Оптическая когерентная томография и поляриметрический анализ поверхностных биопсий кожи

С.Р. Утц[1], Д.А. Зимняков[2], Е.М. Галкина[1], Е.М. Решетникова[1]

[1] ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России
410012, Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

[2] Саратовский государственный технический университет им. Ю.А. Гагарина
410054, Саратов, ул. Политехническая, 77

Цель исследования. Разработка и оценка эффективности поляризационного зондирования биотканей *in vitro*. Метод основан на определении параметров поляризации рассеянного излучения.
Материал и методы. Использовали общепризнанный метод поверхностных отрывов эпидермиса с помощью медицинского аутостерильного клея «Сульфакрилат», небольшие порции которого тонким слоем наносились на предметное стекло, а затем на различные участки кожного покрова. Роговой слой в норме и при кожных заболеваниях (псориаз, красный плоский лишай, дискоидная красная волчанка, алопеция, чесотка, демодекоз) изучали с помощью методики оптической когерентной томографии на аппарате OCT OCS1300SS (производство Thorlabs Inc, США).
Результаты. Приведены картины, визуализирующие структурную организацию различных слоев эпидермиса, полученных с помощью методики поверхностной биопсии эпидермиса при красном плоском лишае, гиперкератозе, чесотке и других кожных заболеваниях.
Заключение. Данная методика позволяет проводить неинвазивные высокоточные измерения структуры различных слоев эпидермиса, что может оказаться полезным как для научных исследований, так и для практической дерматологии.

Ключевые слова: **поверхностная биопсия кожи, оптическая когерентная томография, поляризация, структура эпидермиса, дерматозы.**

Контактная информация: kalinina13@mail.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2015; (1): 85—91.

Optical coherence tomography and polarimetry of superficial skin biopsies

S.R. Utz[1], D.A. Zimnyakov[2], E.M. Galkina[1], E.M. Reshetnikova[1]

[1] Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky
Bolshaya Kazachiya str., 112, Saratov, 410012, Russia

[2] Yuri Gagarin State Technical University of Saratov
Politechnicheskaya str., 77, Saratov, 410054, Russia

The goal. Of this study was to develop and assess the efficacy of polarization probing of biotissues in vitro. The method is based on the determination of polarization parameters of scattered radiation.

Materials and methods. The well-known superficial epidermis stripping method was applied using the Sulfacrylate self-sterile medical adhesive. Small portions of thin layers of the adhesive were applied to slide plates and then to different skin sites. The corneous layer in the normal condition and in case of skin diseases (psoriasis, lichen acuminatus, discoid lupus erythematosus, alopecia, itching and demodectic mange) was examined based on the optical coherence tomography (OCT) method using the OCS1300SS device (Thorlabs Inc, USA).

Results. The authors obtained pictures visualizing the structural organization of different layers of the epidermis using the superficial epidermis biopsy method in case of lichen acuminatus, hyperkeratosis, itching and other skin diseases.

Conclusion. This method ensures non-invasive high-precision measurement of the structure of different layers of the epidermis, which may be useful both for research purposes and practical dermatology.

Key words: **superficial skin biopsy, optical coherence tomography, polarization, structure of epidermis, dermatoses.**

Corresponding author: kalinina13@mail.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2015; 1: 85—91.

Патоморфологическое исследование кожи — золотой стандарт в оценке ее изменений. Данный вид диагностического исследования сопровождается нарушением целостности кожного покрова, что ограничивает его применение в повседневной клинической практике. Кроме того, традиционная методика, даже при современном уровне автоматизации процесса приготовления гистологических препаратов, трудоемка, требует существенных материальных и временны́х затрат. Не всегда удается достигнуть договоренности с пациентом о повторном, не говоря уже о многократном, гистологическом исследовании в процессе терапии. В связи с этим использование классической биопсии кожи для оценки эффективности терапии крайне затруднено. В качестве альтернативы классическому методу для изучения морфологии эпидермиса было предложено использовать методику поверхностной биопсии эпидермиса (ПБЭ) с помощью адгезивных композиций [1—3].

