

Модель кожи для регистрации флуоресценции с пространственным разрешением оптоволоконными системами различной конфигурации

А.А. Шацкая¹, Д.Н. Артемьев¹

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34А, Самара, Россия, 443086

Аннотация. В настоящей работе представлена многокомпонентная шестислойная модель кожи человека, которая симулирует флуоресцентный отклик кожи в разных спектральных диапазонах. Данная модель кожи разработана с учетом характера распространения и сбора излучения оптическими волокнами и поглощающих свойств отдельных слоев кожи. Также в модели кожи учтены основные эндогенные флуорофоры, которые дают наибольший вклад в флуоресцентный спектр ткани. Проведено моделирование регистрации спектра флуоресценции с помощью оптоволоконных зондов методом Монте-Карло, оценена способность оптоволоконных систем различной конфигурации к селективной регистрации флуоресценции от отдельных слоев кожи.

1. Введение

Флуоресцентная спектроскопия обеспечивает эффективную и неинвазивную оптическую диагностику биологических тканей. Многие деструктивно-воспалительные процессы в тканях сопровождаются изменением флуоресцентной активности клеток тканей, которое происходит за счет накопления или уменьшения эндогенных флуорофоров. Нахождение пространственного распределения флуорофоров по объему биоткани имеет большое значение для оценки степени патологических изменений и определения границы патологии биологической ткани [1,2].

Оптическая схема каналов прибора, отвечающих за возбуждение и регистрацию спектрального отклика от объекта, оптические характеристики самого объекта определяют область ткани, с которой регистрируется спектральная информация. То есть оптические характеристики слоев ткани оказывают влияние на характер распространения зондирующего и флуоресцентного излучения в ткани, что задает область среды, в которой генерируется спектральная информация. Прибор определяет пространственное распределение зондирующего излучения на поверхности образца и собирает часть выходящего из ткани потока флуоресценции в зависимости от его оптической конфигурации.

В настоящее время наиболее широкое применение среди устройств флуоресцентной спектроскопии нашли оптоволоконные зонды [3]. Проведенное исследование направлено на анализ способности различных конфигураций оптоволоконных систем к селективной регистрации флуоресцентного отклика кожи, а также на определение эффектов изменения формы спектра эмиссии кожи от вариабельности характеристик и содержания флуорофоров при регистрации оптоволоконными системами различной конфигурации.

Ранее проводились исследования регистрации флуоресценции от биологических тканей с разрешением по глубине с помощью волоконных оптических систем [4-7]. Однако часто ткань представляют в виде однослойной или двухслойной модели с толщиной слоев не менее 300 мкм и анализируют спектры флуоресценции при различных параметрах конструкции зондов [4, 5]. Или напротив, фиксируют модель зонда и проводят исследование влияния вариативности параметров здоровой и патологической ткани на регистрируемый спектр флуоресценции [6, 7]. В настоящей работе мы предлагаем многослойную модель кожи. В предыдущих работах нашей научной группы было проиллюстрировано, как отдельные волокна [8] и оптоволоконные зонды, представленные как совокупность волокон с отличными параметрами конструкции [9], влияют на форму и величину регистрируемого спектра флуоресценции кожи. Однако ввиду многокомпонентности состава кожи и значительном пересечении спектров эмиссии эндогенных флуорофоров, в данных работах было определено только 2 флуорофора, отвечающих за флуоресцентный сигнал с верхних слоев кожи. Следующим этапом исследования являются разработка модели кожи, учитывающей положение и характеристики эндогенных флуорофоров, спектры эмиссии которой на различных длинах волн возбуждения будут соответствовать экспериментальным флуоресцентным спектрам кожи, и анализ возможности регистрации отклика оптоволоконными системами с пространственным разрешением.

Под способностью конфигураций оптоволоконных систем к селективной регистрации спектрального отклика понимается эффект увеличения интенсивности спектрального сигнала с определенного слоя ткани, обусловленный заданными параметрами конфигурации оптоволоконной системы. Это позволяет увеличить отношение сигнал/шум для необходимого слоя кожи, что повышает чувствительность системы к количественному изменению флуорофоров, содержащихся в данном слое.

