

ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» (Самарский университет)

На правах рукописи



Братченко Иван Алексеевич

**Мультимодальный флуоресцентный и Рамановский спектральный анализ тканей
кожи человека и методы машинного обучения для диагностики новообразований
кожи и патологий почек**

1.5.2 – Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени

доктора физико-математических наук

Научный консультант:

доктор физико-математических наук

Захаров Валерий павлович

Самара - 2022

Оглавление

Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	7
1 АНАЛИЗ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА БИОТКАНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАМАНОВСКОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	27
2 EX VIVO АНАЛИЗ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВООБРАЗОВАНИЙ ТКАНЕЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА	47
3 ОПТИЧЕСКАЯ БИОПСИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА IN VIVO	68
3.1 Проведение исследований на тестовой когорте пациентов	69
3.2 Оценка влияния шума на использование портативного оборудования при проведении «оптической биопсии» новообразований кожи человека	75
3.3 Оптическая биопсия меланом, базальноклеточного рака и доброкачественных новообразований кожи	77
3.3 Анализ in vivo AF и RS характеристик кожи человека для проведения «оптической биопсии» в клинических условиях	87
4 РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ	117
4.1 Когорта исследованных пациентов, проходящих процедуру гемодиализа, и участники эксперимента без хронических заболеваний	119
4.2 Регистрация спектров кожи больных, находящихся на гемодиализе, с помощью портативной Рамановской системы	120
4.3 Статистический анализ спектральных данных «оптической биопсии» пациентов с почечной недостаточностью и здоровых индивидов с применением метода проекции на латентные структуры	121
4.4 Результаты исследования спектральных особенностей кожи пациентов с почечной недостаточностью	123
4.5 Сравнительный анализ построенных регрессионных моделей для выявления патологий почек	128
4.6 Возможность определения патологий почек при проведении «оптической биопсии» тканей кожи предплечья	133

5 АНАЛИЗ УЗКОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ	135
5.1 Выделение беспигментных меланом с применением «оптической биопсии» на основе портативного Рамановского устройства	135
5.2 Клинические случаи, демонстрирующие необходимость использования оптической биопсии в диагностике заболеваний	144
5.3 Пример уменьшения нагрузки на поликлиники при <i>in vivo</i> анализе подозрительных участков кожи с применением «оптической биопсии»	147
6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАКОВЫХ ПАТОЛОГИЙ КОЖИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕЙРОСЕТЕВОГО АНАЛИЗА СПЕКТРАЛЬНЫХ ДАННЫХ «ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ».....	156
6.1 Возможность использования нейронных сетей для анализа данных «оптической биопсии» кожи человека	156
6.2 Известные подходы к реализации нейросетевых классификаторов в анализе новообразований	157
6.3 Реализация CNN для анализа зашумленных данных "оптической биопсии" рака кожи человека	168
Заключение	186
Список литературы	188
Приложение А	216
Приложение Б	217
Приложение В	219

Список сокращений

AF – автофлуоресценция (англ. autofluorescence)

АММ – амеланотическая (безпигментная) злокачественная меланома (англ. amelanotic malignant melanoma)

ANN – искусственные нейронные сети (англ. artificial neural networks)

AUC – площадь под кривой (англ. area under curve)

BCC – базальноклеточная карцинома (англ. basal cell carcinoma)

BN – доброкачественные новообразования (англ. benign neoplasms)

BPF – полосовой фильтр (англ. bandpass filter)

BR – коэффициент биопсии (англ. biopsy ratio)

CAD – методы компьютерной диагностики (англ. computer-aided diagnosis)

CARS – когерентная антистоксова Рамановская спектроскопия (англ. coherent anti-Stokes Raman spectroscopy)

CCD – прибор с зарядовой связью (англ. charge-coupled device)

CI – доверительный интервал (англ. confidence interval)

CNN – сверточные нейронные сети (англ. convolutional neural networks)

DA – дискриминантный анализ (англ. discriminant analysis)

DF – дерматофиброма (англ. dermatofibroma)

DFSP – дерматофибросаркома протуберанс (англ. dermatofibrosarcoma protuberans)

DM – дихроичное зеркало (англ. dichroic mirror)

DPSS – твердотельный лазер с диодной накачкой (англ. diode-pumped solid-state laser)

FLIM – визуализация времени жизни флуоресценции (англ. fluorescence lifetime imaging microscopy)

GPU – графический процессор (англ. graphical processing unit)

HCA – иерархический кластерный анализ (англ. hierarchical cluster analysis)

HE – гемангиома (англ. hemangioma)

LPF – широкополосный фильтр (англ. long-pass filter)

LSTM – долгая краткосрочная память (англ. long short-term memory)

MLG – злокачественные новообразования (англ. malignant)

MLR – множественная линейная регрессия (англ. multiple linear regression)

MM – злокачественная меланома (англ. malignant melanoma)

NA – числовая апертура (англ. numerical aperture)

NE – невус (англ. nevus)

NIR– ближняя инфракрасная область (англ. near infrared)

NPV – отрицательная прогностическая ценность (англ. negative predictive value) PC – главные компоненты (англ. principal components)

PCA – анализ главных компонент (англ. principal component analysis)

PDGF – фактор роста тромбоцитов (англ. platelet derived growth factor)

PDGFB – субъединицы В фактора роста тромбоцитов (англ. platelet derived growth factor subunit B)

PDGFRB – рецепторная тирозинкиназа (англ. platelet derived growth factor receptor Beta)

PLS – проекция на латентные структуры (англ. projection on latent structures)

PLS-DA – дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов (англ. partial least squares discriminant analysis)

PMM – пигментная злокачественная меланома (англ. pigmented malignant melanoma)

PP – папиллома (англ. papilloma)

PPV – положительная прогностическая ценность (англ. positive predictive value) ROC – рабочая характеристика приёмника (англ. receiver operating characteristic)

RMSE – среднеквадратичная ошибка (англ. root mean square error)

RS – Рамановская спектроскопия (англ. Raman spectroscopy)

SCC – плоскоклеточная карцинома (англ. squamous cell carcinoma)

SERS – поверхностно усиленная Рамановская спектроскопия (англ. surface enhanced Raman spectroscopy)

SESORS – поверхностно усиленная Рамановская спектроскопия с пространственным разрешением (англ. surface-enhanced spatially-offset Raman spectroscopy)

SK – себорейный кератоз (англ. seborrheic keratoses)

SNR – соотношение сигнал-шум (англ. signal to noise ratio)

SNV – стандартное отклонение случайной величины с нормальным распределением (англ. standard normal variate)

SORS – Рамановская спектроскопия с пространственным разрешением (англ. spatially offset Raman spectroscopy)

SRS – стимулированная Рамановская спектроскопия (англ. stimulated Raman spectroscopy)

SVM – метод опорных векторов (англ. support vector machine)

SVM-DA – дискриминантный анализ метод опорных векторов (англ. support vector machine discriminant analysis)

VIP – значимость переменных в проекции (англ. variable importance in projection)

ИК – инфракрасный

КПГ – конечные продукты гликирования

МРТ – магнитно-резонансная томография

МФТ – многофотонная томография

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПЗС – прибор с зарядовой связью

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и современное состояние проблемы.

В современной популяции смертность и инвалидность от неинфекционных (социально значимых) заболеваний является преобладающей и осознается как основная медико-социальная проблема. Наиболее значимыми являются заболевания, ассоциированные с дисфункцией сердечно-сосудистой системы – ишемическая болезнь сердца, заболевания церебральных артерий, артериальная гипертензия, а также различные раковые заболевания. Изучение процессов старения и механизмов развития заболеваний, связанных с возрастом, продемонстрировало накопление модифицированных белков и липидов в тканях организма человека. То есть объединяющим патогенетическим фактором этих состояний являются изменения метаболизма (углеводного, жирового и белкового), которые имеют общую направленность, формируя поражения тканей и органов, развития новообразований, как непосредственный субстрат осложнений, ведущих к инвалидности и смерти.

Набор метаболитов, синтезируемых организмом, составляет его метаболом. Метаболическое фенотипирование, которое в настоящее время чаще всего называют «метаболомикой», определяется как «количественное измерение динамического мультипараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические стимулы или генетическую модификацию». Наиболее известными компонентами метаболома, широко используемыми в клинической практике для диагностики заболеваний и определения их прогноза являются глюкоза, мочевая кислота, креатинин, холестерин и его фракции, триглицериды. Процессы метаболизма организма определяются генетическими факторами и факторами образа жизни, среди которых характер питания, статус курения, образ жизни и т.д. Определение метаболического профиля тканей человека является перспективным для выявления так называемых биомаркеров – суррогатных критериев, имеющих доказанное прогностическое значение, что позволяет проводить стратификацию риска с тем, чтобы в группе пациентов с неблагоприятными параметрами осуществлять наиболее агрессивную стратегию, направленную на их нормализацию. Также выделение биомаркеров является ключевым при диагностике конкретных видов новообразований, так как при развитии доброкачественных и злокачественных опухолей метаболизм (а, следовательно, и состав тканей) значительно различается для опухолей различного происхождения. Выявление новых биомаркеров, связанных с патологической

перестройкой тканей является актуальным для науки и практики подхода, направленного на борьбу со старением и обусловленными старением заболеваниями.

Анализ изменений состава различных слоев кожи человека – одно из ведущих направлений, которое сформулировано как «aging» и включает исследование механизмов физиологического старения и заболеваний, связанных с возрастом. Кроме того, кожа доступна и поэтому привлекательна как объект диагностики *in vivo*. При изучении компонентного состава кожи используются различные биохимические и иммунохимические методы лабораторных анализов. Однако эти методы инвазивны и требуют дополнительных реагентов. Помимо применяемых сегодня лабораторных методов анализа, для изучения компонентного состава кожи человека могут успешно применяться различные физические методы. В настоящее время Рамановская спектроскопия (RS) используется в клинических экспериментальных исследованиях для определения состава кожи, количественной оценки содержания определенных химических компонентов в коже, для определения эффективности доставки лекарств через кожу, для определения биофизических связей между колебательными характеристиками и конкретными композиционными и химическими изменениями, связанными со старением, развитием новообразований и т.д.

В современной мировой практике появляются перспективные методы диагностики, такие как «оптическая биопсия», которые представляет собой экспрессный анализ специфических биомаркеров заболеваний, содержащихся в биологических тканях, и обладают потенциалом для устранения ограничений традиционных методов клинического анализа. Одним из самых перспективных методов оптического анализа (и оптической биопсии) и диагностическим инструментом является Рамановская спектроскопия, которая может способствовать пониманию молекулярных основ заболеваний и созданию новых биоаналитических инструментов для диагностики заболеваний в том числе и на доклинической фазе. Поскольку каждый тип биоткани имеет индивидуальный молекулярный состав и, тем самым, уникальный спектральный профиль, возникающий в результате перехода молекулы из одного колебательно-вращательного состояния в другое, то набор таких индивидуальных состояний функциональных групп нуклеиновых кислот, белков, липидов и углеводов позволяет охарактеризовать компонентный состав тканей, что в конечном итоге позволяет выделять маркеры заболеваний.