Область применения ПБЭ — дифференциальная диагностика эритематозно-сквамозных дерматозов, псориаза, дерматомикозов, дрожжевых и бактериальных инфекций, паразитарных заболеваний. С помощью ПБЭ могут быть выявлены различия между злокачественными и доброкачественными новообразованиями кожи меланоцитарного и немеланоцитарного происхождения [4—7]. Широкие перспективы открывает использование ПБЭ для получения информации о структуре поверхности рогового слоя, оценки участия различных слоев эпидермиса в трансэпидермальной потере воды, степени проникновения и равномерности распределения в роговом слое различных субстанций, включая лечебные, косметологические составы, солнцезащитные средства [8].

Методика получения образцов эпидермиса зависит от типа адгезивного материала, уровня увлажненности кожи, клеточных связей, которые увеличиваются по мере проникновения в глубину эпидермиса, индивидуальных и сезонных особенностей кожи в различных анатомических зонах и др. [9, 10].

Для морфометрической оценки получаемых образцов эпидермиса используются взвешивание, спектроскопическое определение абсорбции протеинов в УФ-диапазоне, измерения в диапазоне видимого спектра после окрашивания корнеоцитов, определение плотности корнеоцитов [11]. При использовании клейкой ленты (tape-stripping) не удается получить достаточный по толщине и однородности участок рогового слоя, вследствие чего в нем присутствуют клеточные фрагменты, располагавшиеся на различной глубине [1, 3—5, 12].

Материал и методы

Ранее для выполнения ПБЭ нами использовалась цианоакрилатная клеящая композиция МК-2 [1, 2]. В настоящем исследовании для получения образцов мы применили медицинский аутостерильный клей «Сульфакрилат», изготовленный по лицензии Института катализа СО РАН (Новосибирск). Композиция позволяет прочно фиксировать предметное стекло на поверхности кожи, а после выполнения отрыва — столь же прочно фиксировать на стекле фрагмент эпидермиса. Время полимеризации клея от 10 до 120 с. Экономичное нанесение (1 капля, 0,03 мл на 1 см^2 исследуемой поверхности) и высокая текучесть позволяют применять небольшие порции клея для образования равномерной тонкой пленки и использовать методику для взятия образцов с различных участков кожного покрова. Клей обладает бактерицидными свойствами, не оказывает токсического действия на организм и может использоваться в любых возрастных группах.

Для изучения структурной организации образцов ПБЭ использовали методику оптической когерентной томографии (ОКТ) на аппарате OCS1300SS (производство Thorlabs Inc, США (рис. 1), в котором источником зондирующего излучения служит суперлюминесцентный диод с центральной длиной волны 1325 нм и шириной спектра на уровне половины от максимального значения более 100 нм, что соответствует длине когерентности зондирующего излучения, равной 6 мм. При этом максимальная глубина зондирования образцов составляет 3 мм, что заведомо больше толщины отрывов. Зондирование в ближнем ИК-диапазоне позволяет минимизировать влияние затухания оптического сигнала, обусловленного рассеянием света биотканью и его поглощением молекулами воды и гидроксильными группами [13].

Специальное программное обеспечение позволяет осуществлять 1D-, 2D- и 3D-визуализацию исследуемых объектов (в последнем случае может быть получено трехмерное изображение фрагмента объекта с размерами 10 × 10 × 3 мм (Д × Ш × Г)). Продольное (по глубине) разрешение томографа составляет 12 мкм при зондировании сред с показателем преломления, близким к 1 и 9 мкм для сред с показателем преломления, близким к показателю преломления воды ($n \approx 1{,}33$). Соответственно, для биологических тканей с показателями преломления $n \approx 1{,}35 \div 1{,}50$ продольное разрешение будет несколько выше (до 8 мкм). Поперечное пространственное разрешение при 2D- и 3D-сканировании составляет 25 мкм. При построении изображений сечений биоткани по глубине (2D-визуализация) максимальное разрешение изображения составляет 4000 × 512 пикселей при кадровой частоте 25 Гц. Подобная комбинация параметров визуализации позволяет не только анализировать особенности морфологии образцов биотканей, обусловленные различными патологиями, но и исследовать кинетику взаимодействия тканей с различными физико-химическими агентами (например, их оптическое просветление при диффузии в объем ткани иммерсионных агентов).

