

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОМЕТРА С ОПТОВОЛОКОННЫМ ЗОНДОМ
ДЛЯ ОЦЕНКИ МИНИМАЛЬНОГО ЧИСЛА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК
ПО СПЕКТРАМ ДИФФУЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ В БЛИЖНЕЙ ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ

Е. С. Бойченко^{1*}, А. В. Панченко², А. А. Суркова³, Д. О. Кирсанов⁴

¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия
*ekaterina.boichenko@inbox.ru

² Научно-исследовательский институт медицинской приматологии,
Краснодарский край, Сочи, Россия

³ Самарский государственный технический университет, Самара, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Цель исследования — 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 подготовлена культура клеток рака яичников для подкожного введения лабораторным мышам, для создания калибровочной шкалы приготовлены растворы с различной концентрацией таких клеток. Измерение БИК-спектров проводилось на живых лабораторных мышах (в заранее отмеченных точках) под анестезией до прокола и после введения клеточной культуры. 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. М. М. Хайдукову за ценные комментарии о работе.

Ссылка для цитирования: Бойченко Е. С., Панченко А. В., Суркова А. А., Кирсанов Д. О. Применение спектрометра с оптоволоконным зондом для оценки минимального числа злокачественных клеток по спектрам диффузного отражения в ближней инфракрасной области // Изв. вузов. Приборостроение. 2023. Т. 66, № 2. С. 148—154. DOI: 10.17586/0021-3454-2023-66-2-148-154.

USE OF A FIBER OPTIC SPECTROMETER TO ASSESS THE MINIMUM NUMBER OF MALIGNANT CELLS
BY DIFFUSE REFLECTANCE SPECTRA IN THE NEAR INFRARED REGION

E. S. Boichenko^{1*}, A. V. Panchenko², A. A. Surkova³, D. O. Kirsanov⁴

¹ ITMO University, St. Petersburg, Russia
*ekaterina.boichenko@inbox.ru

² Research Institute of Medical Primatology,
Krasnodar Region, Sochi, Russia

³ Samara State Technical University, Samara, Russia

⁴ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Abstract. The aim of the study was to develop a technique for assessing the minimum number of malignant cells recognizable by their diffuse reflectance spectra obtained in the near infrared region (NIR) using compact spectrometric

equipment. In the course of the study, a culture of ovarian cancer cells was prepared for subcutaneous injection into laboratory mice; solutions with various concentrations of such cells were prepared to create a calibration scale. Measurement of NIR spectra was carried out on live laboratory mice (at pre-marked points) under anesthesia before puncture and after the introduction of cell culture. Spectral characteristics that are sensitive to changes in the number of cells at the measurement point (peak intensity, baseline shift) have been identified, and the minimum reliably recognizable number of malignant tumor cells has been estimated from the graph of the dependence of the absorption value at a wavelength of 1200 nm on the logarithm of the number of cells in solution.

Keywords: fiber optic probe, optical spectroscopy, malignant cells, oncology, near infrared region

Acknowledgments: The study was supported by a grant from the President of the Russian Federation No. MK-2192.2021.4. The authors thank PhD M. M. Khaidukova for valuable comments on the work.

For citation: Boichenko E. S., Panchenko A. V., Surkova A. A., Kirsanov D. O. Use of a fiber optic spectrometer to assess the minimum number of malignant cells by diffuse reflectance spectra in the near infrared region. *Journal of Instrument Engineering*. 2023. Vol. 66, N 2. P. 148—154 (in Russian). DOI: 10.17586/0021-3454-2023-66-2-148-154.

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, для хирургического лечения опухолей до сих пор требуются серьезные технологические разработки, в частности, приборы для эффективного определения границ опухоли в ходе операции на микроскопическом уровне. В настоящее время границы опухоли устанавливаются либо визуально, либо с помощью гистологического исследования методом окрашивания тканей. Такая оценка требует привлечения квалифицированных специалистов и использования соответствующего оборудования [1]. Кроме того, эти методы не позволяют получать информацию о составе ткани в режиме реального времени, что значительно увеличивает продолжительность хирургического вмешательства 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 непосредственно во время хирургического вмешательства проводить неразрушающий спектральный анализ для установления точных границ опухоли [6]. Использование выносных зондов дает возможность 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. [9] предпринята успешная попытка интегрировать оптоволоконный зонд в электрохирургический нож, авторы также изучили эффект ухудшения сигнала и изменения морфологии поверхности волокон, вызванный 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 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 существующие клинические рекомендации. 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 неприменимо.

Целью настоящей работы являлось создание методики оценки минимального числа опухолевых 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 девять растворов с различным числом клеток (см. таблицу). 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).

**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

Установка для получения спектров в БИК-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.

На рис. 1, *а* представлена схема измерительной установки для регистрации спектров в режиме диффузного отражения в БИК; *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).