Современной тенденцией в развитии методов спектрального анализа биотканей и «оптической биопсии», позволяющей уменьшить ряд недостатков при отдельных применениях оптических методов, является мультимодальный подход, когда в одной

диагностической технологии соединяются различные оптические методы исследования, повышающие точность и достоверность проводимого анализа, и позволяющие обеспечить неинвазивную диагностику заболеваний. Одной из первых работ в направлении развития «оптической биопсии» рака была работа по использованию автофлуоресценции (AF) (Р. Альфано, 1986). Далее автофлуоресцентные методы анализа были широко опробованы для диагностики различных новообразований (Е. Борисова, В.В, Тучин и др.). Однако, в ходе многочисленных исследований стало ясно, что только применение AF не дает требуемой диагностической точности. Поэтому на смену AF пришли исследования биотканей с применением различных модификаций AF (например, К. Кониг – многофотонная AF тканей кожи для исследования меланомы), в исследованиях стали активно использоваться стандартная RS (Ж. Хуанг, Х. Женг и др.), а также различные модификации RS, такие как стимулированная RS, анти-Стоксова RS и др. (Ж. Хуанг, Ю. Попп). После интенсивного внедрения RS в биомедицинские исследования, AF компонента часто отбрасывалась как малоинформативная. При этом для более корректной интерпретации данных исследования и повышения точности диагностики заболеваний хорошо зарекомендовало себя совместное применение AF и RS (Х. Женг, В.П. Захаров). Несмотря на все последние успехи «оптической биопсии», для внедрения в клиническую практику оптических методов неинвазивного анализа необходимо дальнейшее совершенствование методологии мультимодального подхода, а также создание простых в реализации систем, которые бы смогли использоваться в различных областях медицины. Создание медицинских систем «оптической биопсии» сопряжено с рядом трудностей, таких как оптимизация соотношения сигнал-шум, а также выбор оптимальных методов анализа спектральных данных. Только комплексное решение всех перечисленных выше проблем позволит приблизить «оптическую биопсию» к «золотому стандарту» современной диагностики – биохимических и гистологическим исследованиям тканей. Повышение точности оптического анализа до уровня «золотого стандарта» позволит внедрить «оптическую биопсию» в широкую клиническую практику.

Таким образом, на сегодняшний день актуальными задачами для внедрения «оптической биопсии» в клиническую медицинскую практику являются разработка методологической основы использования RS и AF, а также их комбинации, для диагностики различных неинфекционных заболеваний при анализе только кожных покровов человека; набор необходимой спектральной базы, включающей сотни пациентов и здоровых людей; оптимизация оборудования и режимов регистрации спектральных данных для максимального точного и комфортного обследования пациентов; выбор оптимальных

методов анализа комплексных спектральных данных, в том числе с низким соотношением сигнал/шум, получаемых с использованием «оптической биопсии»; создание методов диагностики заболеваний, не уступающим в точности подходам, используемым в современной клинической практике.

Цель и задачи диссертационной работы.

Целью работы является развитие методов мультимодальной «оптической биопсии» социально значимых заболеваний человека при неинвазивном исследовании тканей кожи, а также создание методов высокоточной интерпретации данных «оптической биопсии».

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи**:

1. Исследование спектральных характеристик тканей кожи человека, находящихся в нормальном состоянии, при развитии патологий почек и при развитии злокачественных и доброкачественных новообразований.

2. Исследование спектральных характеристик рассеяния тканей кожи при использовании зондирующего излучения с длинами волн возбуждения 457 нм и 785 нм.

3. Разработка метода выделения наиболее информативных спектральных полос для проведения диагностики неинфекционных заболеваний при одновременном учете автофлуоресцентных и Рамановских спектральных характеристик.

4. Обоснование условий и наиболее оптимального времени регистрации спектральных данных тканей кожи человека в условиях широкополосной автофлуоресценции и высоких шумов (низкого соотношения сигнал-шум).

5. Изучение возможности применения многомерных методов статистического анализа (проекция на латентные структуры и других хемометрических подходов) к спектральным данным оптической биопсии кожи человека с низким соотношением сигнал-шум.

6. Изучение возможности применения сверточных нейронных сетей для выявления узких Рамановских полос, на фоне интенсивного автофлуоресцентного сигнала, при решении задачи классификации тканей кожи человека.

7. Оценка устойчивости разрабатываемых моделей классификации тканей кожи человека при проведении кросс-валидации, а также определение оптимального количества используемых нагрузок (в случае использования проекции на латентные структуры) и количества эпох обучения (в случае применения сверточных нейронных сетей) для корректного применения моделей классификации.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

Основные научные положения:

1. Мультимодальный анализ одновременно возбуждаемых Рамановского рассеяния и автофлуоресценции источником лазерного излучения с длиной волны 785 нм позволяет определять содержание белков, липидов и пигментов в коже человека: за счет выявления полос Рамановского рассеяния в области 1000-1800 см⁻¹ установить композицию протеинов и липидов, и содержание пигментов, таких как меланин, за счет анализа изменений спектральной плотности интенсивности автофлуоресценции в области 400-1000 см⁻¹.
2. Использование проекции на латентные структуры при анализе Рамановских спектров тканей кожи с низким соотношением сигнал-шум (величина соотношения от 3 и выше), позволяет выявлять узкие спектральные полосы (от 12 см⁻¹), соответствующие наличию конкретных групп химических соединений. Одновременное использование значимости переменных в проекции, объединяющей информативные нагрузки, позволяет установить положение Рамановских полос химических компонентов тканей, вносящих значимый вклад в модели классификации заболеваний.

Основные результаты:

1. Мультимодальный метод регистрации, предобработки и анализа спектральных данных оптического зондирования тканей кожи человека, позволяющий производить диагностику раковых заболеваний и патологий почек, и использующий данные автофлуоресцентного анализа в видимой и ближней ИК областях спектра и Рамановского рассеяния в ближней ИК области спектра при зондировании тканей кожи, позволяющий выявлять компонентный состав продуктов метаболизма и их относительную концентрацию за счет использования наиболее информативных спектральных полос с применением методов машинного обучения;
2. Метод определения компонентного состава продуктов метаболизма тканей кожи при селективном возбуждении тканей лазерными источниками оптического излучения для одновременного анализа спектров автофлуоресценции и Рамановского рассеяния. Анализ автофлуоресценции в видимом диапазоне спектра (при возбуждении излучением с длиной волны 457 нм) позволяет устанавливать концентрацию порфиринов, липидов и флавинов; анализ автофлуоресценции в ближнем ИК диапазоне (при возбуждении излучением с длиной волны 785 нм)

позволяет устанавливать концентрацию меланина и продуктов окисления протеинов и липидов; анализ Рамановских спектров в ближней ИК области спектра (при возбуждении излучением с длиной волны 785 нм) позволяет устанавливать концентрацию протеинов и липидов.

3. Метод оптической диагностики рака кожи человека, использующий данные о содержании в тканях кожи меланина и порфиринов (анализ спектров автофлуоресценции), липидов и протеинов (анализ Рамановских полос деформационных колебаний $\delta(\text{CH}_2)$ в коллагене, деформационных колебаний $\delta(\text{CH})$ и валентных колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ в протеинах и липидах, симметричных колебаний $\delta(\text{CH}_3)$ в метиловой группе протеинов), и позволяющий достичь точности 0.92 (0.89 чувствительность, 0.93 специфичность). Метод основывается на одновременном использовании данных автофлуоресцентного анализа и Рамановской спектроскопии, и позволяет проводить неинвазивную оптическую биопсию тканей кожи.
4. Метод оптического детектирования патологий почек человека, использующий данные о композиции протеинов и липидов (анализ Рамановских полос деформационных колебаний $\delta(\text{CH})$ в протеинах и липидах, валентных колебаний $\nu(\text{C}=\text{O})$ и $\nu(\text{COO})$ в липидах и фосфолипидах), и позволяющий достичь точности 0.96 (0.94 чувствительность, 0.99 специфичность). Метод использует данные Рамановского анализа при возбуждении сигнала излучением с центральной длиной волны 785 нм, и позволяет устанавливать наличие патологий почек при неинвазивном спектральном анализе тканей кожи предплечья человека.
5. Сверточный нейросетевой классификатор, использующий сверточные, рекуррентные и полносвязные слои, и позволяющий добиться значения ROC AUC равного 0.96 при выделении злокачественных и доброкачественных новообразований кожи за счет применения глубокого обучения. Классификатор выделяет наиболее информативные спектральные полосы в Рамановских спектрах и позволяет добиться устойчивой классификации тканей даже для зашумленных спектральных данных.

Основные результаты работы:

1. Разработана методика регистрации спектральных характеристик тканей кожи, удовлетворяющая требованиям стандарта безопасности при использовании лазерных диагностических устройств.

2. Разработана методика неинвазивной диагностики социально значимых заболеваний человека, использующая информацию об автофлуоресцентном и Рамановском отклике тканей кожи, а также позволяющая выделять наиболее информативные для классификации участки спектров при использовании проекции на латентные структуры и сверточных нейронных сетей.
3. Собрана база данных спектральных характеристик тканей кожи человека, включающая 617 образцов новообразований кожи, 617 образцов нормальной ткани кожи от пациентов с новообразованиями кожи, 85 образцов нормальной ткани кожи от людей с заболеваниями почек, 248 образцов нормальной ткани кожи от людей без системных заболеваний.

Научная новизна

1. Показана возможность использования мультимодальных оптических данных «оптической биопсии» для эффективной классификации тканей кожи человека за счет раскрытия механизмов влияния отдельных компонентов тканей кожи человека на образование итогового вида спектров автофлуоресценции и Рамановского рассеяния.
2. Впервые экспериментально продемонстрирована возможность выявления новообразований кожи человека *in vivo* при использовании мультимодальной «оптической биопсии» с Рамановским сигналом с низким соотношением сигнал-шум.
3. Впервые показана возможность диагностики патологий почек человека при неинвазивном оптическом исследовании тканей кожи предплечья за счет выявления продуктов метаболизма при анализе Рамановского спектра рассеяния.
4. Показана возможность существенного увеличения точности диагностики типа ткани кожи (более чем на 16%) при использовании нейросетевых классификаторов на основании сравнительного анализа результатов классификации большого набора данных спектральных характеристик рассеяния тканей кожи человека с применением метода проекции на латентные структуры и сверточных нейронных сетей.
5. Разработана методика проведения кросс-валидации данных Рамановской спектроскопии с низким соотношением сигнал-шум. Представлены результаты тестирования моделей классификации тканей кожи человека на устойчивость.

- б. Впервые продемонстрирована возможность неинвазивного выявления новообразований кожи и патологий почек с применением единой Рамановской системы.

Научная и практическая значимость

В работе представлены новые фундаментальные знания о возможности использования данных автофлуоресцентного отклика и Рамановском рассеянии тканей кожи человека при диагностике таких социально значимых заболеваний как рак и патологии почек. Получены новые данные о возможности комплексного анализа тканей кожи с применением данных «оптической биопсии» с использованием длины волны возбуждения 785 нм, которые позволяют установить относительную концентрацию химических компонентов в исследуемой ткани. Разработанная методика классификации тканей кожи человека, использующая информацию об автофлуоресцентном и Рамановском сигналах, возбужденных лазером с центральной длиной волны 785 нм, позволяет достичь точности более 93% (ROC AUC 0.95) при разделении злокачественных и доброкачественных тканей кожи, а также позволяет проводить классификацию различных типов онкологических заболеваний (меланома, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак). Совокупность результатов, полученных в ходе проведённых исследований, можно охарактеризовать как решение крупной научной задачи – разработки универсального метода неинвазивного анализа тканей человека, который может использоваться для диагностики целого ряда заболеваний.