Рис. 1. Внешний вид оптического когерентного томографа OCS1300SS

ОКТ — высокоточный метод исследования, построенный на принципах световой низкокогерентной интерферометрии. В дерматологии методика ОКТ используется с 1997 г. для *in vivo* исследований качественных и количественных показателей структурной организации эпидермиса и дермы [14—18]. В отличие от прозрачных тканевых структур глаза кожа — сильно рассеивающая среда, представляющая собой сложную многоуровневую неоднородную структуру. Компоненты кожи имеют различные показатели преломления, большинство из которых отличается от интерстициального пространства. ОКТ с пространственным разрешением 6—10 мкм может идентифицировать роговой слой, эпидермис и верхние слои дермы, а также придатки кожи и кровеносные сосуды. Кроме визуализации микроморфологических деталей ОКТ был использован для широкого спектра приложений — от обнаружения опухолей кожи, анализа патологических состояний кожи и слизистых оболочек, оценки эффективности лечения, оценки глубины ожога и мониторинга процесса заживления раны [19—21]. ОКТ кожи по разрешающей способности превосходит метод ультразвукового исследования, однако уступает конфокальной микроскопии. С другой стороны, глубина зондирования у ОКТ выше, нежели у конфокальной микроскопии (рис. 2).

При взаимодействии поляризованного излучения с биотканями наблюдаются два основных эффекта — деполяризация излучения, связанная с многократным рассеянием света в биоткани, и изменение состояния поляризации нерассеянной (когерентной) составляющей излучения, обусловленное двулучепреломлением ткани, ее оптической активностью и др. Патологи-

чески обусловленные изменения морфологии рогового слоя являются причиной возникновения различий в оптических свойствах здоровой и пораженной кожи [22, 23]. В качестве источника излучения при зондировании использовался He-Ne-лазер с длиной волны излучения 633 нм (линейная поляризация, выходная мощность 2 мВт). В оптической схеме системы зондирования применена телескопическая схема из двух микрообъективов с совмещенными фокальными плоскостями, где располагались исследуемые образцы на стеклянных подложках. Диаметр перетяжки зондирующего пучка составлял приблизительно 15 мкм. В ходе измерений осуществлялось поперечное сканирование образцов путем их последовательного смещения перпендикулярно зондирующему пучку с шагом 5 мкм; для каждого шага сканирования проводилась регистрация поляризационных характеристик прошедшего через исследуемый образец лазерного излучения. В качестве поляризационно-чувствительного детектора использовалась внешняя головка PAN5710VIS поляриметра THORLABS TXP 5004, подключенного к компьютеру. Регистрировались два поляризационных параметра прошедшего через исследуемый образец лазерного излучения: азимут поляризации по отношению к исходному направлению поляризации зондирующего пучка и эксцентриситет эллипса поляризации.

Процедуру ПБЭ выполняли в амбулаторных и стационарных условиях на базе клиники кожных и венерических болезней Саратовского государственного медицинского университета у больных с инфекционными (чесотка, демодекоз), неинфекционными заболеваниями кожи (псориаз, дискоидная красная волчанка, экзема, красный плоский лишай и др.) и у практически здоровых лиц [23—27]. Возраст пациентов колебался от 14 до 60 лет. ПБЭ выполняли неоднократно (серийно) на одном и том же участке кожного покрова. Участок кожи для исследования выбирался с максимально ровной поверхностью для обеспечения равномерного соприкосновения стекла с эпидермисом. На кожу наносили каплю клеящей композиции, затем накладывали и плотно прижимали предметное стекло толщиной 1—1,5 мм и размером 2 × 7 см, предварительно обезжиренное в смеси спирт—эфир (1:1). Через 30 с стекло аккуратно удаляли. ПБЭ выполняли вплоть до появления точечного кровотечения. Не было отмечено каких-либо побочных реакций, обусловленных применением сульфакрилатного клея.

Результаты

На рис. 3 приведены 1D-, 2D- и 3D-картины, визуализирующие структурную организацию различных слоев эпидермиса, полученных с помощью методики ПБЭ, описанной выше. На рис. 3*а* приведена 2D-картина видимо неизмененной кожи внутренней поверхности предплечья. Хорошо различимы микробороздки. На рис. 3*б* представлена 2D-визуализация первичного морфологического элемента при красном плоском лишае.