2. Материалы и методы

Для численного моделирования распространения излучения в системе, состоящей из оптоволоконного зонда и кожи, использовался метод Монте-Карло, реализованный в программном обеспечении TracePro Expert - 6.0.2, Lambda Research Corporation. В настоящее время это один из наиболее часто используемых методов описания распространения света в биологических тканях [10]. В программной среде TracePro моделирование спектров флуоресценции осуществляется в два этапа. Сначала проводится трассировка возбуждающего излучения, в местах поглощения флуорофором генерируется источник флуоресценции. На следующем этапе проводится трассировка флуоресцентного излучения от рассчитанных источников флуоресценции. При получении спектров эмиссии новой модели кожи, приближенной к реальной ткани, производилось трассировка более 1 млн флуоресцентных фотонов.

Основные зависимости, которые выполняются при трассировке лучей в модели: закон Бугера—Ламберта—Бера, описывающий поглощение в биологической ткани; закон Френеля для учета преломления и отражения на границе раздела двух сред; функция Хени—Гринштейна в качестве фазовой функции рассеяния [10]. Коэффициент поглощения флуорофора в модели ткани определяется как:

$$\mu_a = ab(\lambda) \cdot K_{peak} \cdot C_{molar},$$

где $ab(\lambda)$ – относительное поглощение флуорофора, K_{peak} – коэффициент молярной экстинкции, C_{molar} – молярная концентрация флуорофора в объеме слоя ткани.

2.1 Описание модели кожи

Кожа человека является многократно рассеивающей, поглощающей средой. Присутствие большого числа эндогенных флуорофоров с перекрывающимися спектрами возбуждения и эмиссии делает затруднительным оценку величины вклада отдельного флуорофора в результирующий спектр кожи.

В работе [11] приведен обзор литературы и выявлены эндогенные флуорофоры кожи, вносящие наибольший вклад в результирующий спектр эмиссии в трех спектральных диапазонах. Оптическая схема предлагаемой модели обеспечивала возбуждение всех слоев кожи с флуоресцентными свойствами, а поверхность детектора площадью $1,27 \text{ см}^2$ захватывала значительную часть рассеянного излучения от модели кожи. Напротив, оптоволоконные зонды характеризуются малым поперечным сечением, что приводит к снижению уровня регистрируемого спектрального сигнала и к уменьшению детектируемой глубины ткани. Также интенсивность возбуждающего излучения уменьшается экспоненциально, по мере проникновения излучения в ткань [8]. И наконец, отдельные слои кожи, содержащие кровеносные сосуды, характеризуются наличием сильных поглотителей света видимого диапазона спектра – дезоксигемоглобина и оксигемоглобина. Это низкофлуоресцентные хромофоры, которые из-за их высокой концентрации поглощают флуоресцентный сигнал, излучаемый другими флуорофорами. С учетом данных фактов, была разработана многослойная модель кожи, положение эндогенных флуорофоров по слоям ткани указаны в таблице 1.

Поперечные размеры модели кожи составляют $40 \text{ мм} \times 40 \text{ мм}$. Оптические свойства такие, как коэффициенты поглощения и рассеяния, анизотропия и показатели преломления, для каждого слоя кожи были взяты из работы В.В. Тучина [12]. Флуоресцентные свойства компонент кожи выбраны на основе обзора литературы, приведенном в работе [11].

Таблица 1. Локализация эндогенных флуорофоров в шестислойной модели здоровой кожи человека, участвующих в моделировании.

Слой кожи	Толщина слоя, мкм	Содержание флуорофоров и поглотителей
Роговой слой	10	-
Эпидермис	100	Меланин Тирозин Эластин FAD NADH
Папиллярная дерма	200	Коллаген Протопорфирин IX Липофусцин Триптофан
Поверхностное сплетение микрососудов	100	Гемоглобин
Ретикулярная дерма	600	Коллаген Протопорфирин IX Липофусцин Триптофан
Глубокое сплетение сосудов	200	Гемоглобин

2.2 Описание моделей оптоволоконного зонда

В процессе работы было смоделировано несколько типов оптоволоконных зондов, поперечные сечения нескольких упаковок волокон представлены на рисунке 1. Они располагались вплотную к ткани и не имели никаких посредников между волокнами и тканью. В каждом варианте волокна представляют собой цилиндры кварца с числовой апертурой $NA=0.22$. При разработке моделей волоконных зондов использовалась шестиугольная упаковка, поскольку она обеспечивает минимальную площадь неактивной области [3].