Полученные результаты способствовали развитию нового научного направления, состоящего в использовании «оптической биопсии» тканей кожи для повышения эффективности диагностики неинфекционных социально значимых заболеваний.

Проведённые эксперименты и клинические испытания предложенных методов анализа тканей кожи показали высокую эффективность (точность, чувствительность, специфичность, ROC AUC) выявления изменений в тканях кожи и, как следствие, высокую эффективность определения наличия того или иного заболевания.

Разработанная методика регистрации, последующей предобработки и анализа Рамановских сигналов с низким соотношением сигнал-шум может способствовать развитию недорогих, но надежных оптических устройств, которые с успехом могут быть внедрены в массовые скринговые исследования населения с целью раннего выявления заболеваний.

О востребованности результатов проведенных исследований свидетельствуют высокая цитируемость работ автора диссертации в целом (более 560 цитат на июнь 2022 г. для основных публикаций), а также цитирование в ведущих научных журналах и монографиях.

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствии с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами «Оптическая когерентная томография для визуализации онкопатологий» Минобр, (№1.9-519-007-019, 2011-2013), «Оптическая когерентная томография и Рамановская спектроскопия для выявления рака легкого» Минобр (№14в.37.21.1238, 2012-2013), «Разработка методов оптической биопсии» Минобр (№28В-Б-009-096, 2014-2015), «Моделирование, мультипараметрический анализ биомедицинских сигналов, инструменты и методы неинвазивной диагностики» Минобр (№34-17-096, 2016), Параметры Рамановского рассеяния и автофлуоресценции как предикторы заболеваний у пациентов с трансплантированной почкой» РФФИ (№17-42-630907, 2017-2018), «Исследование опухолей с мультиспектральной цифровой голографической микроскопией на основе акустооптической фильтрации» РФФИ (№17-38-50145, 2017-2018), «Novel bio-optical methods for determination of chemical and conformational reorganization of collagen-based tissue structures in vitro and in vivo» National Science Fund of Bulgaria (№ФНИ-МОН - #КПО6-Н28/11/14.12.18, 2018 - 2020), «Анализ оптических свойств кожи как предикторов хронических заболеваний» Грант президента РФ (№МК-1888.2019.2, 2019-2020), «Мультивариативный анализ рака кожи на основе Рамановской и флуоресцентной спектроскопии» РФФИ (Bulgarian academy of sciences) (№19-52-18001 Болг_а, 2019-2020), «Оптическое метаболомное и протеиномное профилирование в оценке сердечно-сосудистого ремоделирования и прогноза у пациентов с клиническими формами атеросклероза и хронической болезнью почек», РФФИ (№21-75-10097, 2021-2023г.).

Достоверность представленных научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их соответствием результатам, полученным другими авторами. Основные результаты работы прошли оценку независимых рецензентов с последующим опубликованием в российских и международных научных журналах.

Апробация работы.

Работы, изложенные в диссертации, осуществлялись в соответствии с программами научно-исследовательских работ, поддерживаемых грантами:

1. Оптическая когерентная томография для визуализации онкопатологий. Минобр, (№1.9-519-007-019, 2011-2013).
2. Оптическая когерентная томография и Рамановская спектроскопия для выявления рака легкого. Минобр, (№14в.37.21.1238, 2012-2013).
3. Разработка методов оптической биопсии. Минобр, (№28В-Б-009-096, 2014-2015).
4. Моделирование, мультипараметрический анализ биомедицинских сигналов, инструменты и методы неинвазивной диагностики. Минобр, (№34-17-096, 2016).
5. Параметры Романовского рассеяния и автофлуоресценции как предикторы заболеваний у пациентов с трансплантированной почкой. РФФИ, (№17-42-630907, 2017-2018).
6. Исследование опухолей с мультиспектральной цифровой голографической микроскопией на основе акустооптической фильтрации. РФФИ, (№17-38-50145, 2017-2018).
7. Novel bio-optical methods for determination of chemical and conformational reorganization of collagen-based tissue structures in vitro and in vivo. National Science Fund of Bulgaria, (№ФНИ-МОН - #КП06-Н28/11/14.12.18, 2018 - 2020).
8. Анализ оптических свойств кожи как предикторов хронических заболеваний. Грант президента РФ, (№МК-1888.2019.2, 2019-2020).
9. Мультивариативный анализ рака кожи на основе рамановской и флуоресцентной спектроскопии. РФФИ (Bulgarian academy of sciences). (№19-52-18001 Болг_a, 2019-2022).
10. Оптическое метаболомное и протеиномное профилирование в оценке сердечно-сосудистого ремоделирования и прогноза у пациентов с клиническими формами атеросклероза и хронической болезнью почек. РФФИ (№21-75-10097, 2021-2024)

Основные результаты, изложенные в диссертации, докладывались на международных конференциях: Saratov Fall Meeting (2012-2021), Саратов Россия, Russian-Chinese workshop on biophotonics (2020-2021) Online, European Conferences on Biomedical Optics (ECBO) Munich, Germany (2019-2021), International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT) (2015 - 2017), Photonics Asia, Beijing, China (2016), 3rd International Conference on BioPhotonics, Florence, Italy (2015), Winter Symposium on Chemometrics, Saratov, Moscow (2020 - 2022), Самарский конкурс-конференция работ по оптике и лазерной физике, Самара

(2012-2021), Международная конференция и молодёжная школа «Информационные технологии и нанотехнологии», Самара (2020-2021) и другие.

Личный вклад соискателя.

Большая часть экспериментальных результатов была получена лично соискателем, а также совместно с коллегами научных групп в рамках сотрудничества при выполнении совместных грантов и проектов. Автор принимал непосредственное участие в постановке задач исследований, получении экспериментальных результатов, обработке и анализе данных и публикации результатов, представленных в диссертации. Экспериментальные исследования и обсуждение результатов проводились на кафедре лазерных и биотехнических систем Самарского университета. Клинические исследования проводились совместно с врачами Самарского Государственного медицинского университета, Самарского Областного Клинического Онкологического Диспансера и Самарской областной клинической больницы им. В.Д. Середавина.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 85 научных работ, в том числе 25 научных статей, включённых в перечень рекомендованных ВАК, и входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus, 48 статей в сборниках трудов конференций, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus, и 3 главы в монографиях.

Структура диссертации

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, шести глав, заключения, списка использованных источников (320 наименований) и трех приложений. Общий объём, включая 187 страниц основного текста с 29 рисунками и 19 таблицами, список использованных источников на 38 страницах и приложения на 4 страницах, составляет 251 страницу.

Благодарности

Автор работы выражает глубокую признательность всем своим коллегам: заведующему кафедрой лазерных и биотехнических систем Самарского университета, своему научному консультанту, профессору Захарову Валерию Павловичу, сотрудникам НИЛ-96 «Фотоника»; коллегам из Самарского государственного медицинского университета, с которыми были проведены исследования в условиях клиники по возможности диагностики новообразований кожи и по возможности диагностики патологий почек.

Благодарю за поддержку родителей Алексея Анатольевича и Марину Ивановну Братченко, дочь Софию.

Неоценима помощь любимой жены =* и неутомимого ученого-исследователя Людмилы Алексеевны Братченко.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:

Научные статьи в ведущих рецензируемых журналах, включённых в перечень ВАК:

- 1 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., et al. Diagnostics of skin pathologies based on spectral analysis of backward and Raman scattering // Optics and Spectroscopy. – 2013. – Т. 115. – №. 2. – С. 182-186.
- 2 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., et al. Raman spectroscopy diagnosis of skin tumor // Physics of wave processes and radio systems. – 2013. – Т. 16. – №. 3. – С. 73-78.
- 3 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., Myakinin O.O. et al. Multimodal diagnosis and visualisation of oncologic pathologies // Quantum Electronics 2014. — Vol. 44. Issue 8. — P. 726-731.
- 4 Братченко И.А., Захаров В.П., Артемьев Д.Н. и др. Возможности спектроскопии комбинационного рассеяния для дифференциальной диагностики новообразований кожи // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. — 2015. — № Т. 17, № 2(3). — С. 542-547.
- 5 Bratchenko I.A., Alonova M.V., Myakinin O.O. et al. Hyperspectral visualization of skin pathologies in visible region // Computer Optics 2016. — Vol. 40. Issue 2. — P. 240-248.
- 6 Sherendak V.P., Bratchenko I.A., Myakinin O.O. et al. Hyperspectral *in vivo* analysis of normal skin chromophores and visualization of oncological pathologies // Computer Optics 2019. — Vol. 43. Issue 4. — P. 661-670.

7 Shatskaya A.A., Artemyev D.N., Bratchenko I.A. Modeling of Fiber Optic Probes for Selective Fluorescence Sensing of Multilayered Biological Tissues // Journal of Applied Spectroscopy 2020. — Vol. 87. Issue 1. — P. 112-120.

8 Bratchenko I.A., Khristoforova Y.A., Bratchenko L.A. et al. Optical biopsy of amelanotic melanoma with raman and autofluorescence spectra stimulated by 785 nm laser excitation // Journal of Biomedical Photonics and Engineering 2021. — Vol. 7. Issue 2.

9 Vinokurov V. O., Matveeva I.A., Khristoforova Y.A. et al. Neural network classifier of hyperspectral images of skin pathologies // Computer Optics 2021. — Vol. 45. Issue 6. — P. 879-886.

10 Al-Sammarraie S. Z. et al. Silver Nanoparticles-Based Substrate for Blood Serum Analysis under 785 nm Laser Excitation //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2022. – C. 010301.

Научные статьи в ведущих рецензируемых журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus:

1 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. Comparative analysis of combined spectral and optical tomography methods for detection of skin and lung cancers // Journal of Biomedical Optics 2015. — Vol. 20. Issue 2. 025003. 027005.

2 Bratchenko I.A., Artemyev D.N., Myakinin O.O. et al. Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions // Journal of Biomedical Optics 2017. — Vol. 22. Issue 2.

3 Polschikova O.V., Machikhin A.S., Ramazanova A.G. et al. An Acousto-Optic Hyperspectral Unit for Histological Study of Microscopic Objects // Optics and Spectroscopy 2018. — Vol. 125. Issue 6. — P. 1074-1080

4 Bratchenko I.A., Artemyev D.N., Khristoforova Y.A. et al. Use of Raman spectroscopy to screen diabetes mellitus with machine learning tools: Comment // Biomedical Optics Express 2019. — Vol. 10. Issue 9. — P. 4489-4491.

5 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Myakinin O.O. et al. Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by Raman and autofluorescence analysis // Journal of Biophotonics 2019. — Vol. 12. Issue 4.

6 Bratchenko I. A. et al. Comment on" Use of Raman spectroscopy in the assessment of skin after CO₂ ablative fractional laser surgery on acne scars" // Skin Research and Technology. – 2019. – T. 26. – №. 1. – C. 146-147.

7 Bratchenko L.A., Bratchenko I.A., Lykina A. A. et al. Comparative study of multivariate analysis methods of blood Raman spectra classification // Journal of Raman Spectroscopy 2020. — Vol. 51. Issue 2. — P. 279-292.

8 Borisova E.G., Bratchenko I.A., Khristoforova Y.A. et al. Near-infrared autofluorescence spectroscopy of pigmented benign and malignant skin lesions // Optical Engineering 2020. — Vol. 59. Issue 6.

9 Bratchenko I.A., Bratchenko L.A., Moryatov A.A. et al. In vivo diagnosis of skin cancer with a portable Raman spectroscopic device // Experimental Dermatology 2021. — Vol. 30. Issue 5. — P. 652-663.