Рис. 2. Разрешающая способность и глубина зондирования биотканей для различных методов исследования кожи

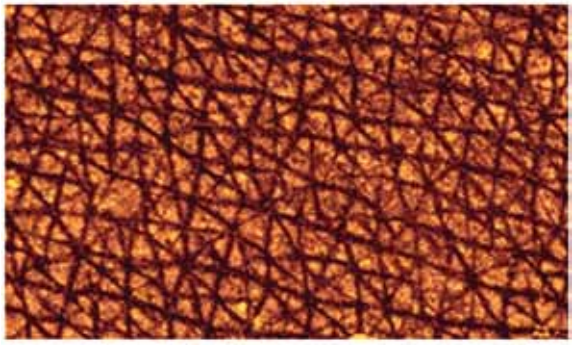
На рис. 3*в—д* представлены последовательные ПБЭ в области очага дискоидной красной волчанки (щека). Хорошо различим фолликулярный гиперкератоз. Наглядно представлено проникновение гиперкератотических разрастаний вглубь эпидермиса. При инфекционных заболеваниях кожи в роговом слое визуализируются чесоточные ходы (рис. 3*е*) и клещи *Demodex folliculorum* (рис. 3*ж*).

На рис. 3*з*, 3*и* приведена 3D-визуализация ПБЭ в очаге экзематозного процесса в области тыла кисти. Отлично различимы микровезикулы на фоне пропитанного (однородного) экссудатом эпидермиса.

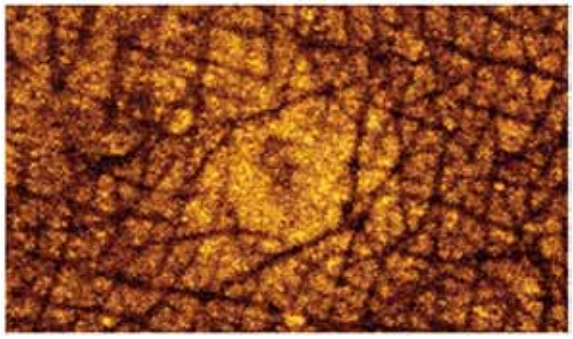
Анализ поляризационных параметров исследуемых образцов показал, что поляризационные характеристики излучения, прошедшего через исследуемые образцы, характеризуются различными средними значениями и дисперсией в зависимости от типа патологии.

Исследуемые образцы могут быть достаточно надежно идентифицированы по нахождению в определенной области в пространстве параметров «азимут поляризации — эксцентриситет эллипса поляризации». В то же время подобные области для таких патологий, как волчанка и псориаз, частично перекрываются. Существенной особенностью является то, что данные патологии характеризуются максимальной дисперсией поляризационных параметров.