Изучаемый спектральный диапазон составил от 938 до 1799 нм при шаге в 4 нм. Спектры были получены в режиме диффузного отражения: этот режим подходит для неоднородной поверхности кожи животного, а также обеспечивает проникновение излучения на глубину около 1—2 мм, что соответствует толщине подкожной папулы (локальное уплотнение небольшого размера, вызванное местным повреждением нижних слоев кожи в результате

инъекции). Один спектр записывался в течение 56 мс, после чего девять последовательно сохраненных в памяти программного обеспечения спектров автоматически усреднялись и сохранялись как результат одного измерения. Время регистрации спектров выбрано посредством функции автоматической оптимизации в программном обеспечении AvaSoft 7.8.

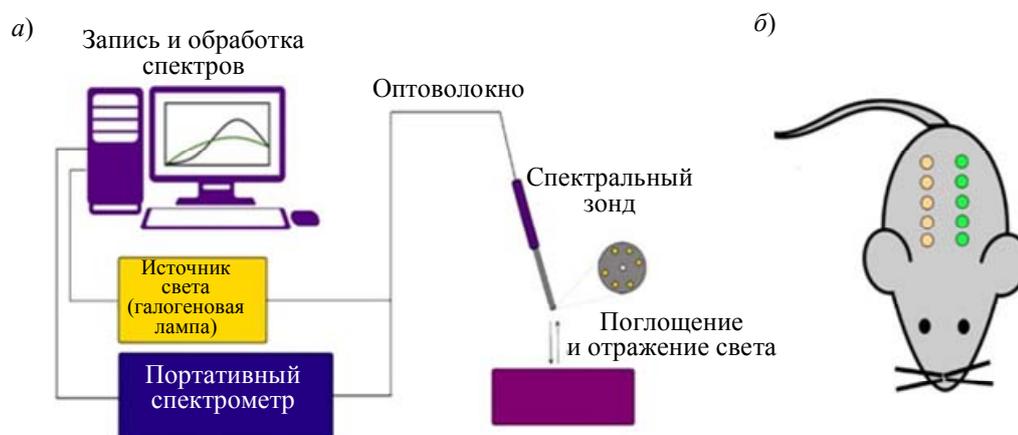


Рис. 1

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 A на длине волны λ по формуле:

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

где sample — величина сигнала образца, dark — темнового фона, reference — стандартная величина сигнала. Величины поглощения A_{λ} далее использовались при сохранении спектров, обработке данных и их графическом представлении.

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. Полученные данные усредняли по пяти повторениям для одного раствора и обрабатывали в программе Origin 2017.

Результаты и обсуждение. На рис. 2 представлены разностные БИК-спектры кожи мышей до и после инъекции (усредненный спектр кожи до инъекции вычитался из усредненных спектров кожи после инъекции для каждого раствора). Пунктиром показан спектр папулы после инъекции чистого физиологического раствора (0,9% NaCl). 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 обертону колебаний связи С-Н и может быть ассоциирован с содержанием липидов в клетках. Второй пик при 1455 нм, главным образом связанный с содержанием воды, соответствует первому обертону колебаний О-Н, N-Н и С-Н [3].

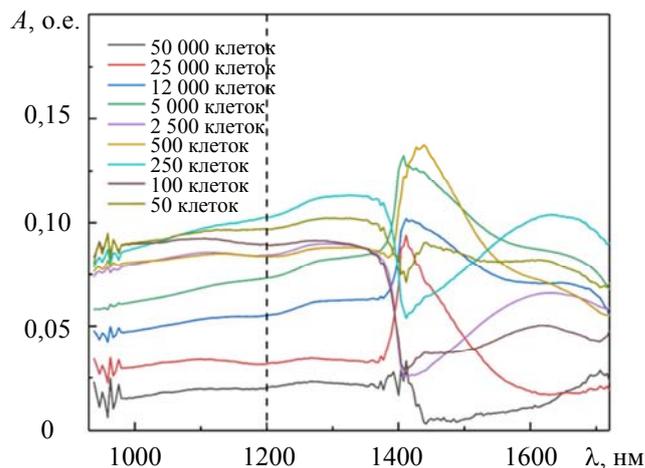


Рис. 2

Для изучения корреляции между величиной поглощения на длине волны 1200 нм в разностном спектре и числом клеток в инъекционном растворе был построен график полулогарифмической зависимости (рис. 3) 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 опухолевых клеток для используемой измерительной установки оценивается как 3200 (значение получено пересечением двух прямых). Если принять за средние линейные размеры опухолевой клетки 15×15 мкм [12], то в первом приближении минимально распознаваемое число клеток соответствует опухоли площадью $0,7 \text{ мм}^2$.