3. Результаты и обсуждение

В качестве выходных данных моделирования рассматривался флуоресцентный спектр модели кожи, регистрируемый детектором. На рисунке 2 представлено сравнение спектров эмиссии кожи при возбуждении лазерным излучением длиной волны 405 нм , полученные в

эксперименте [13] и в моделируемой оптической системе с ортогональным положением источником излучения и детектором с площадью сечения $S=1,27 \text{ см}^2$ [11].

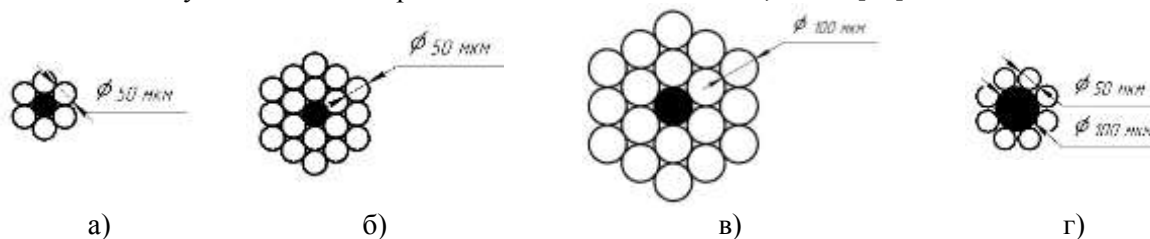


Рисунок 1. Поперечные сечения моделей оптоволоконных зондов. Черным цветом обозначены волокна, доставляющие возбуждающее излучение в ткань.

Наибольший вклад в результирующий спектр эмиссии кожи при возбуждении на длине волны 405 нм вносят протопорфирин IX, липофусцин, меланин и FAD. Оптической системы с ортогональным положением источником излучения и детектором большой площадью сечения захватывает сигнал со всех слоев кожи. Максимум эмиссии в спектре модели кожи (рисунок 2) на длине волны 525 нм соответствует максимумам эмиссии меланина и FAD. Локальный максимум на длине волны 625 нм соответствует максимуму эмиссии протопорфирина IX. Липофусцин характеризуется широким спектром излучения в диапазоне 500-700 нм с максимумом эмиссии на длине волны 575 нм. Изменение области ткани, содержащей липофусцин, информация с которой регистрируется детектором, ведет к изменению уровня всей кривой спектра эмиссии кожи в данном спектральном диапазоне.

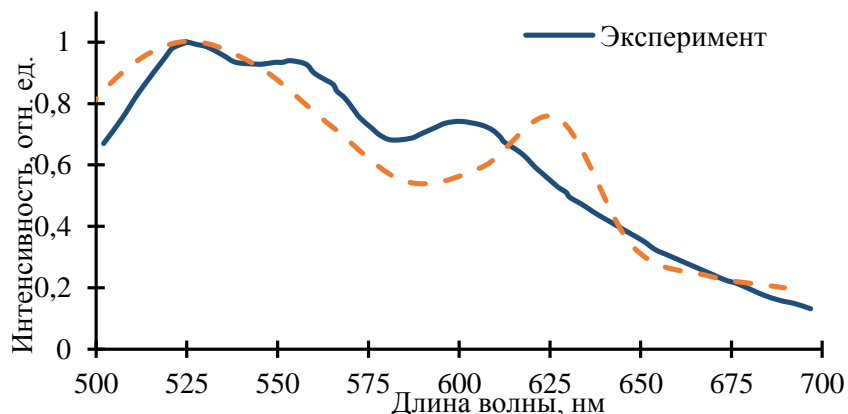


Рисунок 2. Нормированные спектры флуоресценции кожи при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 405 нм, полученные экспериментальным путем [13] и от модели кожи при ортогональном положении источника излучения и детектора с площадью сечения $S=1,27 \text{ см}^2$.