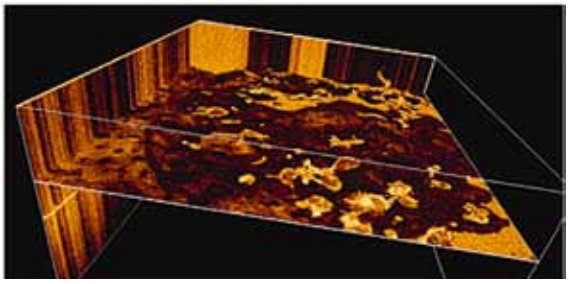
а



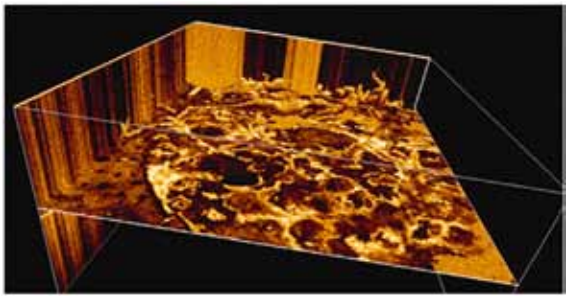
б



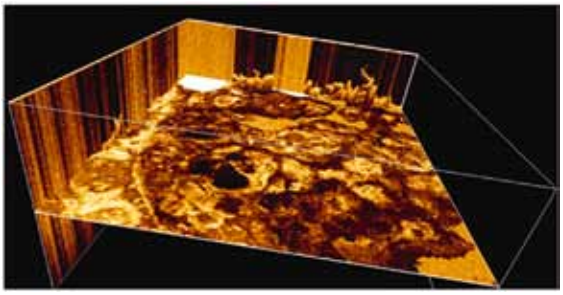
в



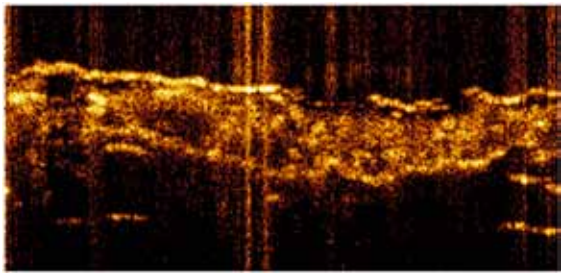
г



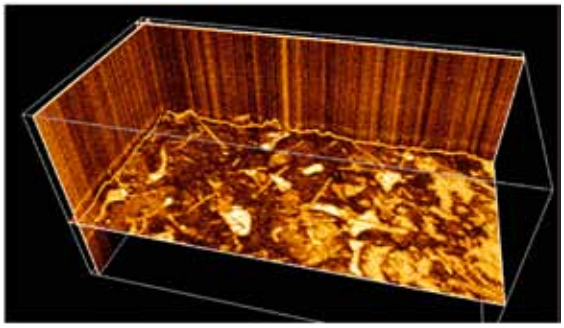
д



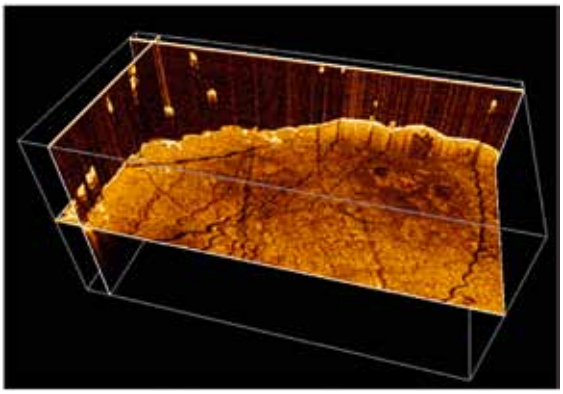
е



ж



з



и

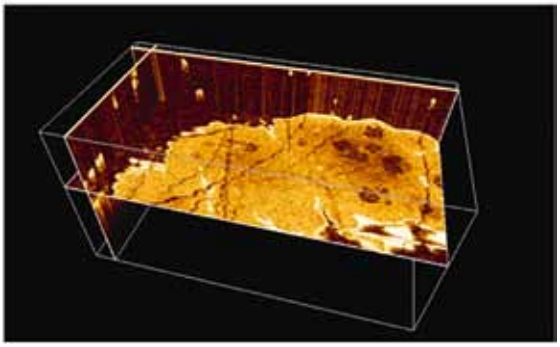


Рис. 3. 1D-, 2D- и 3D-картины, визуализирующие структурную организацию различных слоев эпидермиса, полученных с помощью методики ПБЭ:
а — видимо неизмененная кожа;
б — красный плоский лишай;
в — *д* — дискоидная красная волчанка;
е — чесотка; *ж* — демодекс;
з, *и* — экзема.
Объяснение см. в тексте

Обсуждение

Полученные нами результаты носят пилотный характер и призваны лишь привлечь внимание исследователей к относительно простой и информативной методике ПБЭ. Эта методика, безусловно, имеет свои ограничения, однако позволяет проводить неинвазивные высокоточные измерения структуры различных слоев эпидермиса. ПБЭ может быть использована многократно, так как не причиняет вреда пациенту. Образцы могут легко транспортироваться, не теряя при этом своих свойств.

Дальнейшие исследования позволят определить информативность данного метода и перспективность его использования в научных и практических целях.

