

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ

С.В. Козлов¹, В.П. Захаров², А.А. Моряттов¹, О.И. Каганов¹, И.А. Братченко², А.Д. Артемьев²¹ ФГОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России;² ФГОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева»

Для цитирования: Козлов С.В., Захаров В.П., Моряттов А.А., и др. Неинвазивная диагностика новообразований кожи // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 5–6. – С. 146–151. doi: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.146-151

Поступила в редакцию: 23.07.2018

Принята к печати: 07.09.2018

▪ В статье приведены сведения об эпидемиологии меланомы кожи, анализ методов диагностики. Представлен первый опыт применения нового метода диагностики опухолей кожи. Цель исследования — разработать новый метод ранней неинвазивной дифференциальной диагностики новообразований кожи. Проанализированы результаты спектроскопии комбинированного рассеяния (КР) опухолей кожи человека *in vitro* и *in vivo*. Показано, что КР с оригинальным двухэтапным фазовым анализом параметров обладает высокими показателями чувствительности и специфичности. Предложен новый способ ранней диагностики новообразований кожи.

▪ **Ключевые слова:** злокачественные опухоли кожи; рамановская спектроскопия.

NON-INVASIVE TECHNIQUES FOR DIAGNOSTICS OF SKIN NEOPLASMS

S.V. Kozlov¹, V.P. Zaharov², A.A. Morjatov¹, O.I. Kaganov¹, I.A. Bratchenko², A.D. Artemyev²¹ Samara State Medical University;² Samara National Research UniversityFor citation: Kozlov SV, Zaharov VP, Morjatov AA, et al. Non-invasive techniques for diagnostics of skin neoplasms. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhya*. 2018;(5-6):146-151. doi: 10.17816/2072-2354.2018.18.3.146-151

Received: 23.07.2018

Accepted: 07.09.2018

▪ The article presents the data on epidemiology and diagnostic techniques of cutaneous melanoma. New method of skin neoplasms diagnostics is suggested. Objective of the research is to develop a new method of early non-invasive differential diagnostics of skin neoplasms. The results of resonance Raman spectroscopy of human skin neoplasms *in vitro* and *in vivo* are analyzed. The article demonstrates that this method of original two-stage phase analysis of obtained parameters possesses high sensitivity and specificity scores. Conclusions: new technique of early non-invasive skin neoplasms diagnosis is suggested.

▪ **Keywords:** malignant skin tumors; Raman spectroscopy.

Введение

Среди других новообразований злокачественная меланома кожи занимает особое положение. Обладая агрессивными свойствами, она ответственна за более чем 85 % летальности от злокачественных новообразований кожи. Меланома кожи распространена неравномерно, наиболее высокие показатели заболеваемости характерны для Австралии и Новой Зеландии (до 40 случаев 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 полумиллиона новых больных злокачественными новообразованиями, из которых 14 % — злокачественные новообразования кожи. Меланома кожи в России встречается реже, ежегодно заболевает около 8500 человек — 3,97 новых заболеваний на 100 тыс. человек, однако наблюдается высокий уровень ежегодного прироста заболеваемости, от 4,55 до 6,1 % ежегодно за последнее десятилетие [1]. В Самарской области в целом высокие показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями — 446,6 на 100 тыс., при этом одной из особенностей региона является высокий уровень заболеваемости новообразованиями

кожи (19,6 %) — первое место в структуре онкопатологии в 2017 г.

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

Скрининг и диагностика

Меланома кожи — 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 повышенному объему хирургического вмешательства и серьезным косметическим дефектам. Несмотря на существенные успехи, достигнутые в системной лекарственной терапии меланомы кожи, результаты 5-летней выживаемости более всего зависят от своевременной и эффективной диагностики и адекватного объема хирургического лечения. Поэтому актуальным остается поиск методов ранней и уточняющей диагностики меланомы кожи.