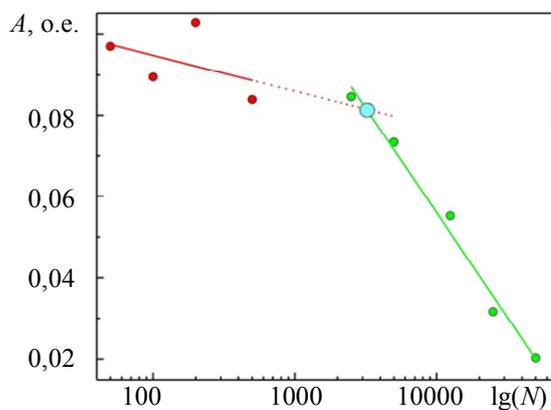


Рис. 3

Заключение. В настоящей работе продемонстрирована методика оценки минимального числа опухолевых клеток, надежно распознаваемых по их спектрам, полученным в ближней инфракрасной области с помощью компактного спектрометра с оптоволоконным зондом. Использование разработанной методики продемонстрировано на лабораторных животных *in vivo*.

Методика в режиме реального времени позволяет для конкретного прототипа спектрометрической аппаратуры оценить обеспечение чувствительности, достаточной для определения границ опухолей в ходе операции согласно клиническим рекомендациям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jaafar H.* Intra-operative frozen section consultation: concepts, applications and limitations // *The Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2006. Vol. 13, N 1. P. 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. Vol. 16, N 3. P. 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. Vol. 390, N 1. P. 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. Vol. 213. P. 12—18.
5. *Evers D. J.* et al. Optical spectroscopy: current advances and future applications in cancer diagnostics and therapy // *Future Oncology*. 2012. Vol. 8, N 3. P. 307—320.
6. *Mackanos M. A., Contag C. H.* Fiber-optic probes enable cancer detection with FTIR spectroscopy // *Trends in Biotechnology*. 2010. Vol. 28, N 6. P. 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. Vol. 14, N 5. P. 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. Vol. 16, N 1. P. 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. Vol. 11, N 5. P. 2402—2415.
10. *Bigio I. J.* et al. Diagnosis of breast cancer using elastic-scattering spectroscopy: preliminary clinical results // *Journal of Biomedical Optics*. 2000. Vol. 5, N 2. P. 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. Vol. 91. P. 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. Vol. 41, N 4. P. 487—503.

Сведения об авторах

- Екатерина Сергеевна Бойченко** — Университет ИТМО; инженер-исследователь;
E-mail: ekaterina.boichenko@inbox.ru
- Андрей Владимирович Панченко** — д-р мед. наук; Научно-исследовательский институт медицинской приматологии; главный научный сотрудник;
E-mail: ando_ran@mail.ru
- Анастасия Алексеевна Суркова** — канд. хим. наук; Самарский государственный технический университет; научный сотрудник; E-mail: melenteva-anastasija@rambler.ru
- Дмитрий Олегович Кирсанов** — д-р хим. наук, профессор; Санкт-Петербургский государственный университет; E-mail: d.kirsanov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.08.22; одобрена после рецензирования 21.11.22; принята к публикации 27.12.22.

REFERENCES

1. Jaafar H. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 2006, no. 1(13), pp. 4.
2. Brown J.Q. et al. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2009, no. 3(16), pp. 530–544.
3. Kondepoti V.R., Heise H.M., Backhaus J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, no. 1(390), pp. 125–139.
4. Oleneva E. et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, vol. 213, pp. 12–18.
5. Evers D.J. et al. *Future Oncology*, 2012, no. 3(8), pp. 307–320.
6. Mackanos M.A., Contag C.H. *Trends in Biotechnology*, 2010, no. 6(28), pp. 317–323.
7. Canpolat M. et al. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, no. 5(14), pp. 054021.
8. De Boer L.L. et al. *Journal of Translational Medicine*, 2018, no. 1(16), pp. 1–14.
9. Amiri S.A. et al. *Biomedical Optics Express*, 2020, no. 5(11), pp. 2402–2415.
10. Bigio I.J. et al. *Journal of Biomedical Optics*, 2000, no. 2(5), pp. 221–228.
11. Ollesch J. et al. *Vibrational Spectroscopy*, 2017, vol. 91, pp. 99–110.
12. Shashni B. et al. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2018, no. 4(41), pp. 487–503.

Data on authors

- Ekaterina S. Boichenko** — ITMO University; Research Engineer; E-mail: ekaterina.boichenko@inbox.ru
Andrey V. Panchenko — Dr. Sci.; Research Institute of Medical Primatology; Chief Researcher;
E-mail: ando_pan@mail.ru
Anastasia A. Surkova — PhD; Samara State Technical University; Researcher;
E-mail: melenteva-anastasija@rambler.ru
Dmitry O. Kirsanov — Dr. Sci., Professor; St. Petersburg State University;
E-mail: d.kirsanov@gmail.com

Received 30.08.22; approved after reviewing 21.11.22; accepted for publication 27.12.22.