10 Bratchenko L.A., Khristoforova Y.A., Moryatov A.A. et al. Raman spectroscopy based diagnosis of dermatofibrosarcoma protuberans: Case report // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 2021. — Vol. 35.

11 Bratchenko I.A., Bratchenko L.A. On the effect of excessive solar exposure on human skin: Confocal Raman spectroscopy as a tool to assess advanced glycation end products: Comment // Vibrational Spectroscopy 2021. — Vol. 115.

12 Bratchenko L.A., Bratchenko I.A., Khristoforova Y.A. et al. Raman spectroscopy of human skin for kidney failure detection // Journal of Biophotonics 2021. — Vol. 14. Issue 2.

13 Bratchenko I. A., Bratchenko L. A. Comment on “Combining derivative Raman with autofluorescence to improve the diagnosis performance of echinococcosis” // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2021. – T. 252. – C. 119514.

14 Bratchenko I. A., Bratchenko L. A. Comment on “Finding reduced Raman spectroscopy fingerprint of skin samples for melanoma diagnosis through machine learning” // Artificial Intelligence in Medicine. – 2022. – T. 125. – 102252.

15 Bratchenko I.A., Bratchenko L.A., Khristoforova Y.A., Moryatov A.A., Kozlov S.V., et al. Classification of skin cancer using convolutional neural networks analysis of Raman spectra. Computer Methods and Programs in Biomedicine. -2022. -106755.

Статьи в сборниках трудов международных конференций, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования WoS и Scopus, а также публикации в иных изданиях:

1 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., Kozlov S.V. et al. Two-step Raman spectroscopy method for tumor diagnosis // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2014. — Vol. 9129.

2 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., Kozlov S.V. et al. Advances in tumor diagnosis using OCT and Raman spectroscopy // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2014. — Vol. 9129.

- 3 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., Myakinin O.O. et al. Combined Raman spectroscopy and autofluorescence imaging method for in vivo skin tumor diagnosis // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2014. — Vol. 9198.
- 4 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. Skin neoplasm diagnostics using combined spectral method in visible and near infrared regions // 2015 International Conference on BioPhotonics, BioPhotonics 2015. – 2015. – C. 1-4.
- 5 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. Combined autofluorescence and Raman spectroscopy method for skin tumor detection in visible and near infrared regions // Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE. — 2015. — Vol. 9537.
- 6 Bratchenko I.A., Artemyev D.N., Myakinin O.O. et al. Complex optical method of cancer detection and visualization // 2015 International Conference on BioPhotonics, BioPhotonics 2015. – 2015. – T. 1. – №. 3. – C. 186-192.
- 7 Myakinin O.O., Zakharov V.P., Bratchenko I.A. et al. Dermoscopy analysis of RGB-images based on comparative features // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2015. — Vol. 9599.
- 8 Zherdeva L.A., Bratchenko I.A., Myakinin O.O. et al. In vivo hyperspectral imaging and differentiation of skin cancer // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2016. — Vol. 10024.
- 9 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Myakinin O.O. et al. Comparison of Raman spectroscopy equipment for tissues and biofluids analysis // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2016. — Vol. 9887.
- 10 Bratchenko I.A., Khristoforova Y.A., Myakinin O.O. et al. Fluorescence spectroscopy for neoplasms control // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2016. — Vol. 9887.
- 11 Artemyev D.N., Bratchenko I.A., Khristoforova Y.A. et al. Blood proteins analysis by Raman spectroscopy method // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2016. — Vol. 9887.
- 12 Zherdeva L.A., Bratchenko I.A., Alonova M.V. et al. Hyperspectral imaging of skin and lung cancers // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2016. — Vol. 9887.
- 13 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. NIR autofluorescence skin tumor diagnostics // Proceedings – 2016 International Conference Laser Optics, LO 2016. — 2016. — P. S217.

14 Borisova E., Genova T., Troyanova P. et al. Microscopic and macroscopic spectral peculiarities of cutaneous tumours // Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE. — 2017. — Vol. 10592.

15 Myakinin O.O., Bratchenko I.A., Zakharov V.P. Multimodal method of virtual biopsy for skin cancer diagnosis // Optics InfoBase Conference Papers. — 2017. — Vol. Part F66-FiO 2017.

16 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. In vivo diagnostics of malignant and benign tumors with low-cost Raman spectrometer // Optics InfoBase Conference Papers. — 2017. — Vol. Part F66-FiO 2017.

17 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. Optical diagnostics of malignant and benign skin neoplasms // Procedia Engineering. — 2017. — Vol. 201. — P. 141-147.

18 Moryatov A.A., Kozlov S.V., Kaganov O.I. et al. Raman spectroscopy of skin neoplasms // AIP Conference Proceedings. — 2017. — Vol. 1882.

19 Lykina A. A., Artemyev D.N., Bratchenko I.A. et al. Raman spectra analysis of human blood protein fractions using the projection on latent structures method // CEUR Workshop Proceedings. — 2017. — Vol. 1900. — P. 64-68

20 Shamina L.A., Bratchenko I.A. The combination of Raman spectroscopy and Autofluorescence analysis for estimation of blood and urine homeostasis // CEUR Workshop Proceedings. — 2017. — Vol. 1900. — P. 90-93

21 Bourdine A.V., Artemyev D.N., Bratchenko I.A. et al. Development of alternative fiber optic Raman probes based on optical fibers with written precision micro-structure defects // Journal of Physics: Conference Series. — 2018. — Vol. 1096. Issue 1.

22 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Myakinin O.O. et al. In vivo NIR Raman and autofluorescence spectroscopies of skin neoplasms // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2018. — Vol. 10753.

23 Shamina L.A., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. Analysis of correlation between Raman and autofluorescence human skin response in visible and NIR region // Journal of Physics: Conference Series. — 2018. — Vol. 1096. Issue 1.

24 Bourdine A.V., Artemyev D.N., Bratchenko I.A. et al. Experimental research of fusion splicer software settings impact on micro-lensed optical fiber configuration and geometry parameters // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2018. — Vol. 10774.

25 Lykina A. A., Artemyev D.N., Kukushkin V.I. et al. Raman spectroscopy for kidney tissue and its neoplasms research // Journal of Physics: Conference Series. — 2018. — Vol. 1096. Issue 1.

26 Shamina L.A., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. Comparative study of human blood Raman spectra and biochemical analysis of patients with cancer // *Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE*. — 2018. — Vol. 10716.

27 Bratchenko I. A. et al. Analysis of human skin Raman and autofluorescence as predictors of chronic diseases (Conference Presentation) // *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI*. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – T. 10685. – C. 106850N.

28 Lykina A. A., Artemyev D.N., Kukushkin V.I. et al. Multivariate analysis of tissues Raman spectra using regression methods // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2019. — Vol. 1368. Issue 2.

29 Bourdine A.V., Artemyev D.N., Bratchenko I.A. et al. Research of laser beam profile structure dependence on micro-lensed optical fiber configuration // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. — 2019. — Vol. 11146.

30 Lykina A. A., Artemyev D.N., Bratchenko I.A. et al. Total protein measurement features in venous and capillary blood using Raman spectroscopy method // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. — 2019. — Vol. 11140.

31 Khristoforova Y., Bratchenko I., Myakinin O. et al. In vivo multimodal optical biopsy of skin cancer // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. — 2019. — Vol. 11140.

32 Khristoforova Y., Bratchenko I., Bratchenko L. et al. In vivo Raman and autofluorescence study of the pigmented skin neoplasms // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2019. — Vol. 1368. Issue 2.

33 Borisova E., Gisbrecht A., Genova-Hristova T. et al. Multispectral autofluorescence detection of skin neoplasia using steady-state techniques // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. — 2019. — Vol. 11047.

34 Bratchenko L.A., Bratchenko I.A., Artemyev D.N. et al. Conventional Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy of ascitic fluid // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2019. — Vol. 1368. Issue 2.

35 Zakharov V.P., Bratchenko L.A., Khristoforova Y.A. et al. Multiparametric spectral diagnosis of skin cancer // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. — 2020. — Vol. 11363.

36 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Bratchenko L.A. et al. Optical biopsy of skin cancer based on Raman and fluorescence spectroscopy // *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering*. — 2020. — Vol. 11582.

37 Khristoforova Y., Bratchenko I., Borisova E. et al. The study of ex vivo and in vivo skin neoplasms using near-infrared fluorescence spectroscopy // Proceedings of ITNT 2020 – 6th IEEE International Conference on Information Technology and Nanotechnology. — 2020. — C. 1-4.

38 Borisova E., Genova T., Mircheva V. et al. Multispectral fluorescence detection of pigmented cutaneous tumours // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2020. — Vol. 11585.

39 Matveeva I.A., Myakinin O.O., Khristoforova Y.A. et al. Possibilities for decomposing Raman spectra of amino acids mixture by Multivariate Curve Resolution (MCR) analysis // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2020. — Vol. 11582.

40 Bratchenko L., Abrosimova E. A., Stafeev S. et al. Conventional Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy for human skin components analysis // Proceedings of ITNT 2020 – 6th IEEE International Conference on Information Technology and Nanotechnology. — 2020. — C. 1-3.

41 Matveeva I.A., Myakinin O.O., Khristoforova Y.A. et al. Additive simulation of Raman light scattering from skin cancer using the Monte Carlo method // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2020. — Vol. 11363.

42 Artemyev D.N., Shatskaya A.A., Bratchenko I.A. Fiber probe configurations simulation for depth-resolved skin fluorescence registration // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2020. — Vol. 11363.

43 Matveeva I.A., Myakinin O.O., Vinokurov V. O. et al. Additive approach to simulation of malignant neoplasms using the Monte Carlo method // Journal of Biomedical Photonics and Engineering 2020. — Vol. 6. Issue 3.

44 Serzhantov K.A., Myakinin O.O., Lisovskaya M.G. et al. Comparison testing of machine learning algorithms separability on Raman spectra of skin cancer // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. — 2020. — Vol. 11359.

45 Vinokurov V. O., Khristoforova Yu., Myakinin O. et al. Neural network classifier for hyperspectral images of skin pathologies // OMFI-2021. — 2021. — Vol. 2127. Issue 1.

46 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A., Bratchenko L.A. et al. Detection of amelanotic melanoma on the basis of NIR autofluorescence features // Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE. — 2021. — Vol. 11919.

47 Matveeva I., Khristoforova Y., Moryatov A. et al. Classification of human skin Raman spectra using multivariate curve resolution (MCR) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) // OMFI-2021. — 2021. — Vol. 2127. Issue 1.

48 Mircheva V., Zaharieva L., Ilyov S. et al. Near-infrared autofluorescence spectroscopy and photobleaching detection of melanin-pigmented cutaneous neoplasia // Journal of Physics: Conference Series. — 2021. — Vol. 1859. Issue 1.

49 Zakharov V.P., Bratchenko I.A., et al. Lung neoplasm diagnostics using Raman spectroscopy and autofluorescence analysis // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2015. — T. 1. — №. 1. — С. 70-76.

50 Bratchenko I. A. et al. Malignant melanoma and basal cell carcinoma detection with 457 nm laser-induced fluorescence // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2015. — T. 1. — №. 3. — С. 180-185.

51 Khristoforova Y.A., Bratchenko I.A. et al. Method of autofluorescence diagnostics of skin neoplasms in the near infrared region // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2015. — T. 1. — №. 3. — С. 186-192.

52 Lykina A. A., Artemyev D. N., Bratchenko I. A. Analysis of albumin Raman scattering registration efficiency from different volume and shape cuvette // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2017. — T. 3. — №. 2. — С. 020309.

53 Shamina L.A., Bratchenko I.A., et al. Raman and autofluorescence analysis of human body fluids from patients with malignant tumors // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2017. — T. 3. — №. 2. — С. 020308.

54 Bratchenko I. A. et al. In vivo hyperspectral imaging of skin malignant and benign tumors in visible spectrum // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2018. — T. 4. — №. 1. — С. 5-12.

55 Bratchenko I. A. et al. In vivo hyperspectral analysis of skin hemoglobin and melanin content for neoplasia detection // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2018. — T. 4. — №. 4. — С. 040301.

56 Konovalov S.G., Bratchenko I.A. et al. Dermatoscopy software tool for in vivo automatic malignant lesions detection // J. of Biomedical Photonics & Engineering. — 2018. — T. 4. — №. 4. — С. 040302.

57 Ustinova A. O., Bratchenko I. A., Artemyev D. N. Monte Carlo simulation of skin multispectral autofluorescence // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. — 2019. — T. 5. — №. 2. — С. 020306.

Главы в монографиях:

1 Zakharov V.P., Bratchenko I.A. et al. Multimodal Optical Biopsy and Imaging of Skin Cancer // Neurophotonics and Biomedical Spectroscopy. — Elsevier, 2019. — С. 449-476.

2 Pozhar V.E., Machikhin A.S., Bratchenko I.A. et al. Application of Acousto-Optical Hyperspectral Imaging for Skin Cancer Diagnostics. Cham: Springer nature, 2020. — 32 p.

3 Bratchenko I. A., Artemev D.N., Khristoforova Yu.A. et al. Raman Spectroscopy Techniques for Skin Cancer Detection and Diagnosis. Cham: Springer Nature, 2020. – 35 p.

Патенты

1 Захаров В.П., Корнилин Д.В., Братченко И.А. Источник лазерного излучения с каналом приема для рамановской спектроскопии кожных новообразований. Патент №124576 получен 18.02.2013.

2 Братченко И.А., Гришанов В.Н., Захаров В.П. Устройство диагностики рака кожи. Патент №2506049 получен 19.02.2014.

3 Козлов С.В., Захаров В.П., Морятов А.А., Братченко И.А. Способ неинвазивной дифференциальной диагностики новообразований кожи. Патент №2551978 получен 10.06.2015.

4 Шамина Л.А., Захаров В.П., Тупикова Е.Н., Братченко И.А., Платонов В.И. Измерительная камера микросистемы оптического анализа биожидкости. Патент №189240 получен 27.05.2019.

5 Захаров В.П., Братченко И.А., Мякинин О.О., Козлов С.В., Морятов А.А., Христофорова Ю.А., Артемьев Д.Н. Способ оптической биопсии рака кожи на основании синхронного анализа рамановского и флуоресцентного сигналов. Заявка на патент, 2020.

1. АНАЛИЗ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА БИОТКАНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАМАНОВСКОЙ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

При многократном рассеянии оптического излучения в биотканях фотоны испытывают множество взаимодействий, включая поглощение, упругое и неупругое рассеяние, переизлучение, флуоресценцию, фосфоресценцию и многие другие. Поэтому поток отраженного от биоткани излучения содержит множество информации о биохимическом и морфологическом составе ткани, включая информацию о наличии и стадии заболевания [1]. Однако извлечение такой биохимической информации из оптических спектров является очень сложной задачей. Связь между рассеянием биоткани, эмиссионными свойствами и микроструктурой биоткани в значительной степени зависит от способа возбуждения спектров, сбора рассеянного излучения и математической обработки спектров. Хорошо известно, что сочетание нескольких методов анализа может повысить качество и точность диагностики [2]. В этом отношении оптические методы открывают многообещающие перспективы для разработки мультимодальных, неинвазивных и недорогих подходов, а также компактных и портативных устройств для диагностики состояния биотканей с высокой точностью (чувствительностью и специфичностью).

Одной из самых перспективных областей применения оптических методов анализа в исследовании биотканей является оптическая биопсия. При обычной биопсии врач забирает часть материала ткани, окрашивает его специальным образом и далее исследует под обычным световым микроскопом на предмет изменения морфологических признаков исследуемой биоткани. При этом существует риск косметической травмы пациента, риск развития метастазов при осуществлении биопсии новообразования, а также риск того, что врач неверно интерпретирует результаты анализа микроскопического строения исследуемой биоткани [3].

Развитие методов оптической биопсии связано в первую очередь с необходимостью анализа биотканей на предмет развития новообразований, хотя существует и ряд других заболеваний, когда врачам требуется провести биопсию. В данной главе подробно будет описана необходимость проведения оптической биопсии при диагностике рака кожи; в последующих главах будут приведены примеры необходимости проведения биопсии при

развитии патологий почек, развитии диабета и других неинфекционных заболеваниях человека.

Рак кожи является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований. Несвоевременное выявление рака кожи может спровоцировать его рост и распространение метастазов во внутренние органы. Сегодня более половины случаев заболевания раком кожи обнаруживаются на поздних стадиях, что является прямой угрозой жизни пациента [4]. Среди других опухолей кожи злокачественная меланома кожи занимает особое место. Из-за агрессивного поведения меланомы ответственны за более чем за 85% общей смертности, вызванной злокачественными опухолями кожи. Меланома кожи распределена неравномерно, самые высокие показатели заболеваемости характерны для Австралии и Новой Зеландии (до 40 случаев на 100 тыс. человек), Соединенных Штатов Америки (до 21,1 случая на 100 тыс.), некоторых европейских стран [5]. В 2013 году в США меланома была диагностирована у 76600 американцев, причем 35% пациентов были моложе 45 лет. В России ежегодно регистрируется более полумиллиона новых пациентов со злокачественными новообразованиями, и 14% из этих случаев являются злокачественными новообразованиями кожи. Тем не менее, меланома кожи в России встречается реже, около 8500 новых случаев в год (3,97 новых случаев на 100 тысяч человек), но наблюдается высокий уровень ежегодного роста заболеваемости (с 4,55 до 6,1%) в последние десятилетие. Самарская область в 2017 году занимала первое место среди российских регионов с самой высокой заболеваемостью раком кожи (18,6% среди всех локализаций рака) и высокими показателями заболеваемости злокачественными опухолями (446,6 случая на 100 тысяч человек) [6].

В случае злокачественной меланомы выживаемость пациентов напрямую зависит от стадии заболевания. При удалении меланомы на I стадии 5-летняя выживаемость пациентов составляет 93-97%, в то время как пациенты с меланомами III стадии выживают в первый пятилетний период только в 40-78% случаев [7]. Одной из основных причин этой бесперспективной статистики является низкий уровень выявления рака кожи при профилактических осмотрах. Эффективность диагностики рака кожи у врачей общей практики, как правило, не превышает 40-50% [8]. Кроме того, большой процент ложных диагнозов рака кожи приводит к чрезмерному психологическому стрессу у пациентов и переполненности специализированных онкологических клиник пациентами, у которых наблюдаются только возрастные изменения кожи, папилломы, бородавки и многие другие незлокачественные заболевания кожи [9].

Кожные опухоли и, в частности, меланомы являются уникальными опухолями, которые могут характеризоваться различными клиническими признаками; особенно трудно отличить меланому от других новообразований кожи на начальных стадиях заболевания. Потенциально опасные пигментные или пигментированные новообразования кожи могут быть выявлены при визуальном осмотре более чем у 90% населения [10]. Длительное наблюдение или неадекватное лечение, приводящее к быстрому росту и распространению новообразования с предсказуемым исходом, может быть следствием неудачи в диагностике меланомы. Наоборот, гипердиагностика меланомы может привести к чрезмерно большому объему хирургического вмешательства и серьезным косметическим дефектам. Несмотря на значительные успехи в системной медикаментозной терапии меланомы кожи, результаты 5-летней выживаемости больше всего зависят от своевременной и эффективной диагностики и адекватного объема хирургического лечения [11]. Поэтому разработка методов ранней и уточняющей диагностики меланомы кожи остается актуальной.

Традиционно обследование поражений кожи основано на визуальном осмотре, который может быть дополнен дерматоскопическим анализом [12], что улучшает качество диагностики. При дерматоскопическом осмотре врач оценивает изменение формы и пигментацию опухоли, которые трудно обнаружить невооруженным глазом [13]. Например, кроссполяризационный дерматоскоп [14] или иммерсионный дерматоскоп [15] получают изображения патологий, которые позволяют включать дополнительные критерии в обследование подозрительных кожных тканей по сравнению со стандартными правилами ABCD [16] или 7-балльным контрольным списком [17]. Дерматоскопический анализ может включать мониторинг более специфически связанных опухолевых особенностей, таких как атипичная пигментация и сосудистые сети, а также так называемая бело-голубая вуаль, которая представляет собой серо-белый узор с хорошо заметным синим тоном [18]. Однако применение таких продвинутых критериев довольно сложно для не обученного медицинского специалиста. Более точные методы и сложные критерии требуют более обученных и квалифицированных кадров. Таким образом, результат дерматоскопического анализа напрямую зависит от квалификации врача-специалиста, проводящего визуальную диагностику. Детальный анализ морфологических структур новообразований и отклонений от нормальных тканей кожи может проводить только опытный онколог с многолетней практикой [19]. Таким образом, определение наличия или отсутствия злокачественной опухоли является важной задачей для онколога, поскольку правильный предварительный диагноз является основой дальнейшего эффективного лечения опухоли.

Одним из возможных способов повышения точности ранней диагностики является разработка скринингового анализа, который может помочь врачам общей практики определить наличие злокачественной патологии кожи. Существует несколько методов и методов диагностики рака кожи, которые в настоящее время используются в клинической практике [2]:

Фотодинамическая диагностика. Чтобы обнаружить присутствие опухолевых клеток, светочувствительный маркер может быть введен в конкретный участок кожи с образованием протопорфирина IX в результате химических реакций. Протопорфирин IX накапливается в опухолевых клетках, а затем после освещения новообразования определенным излучением опухолевые клетки начинают флуоресцировать. Таким образом, фотодинамическая диагностика поражений кожи основана на флуоресцентных свойствах экзогенных и эндогенных соединений. Однако введение экзогенных флуорофоров в организм пациента является обязательной частью диагностической процедуры, что делает фотодинамический метод неприемлемым для массового скрининга [20, 21].

Сонография на основе отражения акустических волн от неоднородностей исследуемой биоткани. Обычно этот метод используется для оценки глубины поражения кожи перед проведением биопсии, а также для классификации соседних лимфатических узлов. Обладает способностью дифференцировать доброкачественные опухоли от злокачественных. Точное измерение толщины поражения раком кожи является одним из главных преимуществ сонографии, поскольку оно помогает определить поля для удаления и правильно спланировать операцию, а основным недостатком является низкая специфичность сонографического анализа [22].

Электрический биоимпеданс. Локальный электрический импеданс кожи определяется высоким сопротивлением рогового слоя и сильно зависит от гидратации или структуры рогового слоя, особенно на низких частотах. При этом требуется исключить измерения рогового слоя для измерения эпидермиса и дермы. Для этого используются микроиглы. Данный метод демонстрирует способность обнаружения меланомы; однако общая точность идентификации опухоли остается относительно низкой, что делает сомнительным применение электрического биоимпеданса в клинической практике [23].

Термография. Инфракрасная визуализация может предоставить обширную информацию о процессах, ответственных за выработку тепла и терморегуляцию кожи, в частности об отклонениях от нормальных условий, часто вызванных болезнями. Например, повышенная метаболическая активность меланомы может быть обнаружена с помощью

динамической термографии, которая включает в себя предварительное охлаждение опухоли для увеличения температурных различий между опухолью и окружающей здоровой тканью [24]. Динамическая термография сильно зависит от коррекции движения, пространственного разрешения и температурной чувствительности, особенно при распознавании небольших опухолей. Поэтому эффективность термографии недостаточна для выявления опухолей на ранних стадиях и в основном используется для анализа опухолей на поздних стадиях.

Оптическая спектроскопия. Принципы проведения спектрального анализа были описаны выше. Достоинствами оптического анализа по аналогии с дерматоскопическим исследованием является полная неинвазивность, обеспечивающая комфорт пациента наряду с высокой точностью обнаружения новообразований.

В последние десятилетия для обнаружения и визуализации рака был использован ряд оптических методов, включая конфокальную микроскопию [25], оптическую когерентную томографию (ОКТ) [26], многофотонную томографию (МФТ) и т.д. Например, МФТ в сочетании с измерением времени жизни флуоресценции (FLIM) может обеспечить визуализацию ткани без дополнительных меток с субклеточным разрешением и, таким образом, значительно повышает общую точность диагностики опухолей [27]. МФТ/FLIM может применяться с использованием быстродействующей электроники и сложного оборудования, что затрудняет исследование на сложных участках тела или неровных поверхностях [28]. ОКТ-изображения можно использовать для анализа морфологических, фрактальных и текстурных особенностей онкологических патологий [29], но возможность диагностики опухоли с этими признаками все еще обсуждается научными коллективами [30], поскольку злокачественные и особенно предраковые опухоли не имеют характерных особенностей [31].

Следует особо отметить, что система скрининга должна быть чувствительной к изменениям в биохимическом составе кожи и способной определять природу новообразований. Поэтому крайне перспективным выглядит применение оптической биопсии [3] с использованием Рамановской спектроскопии (RS) и/или автофлуоресцентного (AF) анализа [32, 33]. RS основана на неупругом рассеянии оптического излучения при взаимодействии с молекулярными связями компонентов биотканей. Рамановский спектр содержит характерные полосы, обусловленные присутствием определенных химических связей в исследуемом объекте, что делает каждый спектр своеобразным «отпечатком пальца» каждого новообразования [34]. Таким образом, применение RS позволяет обнаруживать изменения химического состава патологий по

сравнению со здоровой кожей. Важно отметить, что в дополнение к Рамановскому сдвигу рассеянный свет содержит сигнал AF, получаемый после взаимодействия зондирующего излучения с биотканями. Спектральные свойства AF сигнала зависят от наличия эндогенных флуорофоров в тканях [35]. В целом, AF исследования опухолей показывают более низкую точность по сравнению с RS [36], но AF характеризуется гораздо более высокой интенсивностью, что позволяет регистрировать сигналы в течение короткого периода и быстро сканировать обширные области биотканей. Следовательно, существует необходимость в клинических испытаниях для оптимизации эффективности и валидации RS и AF подходов в диагностических целях [37].

Применение RS для исследования рака кожи представлено в многочисленных исследованиях [38-40]. Оптическая биопсия на основе применения RS и AF демонстрирует высокий уровень точности (более 90%) в диагностике рака кожи [40-43]. Многие исследовательские группы [39, 44, 45] пытаются повысить эффективность диагностики с помощью более чувствительного (высокое спектральное разрешение, детекторы с глубоким охлаждением и т.д.) и, следовательно, более дорогостоящего оборудования. Действительно, методы RS и AF основаны на обнаружении спектральных различий опухоли и нормальной ткани, и увеличение спектрального разрешения должно, по-видимому, приводить к повышению эффективности распознавания типа рака. Однако анализ морфологически разных опухолей выявляет значительную биохимическую общность между ними, что может быть объяснено относительной однородностью ферментативного набора и ферментативной активности опухолей, а также относительным сходством состава, содержания и биохимической активности специфических химических компонент [46]. Таким образом, существует предельная («физиологическая») точность распознавания типа рака, связанная с ограничениями, обусловленными физиологическим сходством химического состава тканей. Физиологические факторы становятся более решающими в процедуре распознавания, чем спектральное разрешение устройства. В настоящее время высокий потенциал RS обеспечивает возможность дифференциации типов опухолей с эффективностью, основанной на качестве зарегистрированного сигнала [47]. Эффективность инструментальной диагностики будет зависеть от качества детектируемого Рамановского сигнала, и, очевидно, качество сигнала будет выше в высокочувствительных спектрометрах, чем в упрощенных системах. Однако применение дорогостоящих стационарных систем не всегда возможно или удобно. Поэтому эффективность регистрации Рамановского сигнала различными методами все еще находится в стадии рассмотрения [30].

Рассмотрим далее основные методики анализа биотканей, использующие вариации RS.

Обычное (спонтанное) Рамановское рассеяние света. При освещении биоткани монохроматическим лазерным излучением большая часть света рассеивается на той же частоте. Напротив, неупругое Рамановское рассеяние приводит к сдвигу частоты излучения, пропорциональному разности энергий между колебательными состояниями конкретной молекулярной связи [48]. Возбужденная молекула может уйти из виртуального состояния в одно из колебательных состояний. Такие переходы называются стоксовыми или антистоксовыми, если рассеянный свет имеет более низкую или более высокую частоту, соответственно, чем падающий свет. Как правило, молекула изначально находится в основном колебательном состоянии, поэтому Стоксовы компоненты обычно намного сильнее анти-Стоксовых. Поэтому более широко используется в практических приложениях именно Стоксово рассеяние. Рамановский спектр позволяет выявлять колебательные и вращательные моды молекул, содержащихся в исследуемых биотканях. Положения пиков в Рамановском спектре характеризуют молекулярный состав биоткани, а амплитуда каждого пика зависит от относительной концентрации каждой химической связи в молекулах.

В спонтанной Рамановской спектроскопии, как правило, стоксов сигнал регистрируется при непрерывном освещении лазером с высокой спектральной стабильностью. Интенсивность сигнала увеличивается для коротких длин волн, но собственная флуоресценция ткани также увеличивается, в то время как глубина проникновения света в ткань уменьшается из-за поглощения хромофоров, в частности гемоглобина и меланина, так что соотношение полезного сигнала к общему фону уменьшается. Кроме того, коэффициент поглощения $\mu_a(\lambda)$ в видимом диапазоне сильно зависит от длины волны и типа исследуемой биоткани, что препятствует сопоставлению интенсивностей разных пиков Рамановского рассеяния. Выбор длины волны обычно предполагает компромисс между интенсивностью Рамановского сигнала и уровня AF сигнала исследуемой биоткани, и зависит от конкретной цели исследования. Оптимальные оптические окна для RS исследования кожи составляют от 700 до 900 нм и около 1064 нм [49].

Простота регистрации спонтанного Рамановского сигнала широко использовалась в различных клинических приложениях. Например, спонтанный сигнал RS использовался для оценки косметологического действия кремов на кожу [50], анализа дерматита кожи [51], многочисленных исследований рака кожи [52-54] и многих других применений [49].

Silveria и др. [55] продемонстрировали возможность классификации нормальной кожи от немеланомных злокачественных и предраковых образований с помощью портативной системы Рамановского рассеяния (длина волны возбуждения 830 нм, ПЗС-камера, охлажденная до температуры $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, время регистрации сигнала 20 с). Результаты показали важные спектральные различия между неопухолевыми поражениями и предраковой тканью для липидов (полоса между 1250 см^{-1} и 1300 см^{-1} и около 1450 см^{-1}) и для белков (полоса между 870 см^{-1} и 940 см^{-1} , 1240 см^{-1} и 1271 см^{-1} , а также около 1000 см^{-1} и 1450 см^{-1}).

Конфокальная RS. RS может быть реализована в конфокальной конфигурации, чтобы обеспечить оптическое разделение по глубине путем пространственной фильтрации регистрируемого Рамановского сигнала с помощью точечного отверстия или оптического волокна, чтобы блокировать сигнал вне фокуса. Такой подход улучшает поперечное и осевое разрешение до 2 мкм и менее [56]. Однако время накопления сигнала в каждой точке обычно превышает 5 секунд и увеличивается с глубиной фокусировки в ткани. Конфокальный RS с растровым сканированием создает двумерные изображения с полем зрения, как правило, в диапазоне от 0,01 до 1 мм². Конфокальные Рамановские зонды до сих пор использовались в основном для исследований *ex vivo* и *in vitro* [57, 58].

Конфокальные Рамановские системы стали популярными при изучении свойств отдельных слоев кожи [59]. Zhang с соавт. [60] исследовали гидратацию рогового слоя и содержание коллагена. Результаты исследования [60] и других подобных исследований могут широко использоваться при мониторинге заживления ран, а также при определении старения кожи, в том числе в клинических и судебно-медицинских исследованиях [59, 61]. Таким образом, современные конфокальные методы RS позволяют определять химический состав слоев кожи наряду с измерением толщины слоев [61].

Что касается выявления рака кожи, конфокальная RS была реализована как для *ex vivo*, так и *in vivo* исследований [62]. В то же время для конфокальной реализации RS часто требуется довольно длительное время накопления сигнала, что затрудняет измерения *in vivo*. Lieber с соавт. [41] исследовали немеланомный рак кожи у 19 пациентов, используя портативную Рамановскую систему микроспектроскопии (время накопления сигнала 30 секунд). Они классифицировали 21 немеланомный рак (9 BCC, 4 SCC, 8 воспаленных рубцовых тканей) из 21 среза нормальной кожи со 100% чувствительностью и 91% специфичностью (в результате – 95% точности). Авторы предположили, что спектральные различия между аномальной и нормальной кожей, могут быть связаны с содержанием липидов, которое влияло на пики комбинационного рассеяния 807-814, 1069-1073, 1321-1325 см^{-1} и изменениями триптофана, определяемые Рамановским пиком 1542-1556 см^{-1} .

Когерентная и резонансная RS. В когерентном RS используются два световых пучка (волна накачки и волна Стокса) с частотами ω_p и ω_s соответственно, так что их разность соответствует частоте колебательной моды $\Omega = \omega_p - \omega_s$ для интересующей молекулярной связи. Интенсивность когерентного Рамановского сигнала для разных молекул возрастает по сравнению со спонтанной RS, как правило, в 10^5 раз [63]. Когерентный Рамановский сигнал может быть особенно важен для быстрого получения изображений биотканей. Технологии когерентной RS включают в себя стимулированную Рамановскую спектроскопию (SRS) и когерентную антистоксову Рамановскую спектроскопию (CARS) [64]. Как SRS, так и CARS могут быть использованы в сильно флуоресцирующих средах, что обычно является существенным ограничивающим фактором для получения Рамановских изображений в биотканях.

Такие подходы позволяют получать изображения высокого разрешения в микроскопических подходах. Увеличение разрешения при микроскопическом исследовании приводит к повышению чувствительности медико-биологических исследований [65]. Для исследований кожи это позволяет получать гистологические изображения тканей *in vivo* на разных глубинах. Демонстрация такой техники была выполнена Drutis с соавт. [66]. Авторы исследовали нативную кожу свиньи и продемонстрировали, что SRS микроскопия дает уникальное представление о химической организации кожи, быстро и неинвазивно оценивая слои неповрежденной ткани. Излучение накачки было выбрано на 816,0, 810,6 или 781,3 нм для визуализации кожи, что соответствует Рамановским сдвигам 2850, 2950 или 3340 cm^{-1} соответственно. Основные вклады молекул кожи на этих колебательных частотах могут быть отнесены к колебательным модам липидов, белков и воды. Однако время регистрации сигнала составляло от 30 до 60 секунд только для одной длины волны, что усложняет применение такого метода *in vivo*.

CARS также позволяет визуализировать отдельные слои кожи. Wang с соавт. [67] провели исследование *ex vivo* и *in vivo* срезов кожи и человеческой меланомы с помощью CARS для оценки распределения феомеланина в клетках и тканях. Авторы продемонстрировали возможность отслеживать специфичные для опухоли хромофоры, которые могут быть использованы при обнаружении и классификации рака. Отличительной особенностью здесь является возможность получения изображений в реальном времени по сравнению с ранее описанной методикой когерентного RS. Таким образом, современные когерентные методы RS открывают уникальные возможности анализа кожных тканей и делают возможным проведение оптической биопсии в реальном времени на основе

оптического гистологического исследования живой ткани. Ограничением таких подходов является необходимость очень чувствительных лабораторных установок, которые могут быть использованы только в лабораторных исследованиях. Таким образом, использование SRS и CARS является крайне сложным и дорогостоящим средством массового скрининга, особенно при обследованиях опухолей кожи.

Резонансный RS – это метод SRS, в котором для исследования ткани используется только один лазерный источник, а энергия падающего фотона равна или близка по энергии к электронному переходу специфической связи исследуемой молекулы. Совпадение частот (или резонанс) может привести к значительному увеличению интенсивности Рамановского сигнала и, таким образом, помочь в обнаружении молекул, которые вряд ли можно обнаружить с помощью обычной RS [68]. В исследованиях кожи большинство работ по внедрению резонансных Рамановских методов было связано с анализом содержания каротиноидов. Каротиноиды в коже играют защитную роль, обеспечивая, главным образом, фотозащиту, защиту от эритемы и повреждения солнечным светом. Известно, что каротиноиды гасят синглетный кислород и другие виды свободных радикалов, которые образуются в коже под воздействием ультрафиолетового излучения и могут вызвать повреждения кожи. В нескольких недавних исследованиях изучались потенциальные защитные эффекты каротиноидов от преждевременного фотостарения кожи, отмеченные такими признаками, как морщины, пигментация, сухость и неэластичность [69]. Каротиноиды поглощают свет в сине-зеленой области спектра и, следовательно, могут обеспечивать подходящие условия для резонансного поглощения. Ar + лазеры, генерирующие излучение на длине волны 514,5 нм широко использовались для измерения каротиноидов [70]. Несмотря на огромное разнообразие применений для мониторинга каротиноидов при старении кожи и фотостарении, применение резонансного RS при раке кожи все еще ограничено. Основной причиной такого ограничения является сложный состав опухолей и высокая AF в видимом спектральном диапазоне, который маскирует слабые Рамановские пики.

Liu с соавт. [71] протестировали применение резонансной RS для экспресс-диагностики *ex vivo* рака кожи. Авторы измерили резонансные спектры Рамановского рассеяния для 43 образцов базальноклеточного рака (basal cell carcinoma – BCC) и 12 нормальных тканей при возбуждении лазером с длиной волны 532 нм. Была достигнута чувствительность, специфичность и точность 93%, 100% и 94,5% соответственно. Авторы предположили, что спектры Рамановского рассеяния тканей BCC значительно изменяются по сравнению со спектрами нормальных тканей кожи из-за изменений относительных концентраций

триптофана, каротиноидов, липидов и белков. Была выявлена корреляция между глубиной зависимостью резонансных спектров Рамановского рассеяния и изменением состояния тканей ВСС на молекулярном уровне. При этом предложенная методика исследования обеспечивала только *ex vivo* измерения, и для подтверждения применимости резонансной RS при обнаружении и классификации рака кожи необходимы дальнейшие крупные клинические исследования.

Поверхностно усиленная RS. Низкая интенсивность сигнала, несомненно, является основным ограничением RS. Альтернативой усилению когерентного сигнала является использование эффектов электромагнитного усиления, возникающих вблизи поверхности металла, в том числе металлических наночастиц [72]. Этот подход называется поверхностно усиленной Рамановской спектроскопией (SERS). Во внешнем электромагнитном поле металлические наночастицы генерируют локальный поверхностный плазмонный резонанс, который усиливает возбуждение на частоте накачки и Рамановский сигнал на стоксовой частоте. Коэффициент усиления быстро уменьшается с расстоянием, поэтому молекулы должны находиться в пределах десятков нанометров от металлической поверхности [73]. Ограничения SERS для клинических применений заключаются в том, что реализация зависит от чувствительности биомаркеров заболеваний и наличия соответствующих целевых молекул, а также от потенциальной токсичности и необходимости клинического одобрения каждого контрастного вещества (наночастиц). Следует отметить, что поскольку использование технологии SERS позволяет регистрировать отдельные узкие Рамановские полосы, применение SERS может быть альтернативой анализу биотканей с применением экзогенных флуорофоров.

In vivo SERS анализ кожи требует биологически инертных наноструктур. Наночастицы благородных металлов, таких как золото и серебро, удовлетворяют этим требованиям. Ряд исследований показали возможность применения наночастиц разного типа для применения в клинической практике [74, 75]. Kang с соавт. [76] сообщили о подходе к разработке NIR-чувствительных нанозондов SERS, состоящих из плазмонных полых оболочек Au/Ag, собранных из кремниевых наносфер, и простых ароматических соединений для мультиплексного обнаружения *in vivo*. Однако на данный момент исследования тканей человека с применением методов SERS не одобрены для *in vivo* случаев. Поэтому оценка использования SERS для изученной кожи *in vivo* проводится на животных моделях.

Stuart с соавт. [77] показали первое применение SERS *in vivo* для чрескожного измерения глюкозы. Qian с соавт. описали биосовместимые и нетоксичные наночастицы для целевого обнаружения опухолей *in vivo* у животных на основе пегилированных

наночастиц золота [78]. Авторы обнаружили, что одноцепочечные наночастицы золота, конъюгированные с антителами переменных фрагментов, способны нацеливаться на опухоли *in vivo* в животных моделях. Эти частицы были в 4200 раз ярче, чем излучающие в ближней инфракрасной области квантовые точки, и позволяли спектроскопически обнаружить даже небольшую опухоль (0,03 см³).

Pinzaru с соавт. [79] провели исследование кожи мышей *ex vivo* с индуцированной меланомой. Авторы предложили обычную RS и SERS для молекулярной характеристики меланомы. Спектры Рамановского рассеяния и SERS тканей нормальной, ранней стадии меланомы и прогрессирующей меланомы получали с использованием двух дисперсионных спектрометров. Та же научная группа представила результаты воспроизводимости SERS сигналов *in vivo* и *ex vivo* с кожи мышей и использования SERS спектров для дифференциации патологий кожи [80]. В этом исследовании для анализа образцов тканей кожи использовали лазерную линию 785 нм.

Спектроскопия Рамановского рассеяния с пространственным разрешением (SORS) аналогична обычной RS, различие состоит в том, что Рамановский сигнал собирается из более глубоких слоев ткани путем пространственного смещения собирающего и возбуждающего волокна. Излучение источника возбуждения сигнала многократно упруго рассеивается и проходит некоторое расстояние от источника освещения. Регистрация Рамановского сигнала в различных смещениях эффективно измеряет различные слои исследуемой биоткани. SORS обычно использует зонд с освещающим волокном, окруженным набором собирающих волокон со смещением 1-5 мм [81, 82]; смещение 16 мм было использовано для изучения Рамановского сигнала кости [83]. Поскольку SORS собирает сигнал с глубины биоткани, отношение сигнал/шум уменьшается. Это приводит к увеличению времени накопления сигнала до 30 секунд и более [82].

Применение SORS для выявления и скрининга рака было продемонстрировано для оценки границ опухолей молочной железы [82], выявления рака костей [84], урологии и других приложений [85]. Keller с соавт. [82] продемонстрировали применение SORS при распознавании тканей молочной железы с исследованием образца до глубины 2 мм, чувствительность 95% и специфичность 100% были достигнуты авторами при обнаружении опухолей молочной железы. Тем не менее, применение метода SORS для обнаружения рака в настоящее время ограничивается только определением краев рака во время операции по удалению рака. Кроме того, ряд вопросов о его эффективности еще недостаточно изучены, SERS мягких тканей является многообещающим для биомедицинских применений [85].

Одним из будущих внедрений в исследованиях рака кожи являются так называемые SESORS (комбинация SERS и SORS). Yuen с соавт. [86] продемонстрировали на моделях крыс возможность чрескожных измерений глюкозы *in vivo*, что доказывает, что SESORS может стать новым мощным подходом в *in vivo* исследованиях биотканей. Тем не менее, в будущем внедрение таких методов в клиническую практику требует дальнейших испытаний, чтобы доказать их эффективность в конкретных медицинских приложениях.

Сравнение методов RS

Анализ применимости различных подходов RS для клинических исследований и проведения оптической биопсии (см. Таблицу 1.1) показывает, что каждый конкретный метод RS имеет свои преимущества и недостатки.

Таблица 1.1. – Сравнение методов RS, применяемых для оптической биопсии (ω – регистрируемая частота, ω_p – частота накачки, ω_s – частота стоксовой волны, δ – Рамановский сдвиг)

Метод исследования	Инструментарий, условия использования	Время экспозиции	Сигнал и шум	Примечания
Спонтанная RS	Непрерывный источник монохроматического излучения, Рамановский пробник, иногда сочлененный с микрообъективом	>200 мс	Сигнал: $\omega = \omega_p - \delta$ Шум: нативная (собственная) флуоресценция биотканей (автофлуоресценция - AF)	- Высокий AF фон - Низкое пространственное разрешение - Низкая стоимость - Простое устройство - Сканирование в точке, линией или даже регистрация изображения
Конфокальная RS	Длины волн: 500–1100 нм Средняя мощность излучения: 150 мВт	>5 с		- Высокий AF фон - Высокое пространственное разрешение - Анализ глубоко залегающих слоев биотканей (<500 мкм) - Высокое

				время накопления сигнала
SORS		>5 с		<ul style="list-style-type: none"> - Высокий AF фон - Низкое пространственное разрешение - Анализ глубоких слоев биотканей (<1-2 мм) - Высокое время накопление сигнала
SERS	Обычно все то же, что и для спонтанной RS, но длина волны возбуждения зависит от вида и размера исследуемых наночастиц (наноструктурированных подложек)	>1 с	Сигнал: $\omega = \omega_{p-\delta}$ Шум: AF	<ul style="list-style-type: none"> - Низкий AF фон - Необходимость использовать наночастицы благородных металлов - Непостоянная мощность сигнала - Необходимость поиска «Hot spot'ов» - Низкое время регистрации сигнала
Резонансная RS	Обычно все то же, что и для спонтанной RS, но длина волны возбуждения должна быть близка по энергии к исследуемому электронному переходу определенной связи в молекуле	>0,3 с	Сигнал: $\omega = \omega_{p-\delta}$ Шум: AF	<ul style="list-style-type: none"> - Высокий AF фон - Высокая интенсивность специфичных молекулярных связей - Низкое время накопления сигнала
CARS	Два импульсных лазера или перестраиваемый импульсный лазер Длина волны:	>0.16 мкс для одного пикселя (при микроскопическ	Сигнал: $\omega = 2\omega_p - \omega_s$ Шум: нерезонансной природы	<ul style="list-style-type: none"> - Низкий нерезонансный шум - Высокое пространственн

