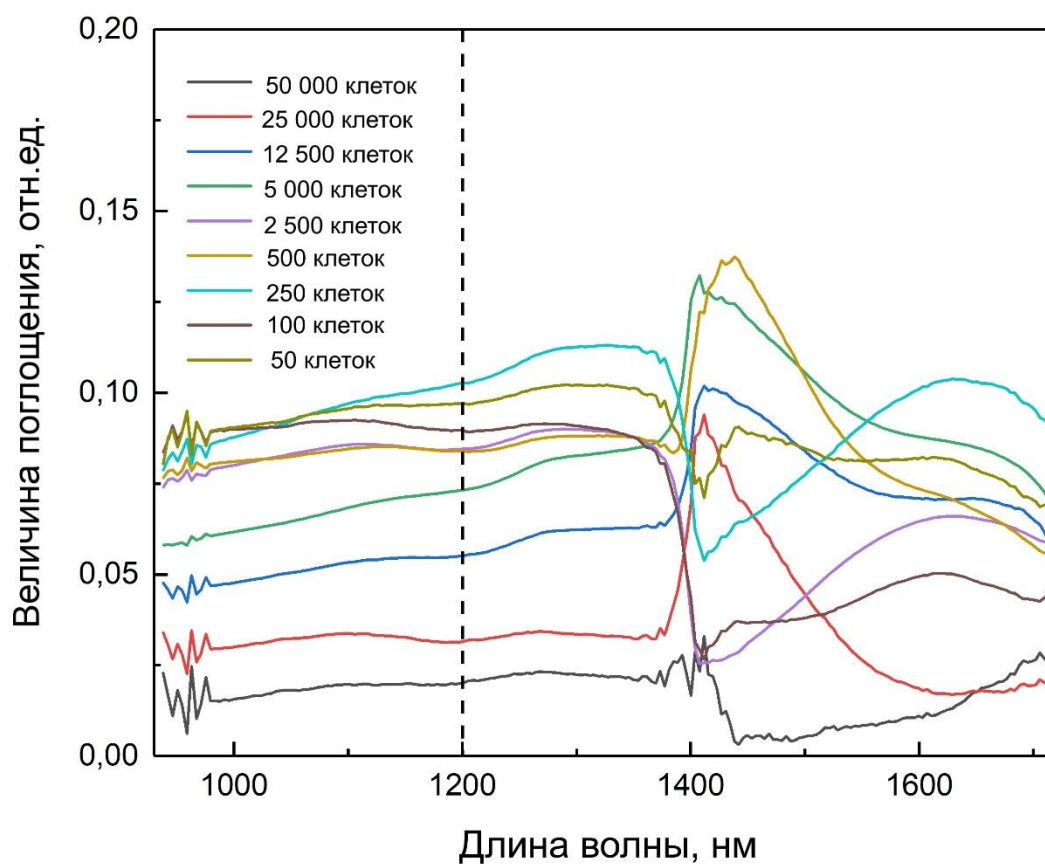


Рисунок 2. БИК-спектры, снятые с подкожной папулы для каждого раствора (усреднение по пяти повторениям) и с кожи до инъекции (показан линией из точек). Штриховой линией показан спектр папулы после инъекции чистого физиологического раствора (0,9% NaCl).

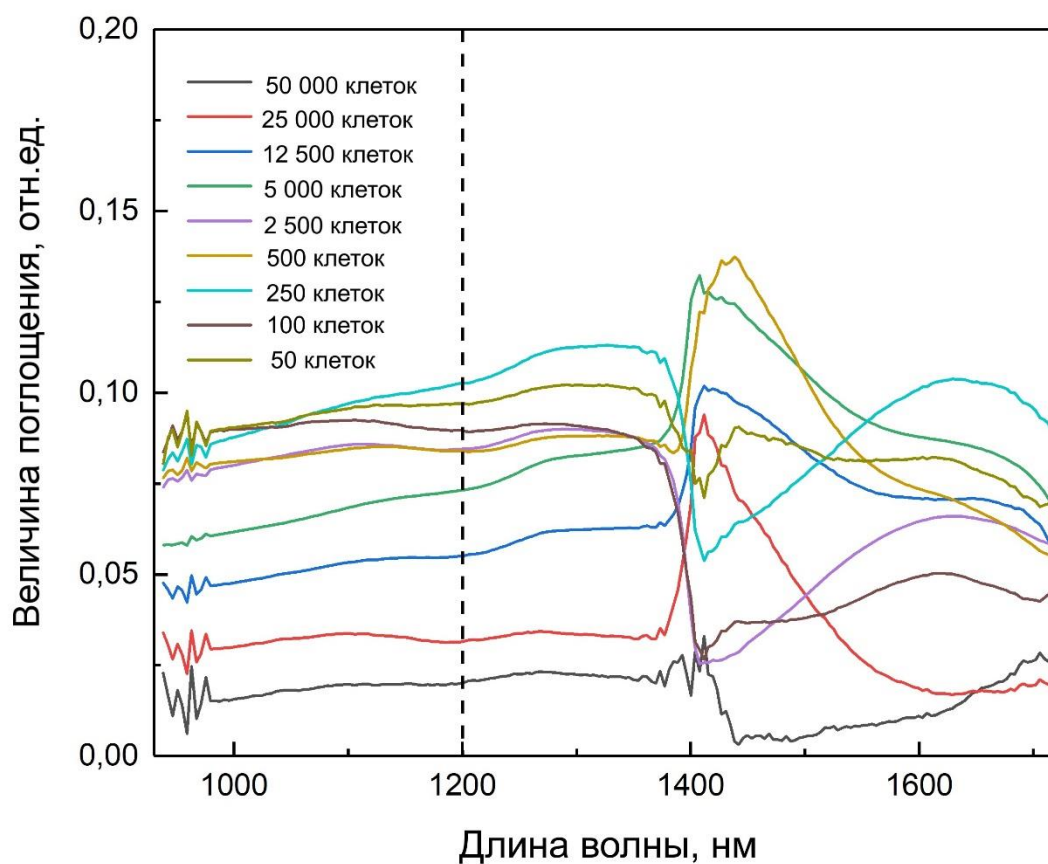


Рисунок 3. Разностные БИК-спектры кожи мышей до и после инъекции (усредненный спектр кожи до инъекции вычитался из усредненных спектров кожи после инъекции для каждого раствора). Штриховой линией отмечена длина волны, равная 1200 нм.

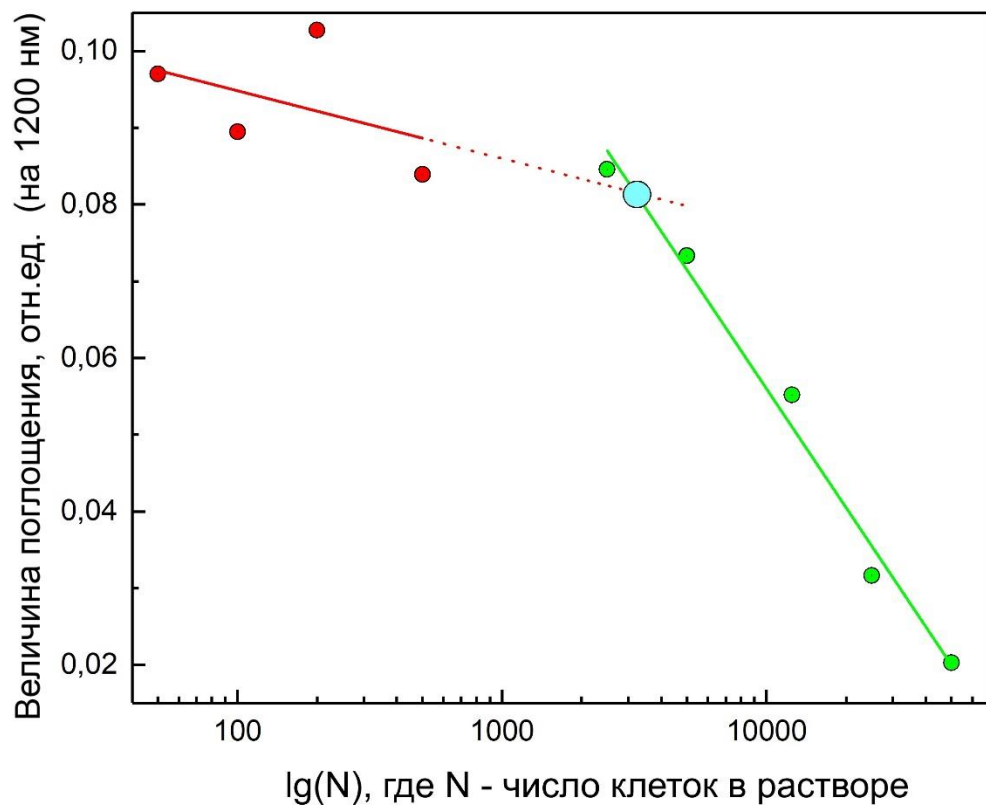


Рисунок 4. Зависимость величины поглощения на длине волны 1200 нм от логарифма числа клеток рака яичников, введенных подкожно.

Estimation of minimally detectable number of cancerous cells by optical spectroscopy with fiber-optic probe

Boichenko Ekaterina Sergeevna, Panchenko Andrey Vladimirovich, Surkova Anastasiia Alekseevna, Kirsanov Dmitry Olegovich

Abstract

The aim of the presented work was a development of a simple method of estimating the minimum number of malignant tumor cells determined using a near-infrared (NIR) spectrometer in diffuse reflectance mode. During the study, a culture of malignant ovarian cancer cells was prepared for subcutaneous injection into laboratory mice, and solutions with different concentrations of such cells were prepared to create a calibration scale. NIR spectra were measured on live laboratory mice under anesthesia at pre-marked points before puncture and after cell culture injection. Spectral characteristics sensitive to changes in the number of cells at the point of measurement (peak intensity, baseline shift) were identified, and the minimum reliably detectable number of malignant cells was estimated from a plot of the dependence of the absorbance intensity value at 1200 nm on the logarithm of the number of cells in the solution.

Keywords

Fiber-optic probe, cancerous cells,, optical spectroscopy, oncology, near-infrared region

Acknowledgements

The research was funded by President's grant # MK-2192.2021.4. Authors would like to thank PhD. Khaydukova M.M. for valuable comments.

Ответственный автор:

ФИО: Бойченко Екатерина Сергеевна

Организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

Адрес организации: Кронверкский пр., 49, Санкт-Петербург, 197101

Ученая степень: -

Ученое звание: -

Должность: инженер-исследователь

Адрес электронной почты: ekaterina.boichenko@inbox.ru

Соавтор:

ФИО: Панченко Андрей Владимирович

Организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт медицинской приматологии"

Адрес организации: К354376, Краснодарский край, г.Сочи, Адлерский р-н, с. Весёлое, ул. Мира, стр.177

Ученая степень: д.м.н.

Ученое звание: -

Должность: главный научный сотрудник

Адрес электронной почты: ando_pan@mail.ru

Соавтор:

ФИО: Суркова Анастасия Алексеевна

Организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет»

Адрес организации: 443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244, Главный корпус

Ученая степень: к.х.н.

Ученое звание: -

Должность: научный сотрудник

Адрес электронной почты: melenteva-anastasija@rambler.ru

Соавтор:

ФИО: Кирсанов Дмитрий Олегович

Организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Адрес организации: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

Ученая степень: д.х.н.

Ученое звание: -

Должность: профессор

Адрес электронной почты: d.kirsanov@gmail.com

Responsible author:

Name: Boichenko Ekaterina Sergeevna

Organization: ITMO University

Address: Kronverksky pr. 49, St. Petersburg, 197101

Academic degree: -

Academic degrees: -

Position: Research Engineer

E-mail address: ekaterina.boichenko@inbox.ru

Co-author:

Name: Panchenko Andrey Vladimirovich

Organization: Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Medical Primatology"

Address of organization: K354376, Krasnodar Region, Sochi, Adler District, Veseloye, Mira Street, 177

Academic degree: Doctor of Medicine.

Academic status: -

Position: Chief Researcher

E-mail address: ando_pan@mail.ru

Co-author:

Name: Surkova Anastasia Alekseevna

Organization: Samara State Technical University

Address of the organization: 443100, Samara, 244 Molodogvardeyskaya St., Main Building

Academic degree: Candidate of Chemical Sciences

Academic status: -

Position: Researcher

E-mail address: melenteva-anastasija@rambler.ru

Co-author:

Name: Kirsanov Dmitriy Olegovich

Organization: Saint-Petersburg State University

Address of organization: 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab. 7-9

Academic degree: Doctor of Chemical Sciences

Academic status: -

Position: Professor

E-mail address: d.kirsanov@gmail.com