Большинство меланом кожи при их визуальном исследовании обладают одним или несколькими характерными признаками — правило ABCDE [6]. Однако использование этого правила не исключает множество субъективных оценок и не имеет достаточной специфичности. В России массовые исследования позволяют выявлять до 15 % новых случаев меланомы кожи. 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, среди которых наиболее распространенным является метод дерматоскопии (эпилюминесцентной микроскопии) [8–10]. Диагностическая точность данного метода составляет 92,2 %, чувствительность — 97,9 % и специфичность — 90,3 %. Ультразвуковое исследование меланомы кожи направлено на определение уровня инвазии и обследование зон регио-

нарного метастазирования [2] с целью определения объема хирургического лечения [7]. Возможным недостатком метода может быть некорректное завышение оценки глубины опухолевой инвазии при развитии ее 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, широкое применение данных методов затруднено по причине того, что реализация их возможна только на базе крупных специализированных центров с участием подготовленных специалистов и при наличии дорогостоящих реактивов. Возможным решением проблемы будет поиск способа повышения эффективности ранней диагностики новообразований кожи путем изучения диагностических возможностей новых оптических методов анализа тканей человека.

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. 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 (Sharmrock SR-303i) с интегрированной цифровой камерой (ANDOR DV-420A-OE) и компьютер. Для выделения комбинационного рассеяния использовался оптический модуль 2, который исключал 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.

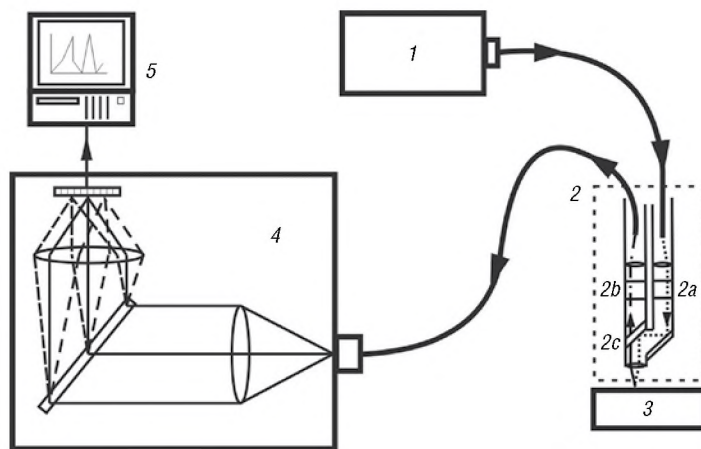


Рис. 1. Схема устройства для оптического анализа кожи: 1 — источник лазерного излучения; 2 — оптический модуль, содержащий последовательно установленный узко- (2a) и широкополосный фильтр (2b), дихроичный рефлектор (2c); 3 — исследуемый образец; 4 — спектрометр, сопряженный с цифровой камерой; 5 — компьютер, оснащенный оригинальным ПО

Fig. 1. Optical scheme of experimental installation: 1 — laser; 2 — optical module containing narrow-band filter (2a), wide-band filter (2b), dichroic reflector (2c); 3 — tested sample; 4 — spectrograph with digit camera; 5 — computer

В качестве объектов исследований были использованы образцы различных новообразований кожи человека, полученные после хирургического лечения в отделениях Самарского областного клинического онкологического диспансера.

Регистрацию спектра КР выполняли, располагая рабочую часть спектрометра (см. рис. 1 — оптический модуль) непосредственно над исследуемой областью на расстоянии 3–4 мм, последовательно проводили регистрацию спектра с патологически измененного участка, затем — 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 спектры комбинационного рассеяния (КР-спектры), полученные при исследовании: меланома — 9 наблюдений, базальноклеточный рак — 8, пигментный невус — 2, другие доброкачественные новообразования — 2. Все пациенты, участвующие в исследовании, старше 18 лет, были предварительно обследованы в Самарском областном клиническом онкологическом диспансере 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).

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

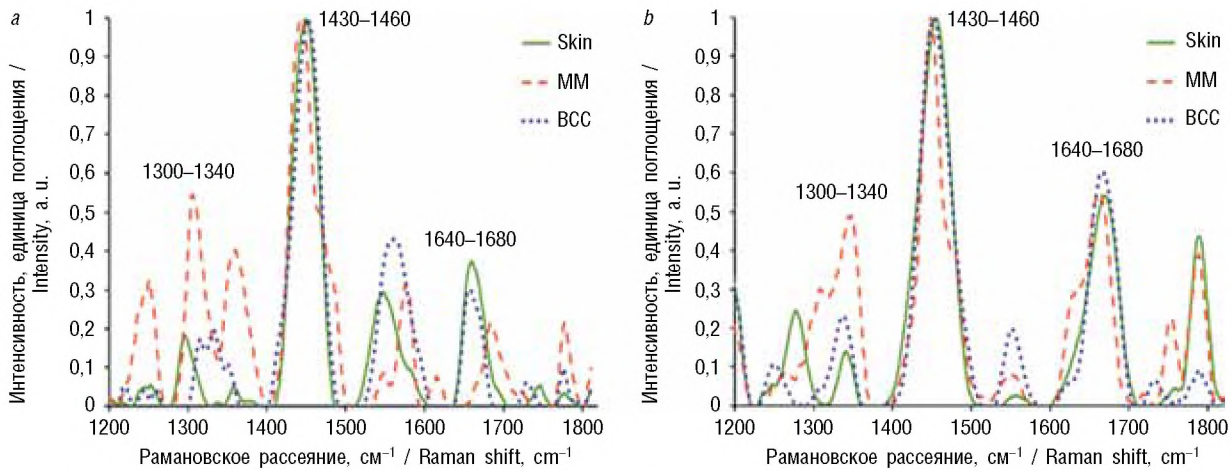


Рис. 2. Нормализованные спектры комбинационного (рамановского) рассеяния, полученные при исследовании образцов нормальной кожи (Skin), меланомы кожи (MM), базальноклеточного рака кожи (BCC) в диапазоне 1200–1800 cm^{-1} : *a* — *ex vivo*; *b* — *in vivo*

Fig. 2. Normalized healthy skin Raman scattering spectra, melanomas (MM) and basal cell cancer (BCC) in the range of 1200–1800 cm^{-1} : *a* — *ex vivo*; *b* — *in vivo*

личий в КР-спектрах исследуемых образцов новообразований 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 злокачественных новообразований кожи и меланомы относительно других новообразований кожи (двухэтапный фазовый метод).

Исходно полученные параметры КР-спектра последовательно анализируют. На первом этапе вводятся две фазовые характеристики: отношение максимумов интенсивности рассеяния I_{1320} в полосе 1300–1340 cm^{-1} и I_{1660} в полосе 1640–1680 cm^{-1} по отношению к интенсивности КР в полосе 1440–1460 cm^{-1} . Тогда каждое измерение может быть представлено в виде точки на фазовой плоскости I_{1320} – I_{1660} (рис. 3, *a* и рис. 4, *a*). При использовании 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 — чувствительности и специфичности метода — для диагностики меланомы *ex vivo* на первом этапе составили 88 и 90 %. При исследованиях *in vivo* чувствительность опреде-

ления меланомы составила 78 %, а специфичность — 90 %. Невысокая чувствительность 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 cm^{-1} в ненормированных КР-спектрах новообразований относительно здоровой ткани. Другими словами, выделялись 3 координаты спектра новообразования (I_{t1320} , I_{t1450} и I_{t1660}) и 3 координаты нормальной ткани (I_{n1320} , I_{n1450} и I_{n1660}), и далее вычислялась разница соответствующих координат по абсолютной величине, нормированной на сумму интенсивностей в конкретной полосе ($\Delta I_{1320} = |I_{t1320} - I_{n1320}| / (I_{t1320} + I_{n1320})$ 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 меланомы кожи.

При введении второго этапа анализа КР-спектров скорректированные предварительные показатели чувствительности и специфичности при исследованиях *ex vivo* составили 88 и 100 % соответственно. Следует отметить,