На рисунке 3 показаны результаты моделирования регистрации флуоресценции кожи с помощью оптоволоконных зондов. Согласно работе [9] оптоволоконные зонды с сечениями на рисунке 1 а, б, г обеспечивают сбор спектрального отклика преимущественно с эпидермиса, следовательно при сохранении всех параметров модели кожи вклад протопорфирина IX относительно других флуорофоров снижается, и в спектре флуоресценции модели кожи локальный максимум на длине волны 625 нм отсутствует (рисунок 3). Только применение оптоволоконного зонда (рисунок 1в) с общей площадью поперечного сечения собирающих волокон $S_f=1,413 \times 10^{-3} \text{ см}^2$ достаточно для проявления сигнала с глубины 210-310 мкм (нижний подслой папиллярной дермы, место локализации протопорфирина IX) в конечном регистрируемой спектре эмиссии ткани.

Аналогичным образом были проанализированы влияние других конфигураций оптоволоконных зондов на форму флуоресцентного спектра кожи в других спектральных

диапазонах. Выявлены основные параметры оптоволоконной системы, обеспечивающие селективную регистрацию флуоресцентного отклика кожи с учетом большого количества эндогенных флуорофоров и их пространственной локализации в ткани.

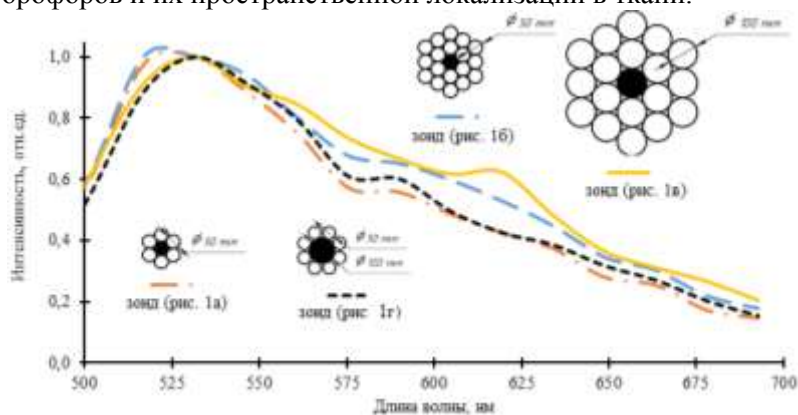


Рисунок 3. Нормированные спектры флуоресценции модели кожи при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 405 нм, зарегистрированные с помощью оптоволоконных зондов различной конфигурации.

4. Заключение

Разработана модель кожи с учетом пространственной локализации и оптических характеристик эндогенных флуорофоров, и проведено численное моделирование флуоресценции кожи в разных спектральных диапазонах с различными оптическими схемами устройств регистрации. На основании проведенной работы можно предположить, что специально подобранная оптическая система (конфигурация оптоволоконного зонда) может увеличивать интенсивность излучения с определенного слоя ткани, что поможет определить вклад каждого слоя в общий спектр ткани. Результаты моделирования могут служить ориентиром при разработке оптических конфигураций зондов, направленной на повышение эффективности регистрации спектрального отклика от кожи с пространственным разрешением.

5. Благодарности

Работа выполнена при поддержке совместной программы РФФИ и Болгарского научного фонда № 19-52-18001 Болг_а и № КР06-Russia/19/28.09.2019 «Мультивариативная Рамановская и флуоресцентная диагностика кожных новообразований».

6. Литература

- [1] Borisova, E. Multispectral autofluorescence detection of skin neoplasia using steady-state techniques / E. Borisova, A. Gisbrecht, T. Genova-Hristova, P. Troyanova, E. Pavlova, N. Penkov, I. Bratchenko, V. Zakharov, I. Lihachova, I. Kuzmina; J. Spigulis // 20th International Conference and School on Quantum Electronics: Laser Physics and Applications. – International Society for Optics and Photonics. – 2019. – Vol. 11047. – P. 1104704.
- [2] Братченко, И.А. Гиперспектральная визуализация патологий кожи в видимой области / И.А. Братченко, М.В. Алонова, О.О. Мякинин, А.А. Морятов, С.В. Козлов, В.П. Захаров // Компьютерная оптика. – 2016. – Т. 40, № 2. – С. 240-248. DOI: 10.18287/2412-6179-2016-40-2-240-248.
- [3] Utzinger, U. Fiber optic probes for biomedical optical spectroscopy / U. Utzinger, R.R. Richards-Kortum // Journal of Biomedical Optics. – 2003. – Vol. 8(1). – P. 121-147.
- [4] Zhu, C. Effect of fiber optic probe geometry on depth-resolved fluorescence measurements from epithelial tissues: a Monte Carlo simulation / C. Zhu, Q. Liu, N. Ramanujam // Journal of Biomedical Optics. – 2003. – Vol. 8(2). – P. 237-248.
- [5] Pfefer, J. Oblique-incidence illumination and collection for depth-selective fluorescence spectroscopy / J. Pfefer, A. Agrawal, R.A. Drezek // Journal of biomedical optics. – 2005. – Vol. 10(4). – P. 044016.

- [6] Schwarz, R.A. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy of oral epithelial tissue using a depth-sensitive fiber-optic probe / R.A. Schwarz, W. Gao, D. Daye, M.D. Williams, R. Richards-Kortum, A.M. Gillenwater // *Applied optics*. – 2008. – Vol. 47(6). – P. 825-834.
- [7] Pavlova, I. Monte Carlo model to describe depth selective fluorescence spectra of epithelial tissue: applications for diagnosis of oral precancer / I. Pavlova, C.E.R. Weber, R.A. Schwarz, M.D. Williams, A.K. El-Naggar, A.M. Gillenwater, R.R. Richards-Kortum // *Journal of biomedical optics*. – 2008. – Vol. 13(6) – P. 064012.
- [8] Шацкая, А.А. Математическое моделирование волоконных оптических систем для эффективной регистрации флуоресценции кожи / А.А. Шацкая, Д.Н. Артемьев, И.А. Братченко // *Сборник трудов XVI Всероссийского молодежного Самарского конкурса – конференции научных работ по оптике и лазерной физике – Москва, 2018. – С. 425-433.*
- [9] Шацкая, А.А. Моделирование волоконных оптических зондов для селективной регистрации флуоресценции от многослойных биотканей / А.А. Шацкая, Д.Н. Артемьев, И.А. Братченко // *Журнал прикладной спектроскопии*. – 2020. – Т. 87, № 1. – С. 130-139.
- [10] Dremin, V.V. How the melanin concentration in the skin affects the fluorescence-spectroscopy signal formation / V.V. Dremin, A.V. Dunaev // *Journal of Optical Technology*. – 2016. – Vol. 83(1). – P. 43-48.
- [11] Ustinova, A.O. Monte Carlo simulation of skin multispectral autofluorescence / A.O. Ustinova, I.A. Bratchenko, D.N. Artemyev // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2019. – Vol. 5(2) – P. 020306.
- [12] Тучин, В.В. Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике – М.: Физматлит, 2013. – 812 с.
- [13] Borisova, E. Optical Biopsy of Human Skin – A Tool for Cutaneous Tumours Diagnosis / E. Borisova, P. Pavlova, E. Pavlova, P. Troyanova, L. Avramov // *International Journal Bioautomation*. – 2012. – Vol. 16(1). – P. 53-72.

Human skin model for spatially-resolved fluorescence registration using different fiber optic system configuration

A.A. Shatskaya¹, D.N. Artemyev¹

¹Samara National Research University, Moskovskoe Shosse 34A, Samara, Russia, 443086

Abstract. This work presents a multicomponent six-layer model of human skin to simulate the skin fluorescence response in different spectral ranges. The skin model was developed considering the features of the propagation and collection of radiation by optical fibers and the absorbing properties of individual skin layers. The skin model also contained the main endogenous fluorophores, which make the largest contribution to the fluorescence spectrum. Monte Carlo simulation of fluorescence signal registration using fiber optic probes was carried out, and the ability of different fiber optic systems configurations to selectively register fluorescence from certain skin layers was evaluated.