Заключение

Метод поляризационной биопсии на основе статистического анализа локальных значений поляризационных параметров прошедшего через зондируемый слой биоткани лазерного излучения может явиться существенным дополнением как к традиционным микроскопическим методам анализа образцов биотканей, так и к современным методам диагностики и визуализации (например, оптической когерентной томографии) [11, 16, 17]. Дальнейшие исследования в данном направлении будут направлены на разработку системы диагностических критериев на основе поляриметрических данных и феноменологической модели для описания взаимосвязи поляризационных характеристик регистрируемого оптического сигнала со структурными параметрами зондируемого образца.

Литература

1. Utz S.R., Dovganskiy S.I., Odoevskaya O.D. Ispolzovanie metoda poverchnostnoy biopsii kogi v dermatologicheskoy practike. Vestn dermatol venerol 1992; 7: 37—38. [Утц С.Р., Довжанский С.И., Одоевская О.Д. Использование метода поверхностной биопсии кожи в дерматологической практике. Вестн дерматол и венерол 1992; (7): 37—38.]
2. Utz S.R., Dovganskiy S.I., Odoevskaya O.D. Exfoliativnaya kariometriya epidermisa pri psoriase. Vestn dermatol venerol 1995; 5: 4—8. [Утц С.Р., Довжанский С.И., Одоевская О.Д. Эксфолиативная кариометрия эпидермиса при псориазе. Вестн дерматол и венерол 1995; (5): 4—8.]
3. Weigmann H.J., Lademanna J., Mefferta H. et al. Determination of the Horny Layer Profile by Tape Stripping in Combination with Optical Spectroscopy in the Visible Range as a Prerequisite to Quantify Percutaneous Absorption. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 1999; 12: 34—45.
4. Lindemann U., Weigmann H.J., Schaefer H. et al. Evaluation of the Pseudo-Absorption Method to Quantify Human Stratumcorneum Removed by Tape Stripping Using Protein Absorption. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2003; 16: 228—236.
5. Dreher F., Modjtahedi B.S., Modjtahedi S.P. et al. Quantification of stratum corneum removal by adhesive tape stripping by total protein assay in 96-well microplates. Skin Res and Tech 2005; 11: 97—101.
6. Van der Molen R.G., Spies F., Van 't Noordende J. M. et al. Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the skin. Arch Dermatol Res 1997; 289: 514—518.
7. Weigmann H.J., Lindemanna U., Antonioub C. et al. UV/VIS Absorbance Allows Rapid, Accurate, and Reproducible Mass Determination of Corneocytes Removed by Tape Stripping Skin. Pharmacol Appl Skin Physiol 2003; 16: 217—227.
8. Galanzha E.I., Tuchin V.V., Luo Q.,Cheng H. et al. The action of osmotically active drugs on optical properties of skin and state of microcirculation in experiments. Asian J Phys 2001; 104: 503—511.
9. Zimnyakov D.A., Sinichkin V.P., Ushakova O.V. Opticheskaya anizotropiya fibroznich biotkaney: analis vliyaniya strukturnich characteristic. Kvantovaya electronika 2007; 37: (8) 777—783. [Зимняков Д.А., Синичкин В.П., Ушакова О.В. Оптическая анизотропия фиброзных биотканей: анализ влияния структурных характеристик. Квантовая электроника 2007; 37: (8) 777—783.]
10. Kuzmin V.A., Meglinskiy I.V. Obratnoe rasseyanie sveta s lineynoy I krugovoy polyarizaciyami v sluchayno-neodnorodnich sredach. Optica I spectroskopiya 2009; 106: (2): 294—305. [Кузьмин В.А., Меглинский И.В. Обратное рассеяние света с линейной и круговой поляризациями в случайно-неоднородных средах. Оптика и спектроскопия 2009; 106: (2): 294—305.]
11. Jacobi U., Waibler E., Sterry W. et al. In vivo determination of the long-term reservoir of the horny layer using laser scanning microscopy. Laser Phys 2005; 15: (4): 565—569.
12. Eppich E., Beuthan J., Dressier C. et al. Optical phase measurements on biological cells. Laser Phys 2000; 10: 467—477.
13. Wang L.V., Wu H.I. Biomedical Optics. ISBN 978-0-471-74304-0, 2007.
14. Wang R.K., Tuchin V.V. Optical tissue clearing to enhance imaging performance for OCT. Optical Coherence Tomography: Technology and Applications . Ed. by W. Drexler, J.G. Fujimoto. Berlin: Springer. 2008; 851—882.
15. Tuchin V.V., Zimnyakov D.A., Maksimova I.L. et al. The coherent, low-coherent and polarized light interraction with tissues undergo the refractive indices matching control. Proc. SPIE 1998; 3251: 12—21.
16. Guo X., Gou Z., Wei H. et al. In vivo comparison of the potical clearing efficacy of optical clearing agents in human skin by quantifying permeability using optical coherence tomography. Photochem Photobiol 2011; 87: (3): 734—740.
17. Wen X., Jacques S.L., Tuchin V.V. et al. Enhanced optical clearing of skin in vivo and OCT in-depth imaging. J Biomed Opt 2012; 17: (6): 22—66.
18. Tuchin V.V. Laseri I volokonnaya optica v biomedicinskich issledovaniyach. Saratov: izd-vo Saratovskogo un-ta 1998; (383): 3. [Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. Саратов: изд-во Саратовского ун-та 1998; (383): 3.]
19. Thilo Gambichler, Georg Moussa, Michael Sand et al. Applications of optical coherence tomography in dermatology. Journal of Dermatological Science 2005; 40: 85—94.
20. Maria Ziolkowskaa, Carsten M.Philippa, Julia Liebscherb, Hans-Peter Berliena. OCT of healthy skin, actinic skin and NMSC lesions. Received 12 July 2009.
21. Tuchin V.V., Zimnyakov D.A.,Maksimova I.L. et al. The coherent, low-coherent and polarized light interraction with tissues undergo the refractive indices matching control. Proc SPIE 1998; 3251: 12—21.

22. Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin U.P. et al. Opticheskoe prosvetlenie kogi pod deystviem glicerina: issledovanie ex *vivo* i *in vitro*. Opt spect 2010; 109: (2): 256—263. [Генина Е.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П. и др. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследование ex *vivo и in vitro*. Опт спектр 2010; 109: (2): 256—263.]
23. Chernova S.P., Kuznetsova N.V., Pravdin A.B. et al. Dynamics of optical clearing of human skin *in vivo*. Proc SPIE 2000; 4162: 227—235.
24. Dermatologiya Fiztparicka v klinincheskoy ptactike: V 3 t. / Klaus Volf, Louell A. Goldsmeet, Stiven I. Kaz et. al.; obsh. red. akad. A.A. Kubanovoy. M.: Izd-vo Panfilova; BINOM. Laboratoriya znaniy 2012; 1: 46—52. [Дерматология Фицпатрика в клинической практике: В 3 т. / Клаус Вольф, Лоуэлл А. Голдсмит, Стивен И. Кац и др.; пер. с англ.; общ. ред. акад. А.А. Кубановой. М.: Изд-во Панфилова; БИНОМ. Лаборатория знаний 2012; 1: 46—52.]
25. Kolichestvennie metodi ocenki intensivnosti deskvamacii pri izuchenii effectivnosti antipsoriaticheskoy terapii. Vestn dermat venerol 1997; 2: 4—7. [Количественные методы оценки интенсивности десквамации при изучении эффективности антипсориатической терапии. Вестн дерматол и венерол 1997; (2): 4—7.]
26. Socolova T.V. Chesotka. Novoe v etiologii, epidemiologii, klinike, diagnostike I profilactike (lekciya). Ros g kog ven bol 2001; 1: 27—39. [Соколова Т.В. Чесотка. Новое в этиологии, эпидемиологии, клинике, диагностике, лечении и профилактике (лекция). Рос журн кож вен бол 2001; (1): 27—39.]
27. Rufli Th., Mumcuoglu Y. The hair follicle mites Demodex folliculorum and Demodex brevis: biology and medical importance. Dermatology 1981; 162: 1—11.

об авторах:

С.Р. Утц — д.м.н., профессор, зав. кафедрой кожных и венерических болезней ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России

Д.А. Зимняков — д.ф-м.н., профессор, зав. кафедрой «Физика» Саратовского ГТУ им. Ю.А. Гагарина

Е.М. Галкина — ассистент кафедры кожных и венерических болезней ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России

Е.М. Решетникова — аспирант кафедры кожных и венерических болезней ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье