

Исследование распределения затухания автофлуоресценции кожи человека при непрерывном лазерном облучении

А.Лихачёв, И.Ферулёва, К.Васильева, Я.Спигулис

Представлены главные результаты, полученные в течение последних пяти лет в области изучения фотообесцвечивания автофлуоресценции кожи человека при длительном непрерывном лазерном облучении. Кратко описаны достигнутые результаты и использованные экспериментальные методы. Кроме того, продемонстрировано влияние длительного маломощного непрерывного лазерного излучения (длина волны 405 нм) на время жизни возбужденного состояния автофлуоресценции кожи.

Ключевые слова: автофлуоресценция кожи, фотообесцвечивание, спектроскопия временного разрешения.

1. Введение

Снижение интенсивности флуоресценции при длительном оптическом возбуждении известно как эффект фотообесцвечивания (photo-bleaching). Процесс фотообесцвечивания изучался на протяжении долгих лет многими авторами. Некоторые из них обнаружили, что снижение интенсивности можно достаточно точно описать двойным экспоненциальным уравнением [1–6]. При непрерывном облучении в течение первых 10–15 с происходит стремительное снижение интенсивности флуоресценции I , которое затем постепенно замедляется. При этом существует остаточная интенсивность, асимптотически стремящаяся к постоянному уровню A :

$$I(t) = a \exp(-t/\tau_1) + b \exp(-t/\tau_2) + A. \quad (1)$$

Здесь τ_1 характеризует быструю фазу фотообесцвечивания, τ_2 – медленную фазу; a , b и A – константы; t – время. Наши предыдущие исследования показали, что процесс фотообесцвечивания при УФ возбуждении и возбуждении в видимой части спектра характерен для всех фототипов кожи и некоторых кожных патологий. Во всех случаях снижение интенсивности автофлуоресценции (АФ) может быть описано эмпирическим двухэкспоненциальным уравнением [7, 8]. Также было установлено, что параметры фотообесцвечивания АФ различаются для разных участков кожи и неизменность быстрой и медленных фаз отсутствует [8, 9]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что процесс восстановления АФ после двухминутного непрерывного оптического облучения происходит в течение длительного времени (рис. 1). Измерения кинетики восстановления АФ показали, что в ходе 125-часовой релаксации интенсивность восстановилась на 80% от начального значения. Следствием длительного восстанов-

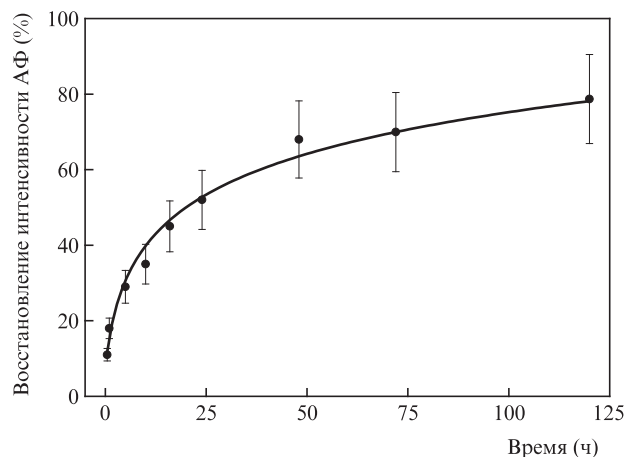


Рис. 1. Кинетика восстановления интенсивности АФ после двухминутного непрерывного лазерного облучения (длина волны излучения 532 нм, плотность мощности 85 мВ/см² [10]).

ления АФ был экспериментально обнаруженный эффект фотопамяти кожи: маломощное (ниже уровня стандартов безопасности) непрерывное лазерное облучение оставляло «следы» на коже в течение нескольких дней [10, 11].

Хотя феномен процесса фотообесцвечивания АФ до конца не изучен, особый интерес вызывает возможность его применения в клинической диагностике. Анализ параметров фотообесцвечивания АФ в ранее проведенных дерматологических исследованиях показал, что наиболее чувствительными с точки зрения диагностики являются параметры τ_1 и A . Параметр A при базально-клеточном раке (рис. 2) был существенно больше, чем в случае других кожных патологий, что свидетельствует о целесообразности внедрения данного метода в клиническую диагностику [12, 13].

В процессе исследования фотообесцвечивания АФ кожи человека было замечено, что при длительном непрерывном лазерном облучении в спектре АФ, как и в спектре диффузного отражения (рис. 3), появляются пики реабсорбции, соответствующие полосам поглощения оксигемоглобина. Таким образом, появление пиков поглощения в зеленой (540 нм) и желтой (580 нм) областях видимого спек-

A. Lihachev, I. Ferulova, K. Vasiljeva, J. Spigulis. Institute of Atomic Physics and Spectroscopy, University of Latvia, Riga, Latvia; e-mail: lihachov@inbox.lv, janispi@latnet.lv

Поступила в редакцию 25 февраля 2014 г., после доработки – 15 июня 2014 г.

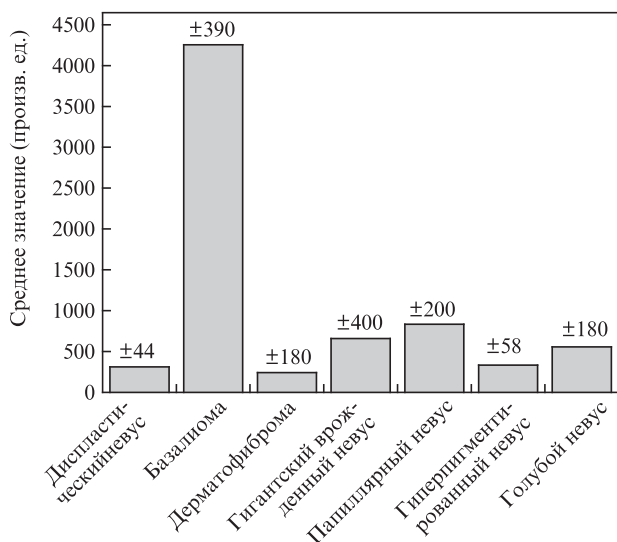


Рис.2. Средние значения параметра фотообесцвечивания *A* для различных кожных патологий [12].

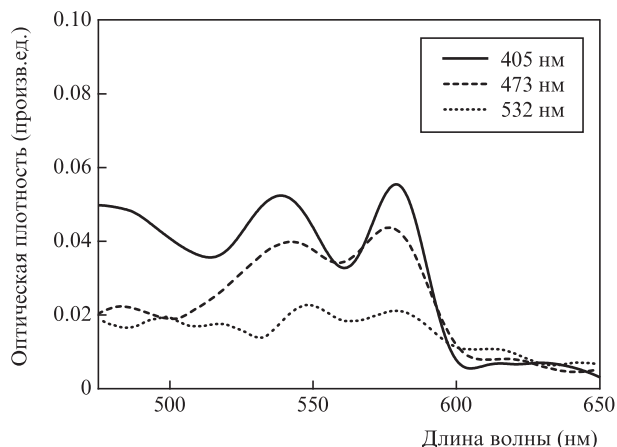


Рис.3. Характерные пики поглощения оксигемоглобина в спектре диффузного отражения кожи, подвергнутой предварительному облучению [14].

тра в процессе эксперимента говорит о том, что оксигемоглобин играет в фотообесцвечивании определенную роль [14].

Мы можем предположить, что длительное непрерывное облучение запускает некий фотохимический процесс, который приводит к деградации эндогенных флуорофоров. В свою очередь, деградация флуорофоров во время фотообесцвечивания должна изменить результирующее время жизни возбужденного состояния АФ. При возбуждении в фиолетово-голубой области эмиттирующими флуорофорами являются флавины, НАД-Н, порфирины, локализованные в эпидерме кератины, а также дермальный эластин и коллаген [5]. Излучательное время жизни АФ каждого из них уникально, что дает специфическую информацию для идентификации биологических тканей. Времена жизни возбужденного состояния АФ кожи можно характеризовать временным интервалом 0.2–15 нс. Однако в естественных условиях имеет место множество процессов гашения и переноса энергии, приводящих к значительному уменьшению времени жизни возбужденного состояния АФ флуорофоров. Точность измерения времен жизни флуоресценции зависит от измерительного устройства, рН-баланса, локализации флуорофора, вязкости

среды, температуры и др. [15–17]. В связи с этим проблема селективного анализа и идентификации отдельных флуорофоров кожи с использованием мультиэкспоненциального анализа распада АФ все еще не решена.

В настоящей работе исследуется влияние непрерывного лазерного излучения малой мощности на время жизни возбужденного состояния АФ кожи человека.

2. Эксперимент

Мы исследовали изменения времен жизни возбужденного состояния АФ кожи во время длительного облучения маломощным лазером с длиной волны 405 нм. Для реализации поставленной цели использовалась установка (рис.4), позволяющая параллельно регистрировать распределения затухания и параметры фотообесцвечивания АФ. Установка состоит из пикосекундного/непрерывного лазера LDH-D-C-405 (PicoQuant) с полушириной импульса 59 пс и длиной волны 405 нм, блока управления лазером, монохроматора, счетчика фотонов PMS-100-4 (Becker&Hickl) с временным разрешением 180 пс, системы обработки данных для подсчета временно-коррелированных одиночных фотонов SPC-150 (Becker&Hickl) с временным разрешением 6.6 пс, оптоволоконного датчика, матричного спектрометра AvaSpec 2048 и компьютера. Для измерений времени жизни АФ поверхность здоровой кожи с помощью волоконного световода облучалась излучением импульсного лазера, а для измерения параметров фотообесцвечивания – излучением непрерывного лазера.

Во избежание артефактов, вызванных движениями тела, рука во время измерений была закреплена в специальной стабилизационной подушке. Возбуждение и регистрация АФ проводились на здоровой коже (на расстоянии 6 мм от ее поверхности) в области внутренней стороны предплечья. Тушение АФ регистрировалось с одних и тех же участков кожи непосредственно перед облучением и сразу после шестиминутного непрерывного лазерного облучения с плотностью мощности 20 мВт/см². Во всех случаях фотоны затухания АФ регистрировались в течение 10 с на длине волны 480±10 нм. Во время шестиминутного облучения непрерывным лазером динамика уменьшения интенсивности АФ в диапазоне 450–800 нм регистрировалась спектрометром. Интенсивность АФ кожи исследовалась с помощью программного обеспечения SPCM (Becker&Hickl) посредством сбора фотонов в течение фиксированного временного интервала. Для определения времен жизни возбужденного состояния использовался мульт-



Рис.4. Схема установки для параллельного детектирования времени жизни возбужденного состояния и параметров фотообесцвечивания АФ кожи.

Табл.1. Среднеарифметические значения и стандартные отклонения (в скобках) компонент времени жизни АФ τ_i и относительных амплитуд a_i .

Момент времени	Двухэкспоненциальная аппроксимация				Трёхэкспоненциальная аппроксимация					
	a_1 (%)	τ_1 (нс)	a_2 (%)	τ_2 (нс)	a_1 (%)	τ_1 (нс)	a_2 (%)	τ_2 (нс)	a_3 (%)	τ_3 (нс)
До облучения	72.48 (2.42)	1.63 (0.17)	27.52 (2.42)	7.15 (1.00)	69.26 (3.40)	1.52 (0.13)	22.12 (1.33)	6.02 (1.03)	8.6 (2.47)	8.10 (1.68)
После 3 мин облучения	71.66 (2.56)	1.29 (0.15)	28.34 (2.56)	6.22 (1.07)	72.14 (2.53)	1.31 (0.13)	20.94 (3.05)	6.25 (0.74)	6.94 (0.66)	6.81 (2.30)
После 6 мин облучения	70.9 (3.15)	1.13 (0.13)	29.1 (3.15)	5.37 (0.88)	71.32 (2.9)	1.13 (0.11)	21.22 (3.57)	4.95 (0.62)	7.46 (0.81)	5.97 (1.03)

тиэкспоненциальный метод анализа распределения тушения флуоресценции:

$$f(t) = \sum_{i=0}^n a_i \exp(-t/\tau_i) + c, \quad (2)$$

где $f(t)$ – интенсивность АФ в момент времени t после импульсного возбуждения; n – число компонент процесса тушения в экспоненциальной сумме; c – уровень шума для каждого частного случая. С помощью мультиэкспоненциального метода аппроксимации были получены характеристические компоненты затухания τ_i и их амплитуды a_i .

Посредством метода обратной свертки программа вычисляет сигнал отклика системы, получая исходное распределение затухания АФ. Этот метод позволяет вычислять времена жизни длительностью вплоть до 0.5 нс. Все измерения были получены при облучении трех областей здоровой кожи на внутренней стороне предплечья. В исследованиях принимали участия 10 добровольцев, представленные результаты являются среднеарифметической величиной. При анализе был применен двух- и трехэкспоненциальный метод аппроксимации распределения затухания АФ.

3. Результаты

В табл.1 представлены среднеарифметические значения времен жизни АФ и их относительные амплитуды. Распределения затухания АФ получены в разные моменты времени: до фотообесцвечивания, а также после трех и шести минут фотообесцвечивания. Как видно из таблицы, во всех случаях среднеарифметические значения для всех добровольцев примерно равны. Стандартные отклонения от этих значений относительно невелики.

Во всех случаях распределение затухания АФ необлученной кожи можно охарактеризовать параметрами $\tau_{1,2}$, $a_{1,2}$ или $\tau_{1,2,3}$, $a_{1,2,3}$ (в зависимости от применяемого метода аппроксимации). При аппроксимации одного и того же распределения затухания АФ двух- и трехэкспоненциальной функциями мы получаем одни и те же значения параметров τ_1 и τ_2 . При использовании трехэкспоненциальной аппроксимации из результирующего распределения можно выделить третью компоненту с относительно долгим временем жизни ($\tau_3 \sim 8.1$ нс) и малой амплитудой ($a_3 \sim 8.6\%$).

На рис.5 показаны кривые затухания АФ до и после шести минут непрерывного облучения. Видно, что после облучения распределение затухания АФ изменилось. Соответственно существенно уменьшились значения $\tau_{1,2,3}$: τ_1 – с 1.52 ± 0.13 до 1.13 ± 0.11 нс, τ_2 – с 6.02 ± 1.0 до 4.95 ± 0.62 нс и τ_3 – с 8.1 ± 1.68 до 5.97 ± 1.03 нс. В то же время амплитуды компонент затухания существенно не изменились. Было замечено, что изменения в распределении затухания АФ

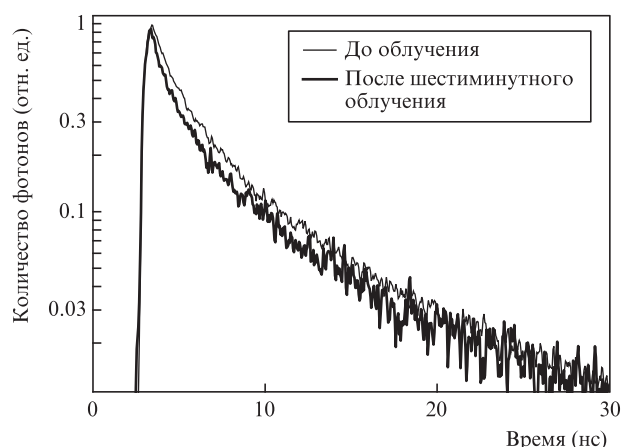


Рис.5. Кривые затухания АФ кожи до облучения и после шестиминутного непрерывного облучения лазером с длиной волны 405 нм. Кривые зарегистрированы на длине волны 480 ± 10 нм.

являются следствием неоднородного фотообесцвечивания флуорофоров кожи при длительном облучении. Подсчет фотонов в разные моменты времени после возбуждения показал неоднородное уменьшение количества фотонов АФ. Так, количество фотонов в интервале 3–4 нс уменьшилось на 45%, в интервале 5–6 нс на 55% и в интервале 8–9 нс на 60%. Кроме того, после шести минут непрерывного оптического возбуждения квантиль χ^2_r сократился с 1.4 ± 0.2 до 1.1 ± 0.1 , а следовательно, распределение затухания АФ упростилось. Также было замечено, что значения τ_2 и τ_3 имеют тенденцию к уравниванию в пределах стандартного отклонения.

4. Обсуждение

Метод трехэкспоненциальной аппроксимации распределения затухания АФ по сравнению с двухэкспоненциальным более информативен и позволяет выявить третью компоненту с относительно долгим временем жизни и малой амплитудой. Наличие длинной компоненты в распределении затухания также наблюдалось при возбуждении в фиолетовой области и объяснялось существованием связанной формы коллагена с конечными продуктами распада глюкозы [18, 19]. В то же время компоненты τ_1 и τ_2 представляют собой усредненное значение времени жизни для всех флуорофоров, излучающих при возбуждении на длине волны 405 нм. Такими флуорофорами являются коллаген, эластин, кератин, НАД-Н и флавины. Времена жизни данных флуорофоров характеризуются наличием короткой и длинной компонент, причем длительность короткой компоненты у данных флуорофоров лежит в пикосекундном диапазоне [15]. Точное вычисление длительности короткой компоненты затухания АФ ограничено временем отклика системы, а также существенным вкладом

рассеянного и отраженного лазерного излучения [20, 21]. Несмотря на отмеченные лимитирующие факторы, уменьшение количества фотонов на всем временном интервале во время фотообесцвечивания указывает на то, что основной вклад в формирование распределения вносит именно АФ.

Главным результатом настоящего исследования является экспериментальная демонстрация уменьшения результирующего времени жизни возбужденного состояния АФ кожи во время фотообесцвечивания. Данное уменьшение наиболее вероятно вызвано пропорциональным изменением состава флуорофоров кожи во время этого процесса. О пропорциональном изменении свидетельствуют увеличение приближения аппроксимации распределения затухания и выравнивание (в пределах ошибки) компонент времени жизни $\tau_{2,3}$ после обесцвечивания. Принимая во внимание длительное восстановление интенсивности АФ после фотообесцвечивания [10], уменьшение времени жизни, вероятнее всего, вызвано неоднородной деградацией или фоторазрушением флуорофоров при длительном возбуждении. Также заслуживает внимания тот факт, что на седьмой-восьмой минуте 15-минутного облучения количество фотонов снова начинает увеличиваться, причем это увеличение сопровождается скачком времени жизни третьей компоненты (τ_3) с 5.67 до 15 нс. Увеличение интенсивности и времени жизни АФ, вероятно, свидетельствует о возгорании флуорофоров или же об образовании их новых форм. Несомненно, данный феномен требует дополнительных исследований для определения точного механизма фотообесцвечивания и его влияния на физиологию кожи.

5. Заключение

Дан краткий обзор основных достижений в области изучения фотообесцвечивания автофлуоресценции кожи при непрерывном лазерном возбуждении, а также рассмотрены вопросы целесообразности внедрения данного феномена в клиническую диагностику. В экспериментальной части работы продемонстрировано неоднородное выцветание флуорофоров кожи при длительном возбуждении, приводящее к изменению в распределении затухания автофлуоресценции. Эффект неоднородного выцветания

автофлуоресценции требует дополнительных исследований для идентификации флуорофоров, отвечающих за изменение в распределении затухания. К дальнейшим исследованиям следует привлечь большее количество добровольцев, а также изучить разные патологические состояния кожи.

Работа выполнена при поддержке европейских проектов «Fotonika-LV – FP7-REGPOT-CT-2011-285912» и «LaserLab Europe» (контракт №284464).

1. Zeng H., MacAulay C.E., Palcic B., McLean D.I. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **1882**, 278 (1993).
2. Salomatina E.V., Pravdin A.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5068**, 405 (2001).
3. Stratonnikov A.A., Polikarpov V.S., Loschenov V.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4241**, 13 (2001).
4. Wang H., Zhao, J., Lee A.M.D., Lui H., Zeng H. *Photodiagn. Photodyn.*, **9** (4), 299 (2012).
5. Darwin M.E., Brandt N.N., Lademann J. *Opt. Spectrosc.*, **109** (2), 205 (2010).
6. Finlay J.C., Mitra S., Patterson M.S., Foster T.H. *Phys. Med. Biol.*, **49** (21), 4837 (2004).
7. Lihachev A., Spigulis J. *IEEE Xplore*, 10.1109/NO, 63 (2007).
8. Spigulis J., Lihachev A., Ertz R. *Appl. Opt.*, **48** (10), D163 (2009).
9. Jakovels D., Spigulis J. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7376**, 737618 (2010).
10. Lihachev A., Lesins J., Jakovels D., Spigulis J. *Quantum Electron.*, **40** (12), 1077 (2010).
11. Lesins J., Lihachev A., Rudys R., Bagdonas S., Spigulis J. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **8092**, 80920N (2011).
12. Lihachev A., Rozniece K., Lesins J., Spigulis J. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **8087**, 80872F (2011).
13. Spigulis J. *Latv. J. Phys.*, **49**, 5 (2012).
14. Ferulova I., Lesins J., Lihachev A., Jakovels D., Spigulis J. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **8427**, 84273I (2012).
15. Chorvat D., Chorvatova A. *Laser Phys. Lett.*, **6** (3), 178 (2009).
16. Islam M.S., Honma M., Nakabayashi T., Kinjo M., Ohta N. *Int. J. Molec. Sci.*, **14**, 1952 (2013).
17. Dmitrovsky E., Mycek M.A., Pitts J. *World Patent WO2002069784 A2*, 2002.
18. Ediger H.E., Unione M., Deemer A., Stroman E., Baynes M., Korss J. *Opt. Express*, **12** (19), 4496 (2004).
19. Blackwell J., Katika K.M., Pilon L., Dipple K.M., Levin S.R., Nouvong A. *J. Biomed. Opt.*, **13** (1), 014004 (2008).
20. König K., Ehlers A., Stracke F., Riemann I. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **19** (2), 78 (2006).
21. Bird D.K., Yan L., Vrotsos K.M., Eliceiri K.W., Vaughan E.M., Keely P.J., White J.G., Ramanujam N. *Cancer Res.*, **65** (19), 8766 (2005).