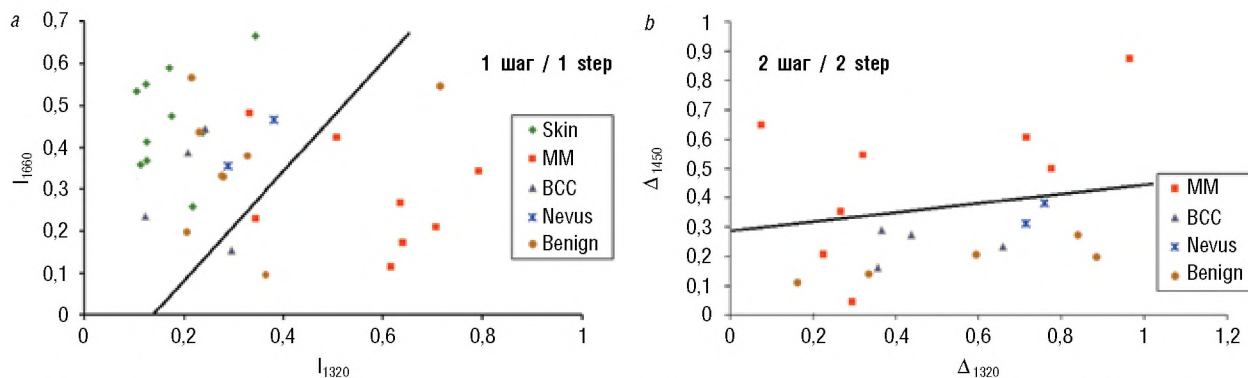


Рис. 3. Классификация (распределение) параметров, полученных при спектроскопии новообразований кожи (меланома кожи (MM), базальноклеточный рак (BCC), пигментный невус (Nevus), доброкачественное образование кожи (Benign), нормальная кожа (Skin)) с применением оригинального двухфазного метода *ex vivo*

Fig. 3. Classification of neoplasms by means of two-step phase method *ex vivo* (skin melanoma (MM), basal cell carcinoma (BCC), benign skin neoplasm (Benign), pigmented naevus (Nevus), skin)

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 меланомы при исследованиях новообразований кожи с использованием абсолютных изменений интенсивностей в полосах 1320 и 1450 cm^{-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 ложноотрицательных 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

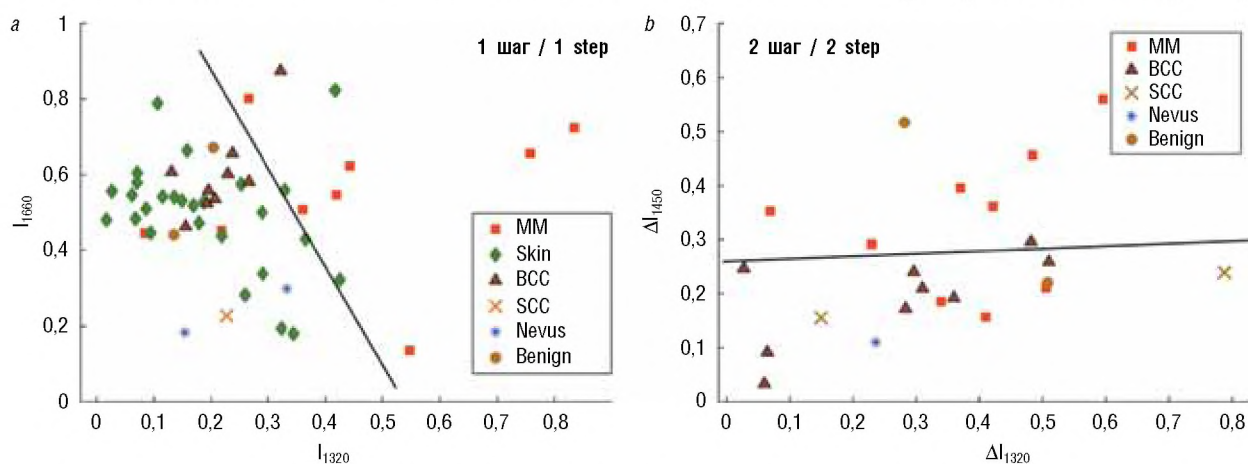


Рис. 4. Классификация (распределение) параметров, полученных при спектроскопии новообразований кожи (меланома кожи (MM), базальноклеточный рак (BCC), плоскоклеточный рак (SCC), пигментный невус (Nevus), доброкачественное образование кожи (Benign), нормальная кожа (Skin)) с применением оригинального двухфазного метода *in vivo*

Fig. 4. Classification of neoplasms by means of two-step phase method *in vivo* (skin melanoma (MM), basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinoma (SCC), pigmented naevus (Nevus), benign skin neoplasm (Benign), skin)

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 %.

Заключение

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 меланомы кожи и других злокачественных новообразований, пигментных и других доброкачественных новообразований кожи. Безопасность и быстрота проведения исследования показывают высокие потенциальные возможности метода: анализ 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.

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Каприн Д.Н., Старинский В.В., Петрова Г.Н. Состояние онкологической помощи в РФ в 2017 г. – М., 2018. [Kaprin DN, Starinskiy VV, Petrova GN. Sostoyaniye onkologicheskoy pomoshchi v RF v 2017 g. Moscow; 2018. (In Russ.)]
2. Патент РФ на изобретение № 2318441/05.09.06. Сидоренко Ю.В., Максимова Н.Ю., Позднякова В.И. Неинвазивная диагностика злокачественной меланомы. [Patent RUS No. 2318441/05.09.06. Sidorenko YV, Maksimova NY, Pozdnyakova VI. Neinvazivnaya diagnostika zlokachestvennoy melanomy. (In Russ.)]

■ Информация об авторах

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

Валерий Павлович Захаров — доктор физико-математических наук, профессор кафедры лазерных и биотехнических систем. E-mail: SSAUVZ@mail.ru.

Александр Александрович Морятков — кандидат медицинских наук, доцент кафедры онкологии. E-mail: ama78@mail.ru.

Олег Игоревич Каганов — доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии. E-mail: okaganov@yandex.ru.

Иван Алексеевич Братченко — кандидат физико-математических наук, доцент кафедры лазерных и биотехнических систем. E-mail: ud_liche@mail.ru.

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

3. GLOBOCAN. 2012 Worldwide Incidence for Melanoma of the Skin-Statistics. 2012.
4. Brochez L, Verhaeghe E, Bleyen L, Naeyaert JM. Diagnostic ability of general practitioners and dermatologists in discriminating pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(6):979-986. doi: 10.1067/mjd.2001.113442.
5. Ермаков А.В. Ранняя диагностика и профилактика меланомы кожи // Онкохирургия. – 2013. – Т. 5. – № 3. – С. 52–58. [Ermakov AV. Early diagnosis and prophylaxis for cutaneous melanoma. *Onkokhirurgiya.* 2013;5(3):52-58. (In Russ.)]
6. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin.* 1985;35(3):130-151. doi: 10.3322/canjclin.35.3.130.
7. Krahn G, Gottlob P, Sander C, Peter RU. Dermatoscopy and high frequency sonography: two useful non-invasive methods to increase preoperative diagnostic accuracy in pigmented skin lesions. *Pigment Cell Res.* 1998;11(3):151-154. doi: 10.1111/j.1600-0749.1998.tb00725.x.
8. Menzies SW, Ingvar C, McCarthy WH. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma. *Melanoma Res.* 1996;6(1):55-62.
9. Rubegni P, Sbrano P, Burrioni M, et al. Melanocytic skin lesions and pregnancy: digital dermoscopy analysis. *Skin Res Technol.* 2007;13(2):143-147. doi: 10.1111/j.1600-0846.2007.00180.x.
10. Сергеев Ю.В., Иванов О.Л., Сергеев А.Ю., Черкасова М.В. Цифровая дерматоскопия в диагностике, лечении и профилактике заболеваний кожи // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2004. – Вып. 1. – С. 23–27. [Sergeyev YV, Ivanov OL, Sergeyev VY, Cherkasova MV. Digital video dermoscopy: new approaches to the diagnosis, treatment, and prevention of skin diseases. *Russian journal of skin and sexually transmitted diseases.* 2004;(1):23-27. (In Russ.)]
11. Lui H, Zhao J, McLean D, Zeng H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Res.* 2012;72(10):2491-2500. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4061.

■ Information about the authors

Sergey V. Kozlov — Doctor of Medicine, Professor, Head of Oncology Department. E-mail: KozlovSV@samaraonko.ru.

Valery P. Zakharov — Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Department of Laser and Bioengineering Systems. E-mail: SSAUVZ@mail.ru.

Alexandr A. Morjatov — Candidate of Medicine, Associate Professor, Oncology Department. E-mail: ama78@mail.ru.

Oleg I. Kaganov — Doctor of Medicine, Professor, Oncology Department. E-mail: okaganov@yandex.ru.

Ivan A. Bratchenko — Candidate of Physics and Mathematics, Assistant Professor, Department of Laser and Bioengineering Systems. E-mail: ud_liche@mail.ru.

Dmitry N. Artemyev — Engineer SIL “Fotonica”, Samara National Research University. E-mail: artemyevdn@gmail.ru.