	$\omega_1 = \omega_s$ (690–900 нм) $\omega_2 = \omega_p$ (1150–2300 нм) Средняя мощность излучения: 150 мВт Импульс: 5 пс Время повторения: 1–100 МГц	их исследованиях)		ое разрешение - Высокая стоимость - Сложность регистрации сигнала (доставка зондирующего излучения, миниатюризация) - Низкое время регистрации сигнала
SRS		>40 мс/кадр (при микроскопических исследованиях)	Сигнал: $\omega = \omega_p - \omega_s$ Шум: Отсутствие АФ	- Отсутствие фона АФ - Высокое пространственное разрешение - Высокая цена - Сложность регистрации сигнала (доставка зондирующего излучения, миниатюризация) - Низкое время регистрации сигнала

Регистрация сигналов требует длительного времени сбора для конфокальных RS и SORS. Таким образом, их применение ограничено при массовом скрининге биотканей. Применение SERS демонстрирует высокую чувствительность и специфичность в обнаружении специфических молекул или биомаркеров, что может значительно повысить точность обнаружения рака и других заболеваний. Однако для реализации SERS требуются специализированные подложки или наночастицы, поэтому требуется дополнительная трудоемкая подготовка образцов и лабораторные установки для анализа биотканей. Кроме того, несмотря на видимый прогресс в технологиях SERS, по-прежнему существует серьезная проблема в реализации *in vivo* приложений из-за неясной токсичности наночастиц благородных металлов. Резонансная RS может быть очень полезной при анализе специфических молекулярных связей и даже целых молекул, но при анализе ряда заболеваний этот подход ограничен из-за непредсказуемого и сложного молекулярного

состава биотканей. CARS и SRS имеют высокое пространственное разрешение, низкий фон AF (или даже полное отсутствие AF) и низкое время накопления сигнала, но эти методы трудно реализовать с технической точки зрения. Кроме того, применение SRS и CARS требует дорогостоящего оптического оборудования, которое намного сложнее, чем оборудование, используемое для регистрации спонтанного Рамановского сигнала. Совместное исследование тканей кожи с помощью ряда предложенных методик также демонстрирует очень многообещающие результаты, но, как и в случае когерентных методов RS, такие подходы являются дорогостоящими и требуют широких клинических испытаний, чтобы доказать их применимость для скрининговых исследований. Таким образом, наиболее доступным из вышеупомянутых Рамановских методов для массовых исследований рака кожи является обычная спонтанная RS из-за компромисса простоты и времени накопления сигнала по сравнению с другими методами RS.

Мультимодальные исследования по одновременной регистрации оптических сигналов.

Во многих клинических исследованиях было показано снижение эффективности выявления рака при большом количестве тестируемых образцов из-за большой изменчивости свойств исследуемых биотканей и их химических компонентов [87, 88]. Этот эффект может быть частично компенсирован (приблизительно на 5-10%) в мультимодальном подходе [89], когда в каждой модальности используются оптические параметры, связанные с изменением различных компонентов биоткани во время развития патологического процесса. Например, комбинированный подход RS-ОКТ был успешно продемонстрирован в офтальмологии [90] и гастроэнтерологии [36, 91], в то время как его применение в диагностике других тканей все еще остается предметом дискуссии. Анализ изменений кожи также возможен с помощью комбинированных систем ОКТ и RS [92], однако потенциал для выявления меланом, ВСС и плоскоклеточного рака до сих пор неясен. Борисова с соавт. [93] продемонстрировали точность разделения меланом и немеланомных раковых образований кожи с точностью 93,6% благодаря комбинации анализа AF и обратного рассеяния излучения. Wang с соавт. [43] сообщили, что точность диагностики рака кожи с использованием AF находится на уровне 80-90%. Значительное улучшение точности AF диагностики возможно при использовании экзогенных флуорофоров [94]. Однако внедрение экзогенных флуорофоров является дорогостоящим и требует их введения в организм пациента, что делает такое исследование неприемлемым для массового скрининга. Комбинация RS и AF была продемонстрирована в экспериментах с тканями желудка [89], легкого [95, 96], печени [97] и тканями молочной железы [98]. При

этом до сих пор остается неизвестным, насколько удачной может оказаться комбинация RS и AF для диагностики различных патологий при анализе кожных покровов человека [22, 99]. Поэтому, даже несмотря на высокий потенциал совместного исследования Рамановских и флуоресцентных свойств кожи, существует необходимость в разработке новых подходов и инструментария для совместного анализа тканей кожи с применением комбинации RS и AF, а также в верификации таких мультимодальных подходов в широких *in vivo* тестах непосредственно в клинических условиях.

Мультивариативный анализ спектральных данных.

Наряду с задачами регистрации комплексных оптических данных от исследуемых биотканей при проведении исследований с применением RS и AF неизбежно возникает необходимость в детальном анализе регистрируемых спектров. Таким образом, хотя RS имеет высокий уровень химической специфичности, изменения в спектральных линиях даже между очень похожими по своему химическому строению веществами часто могут быть незначительными и их трудно выявить визуально. Продвинутый статистический анализ используется чтобы лучше понять информацию, скрытую в регистрируемых спектральных данных. Статистический анализ может быть использован для анализа данных RS и AF поскольку набор спектральных данных, по сути, представляет из себя матрицу данных, состоящую из набора длин волн или волновых чисел и соответствующих им интенсивностям неупруго рассеянного или флуоресцентного излучения. Различные алгоритмы могут быть применены к матрице спектральных данных с целью построения статистических моделей. Эти модели идентифицируют наиболее полезные химические данные и отделяют их от менее информативных данных и шума. Все это возможно при правильном обучении распознавания паттернов, содержащихся в матрице анализируемых данных. Статистические модели могут научиться распознавать сходства и различия между либо размеченными, либо неразмеченными данными, которые затем можно использовать для получения качественного или количественного анализа исследуемых биотканей.

Существует множество алгоритмов статистического анализа, позволяющих ответить на широкий круг вопросов, которые могут возникнуть при исследовании химического строения биотканей спектральными методами. Две основные категории статистических моделей, которые могут быть построены для анализа данных, включают в себя модели обучения с учителем и модели без учителя. Модели без учителя не используют метки выборки или пользовательскую информацию при построении модели [100]. Примеры

моделей без учителя включают анализ главных компонент (PCA) и иерархический кластерный анализ (HCA). Эти модели представляют собой исследовательские типы анализа и не используются для классификации. Они могут использоваться для отображения сходств или различий между группами исходных данных. Модели анализа с учителем учитывают определяемые пользователем метки, известные как классы, для всех выборок при построении моделей прогнозирования. Модели анализа с учителем в свою очередь делятся на регрессионные модели и методы классификации. Регрессионная модель часто используется в целях калибровки и дает количественный ответ, тогда как классификационная модель дает качественный ответ. Распространенной моделью регрессии является множественная линейная регрессия (MLR), в то время как различные методы классификации включают в себя дискриминантный анализ частных наименьших квадратов (PLS-DA), дискриминантный анализ машинного вектора поддержки (SVM-DA) и искусственные нейронные сети (ANN) [101].

Способность выбирать важную информацию и распознавать закономерности и сходства в наборах данных делает статистические методы идеально подходящими для анализа спектральных данных RS и AF. В частности, эти различные статистические методы уже были использованы с целью понимания пространственного распределения биохимических компонентов в биотканях [102, 103], выявления потенциальных биомаркеров заболеваний [104], дифференциации здоровых биологических тканей от больных [105] и для определения стадий заболевания [106].

Достоинства статистических методов анализа делают их идеальными кандидатами для использования в задачах выделения информации из многомерных спектральных кривых. Как показывает информация, представленная выше, несмотря на то, что множество статистических методов уже с успехом используются для анализа спектральных данных, существует потребность в разработке новых методов статистического анализа. Например, такие методы потребуются для исследования комплексных данных (содержащих спектральную информацию различной природы, как RS+AF и т.д.), а также при адаптации уже существующих статистических методов применительно к спектральным данным, регистрируемых в различных условиях, в том числе с различными уровнями шумов [101]. Поэтому при исследовании тканей кожи комплексным оптическим методом и разработке метода оптической биопсии кожи с использованием портативных спектральных приборов потребуется разработать методику статистического анализа регистрируемых спектров, которые одновременно содержат Рамановскую и флуоресцентную компоненту. Важно отметить, что подобные исследования уже проводились, однако при этом флуоресцентная

составляющая откидывалась как паразитный сигнал [107]. Также существенное отличие предлагаемого в настоящей работе подхода состоит в том, что регистрация оптических спектров производилась при низком соотношении сигнал-шум (SNR), что в свою очередь снова требует адаптации существующих методов статистического анализа для решения проблемы классификации регистрируемых оптических спектров.

Выводы главы:

Представленный обзор литературы свидетельствует об актуальности задач, связанных с разработкой новых подходов к проведению «оптической биопсии» кожи с целью выявления социально значимых заболеваний человека неинвазивными методами. Результаты многочисленных исследований показывают, что Рамановская спектроскопия в комбинации с автофлуоресценцией являются мощным средством анализа химического состава биотканей, позволяющим определять наличие заболеваний. При этом остаются не исследованными вопросы точности применения мультимодальных оптических подходов в диагностике неинфекционных заболеваний при исследовании тканей кожи и вопросы применения статистических методов к анализу зашумленных комплексных спектральных данных.

Для решения данных задач представляется необходимым:

1. Исследовать возможность применения RS для оценки относительной концентрации продуктов метаболизма, накапливающихся в биоткани с течением жизнедеятельности человека;
2. Исследовать применение Рамановского рассеяния в ближней ИК области спектра для выявления неинфекционных заболеваний при анализе кожи человека;
3. Исследовать применение автофлуоресценции в видимой и ближней ИК области спектра для определения типа опухолей кожи;
4. Разработать методику применения проекции на латентные структуры (projection on latent structures – PLS) при анализе Рамановских и флуоресцентных спектров биотканей с низким соотношением сигнал-шум, для выявления узких спектральных полос, соответствующих наличию конкретных групп химических соединений, и позволяющих производить диагностику заболеваний.
5. Исследовать возможность использования значимости переменных в проекции (variable importance in projection – VIP) для установления, какие именно химические

компоненты биоткани вносят значительный вклад в модели классификации заболеваний при анализе спектральных характеристик биотканей;

6. Исследовать возможность одновременного применения комбинации RS и AF для создания мультимодального метода оптической биопсии кожи;
7. Определить различные группы химических соединений в составе биотканей, наличие которых возможно установить за счет селективного взаимодействия оптического излучения различного спектрального диапазона с компонентами исследуемой биоткани.
8. Исследовать возможность применения сверточных нейронных сетей для высокоточной классификации тканей кожи при анализе спектральных данных, поставляемых «оптической биопсией».

Перечисленные направления исследований определяют содержание и структуру данной диссертационной работы.

2 EX VIVO АНАЛИЗ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВООБРАЗОВАНИЙ ТКАНЕЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Как было показано в первой главе, диагностика опухолей кожи возможна с помощью методов спектроскопии, таких как обратное рассеяние [108], RS [109], резонансная RS [110, 111], анализ автофлуоресценции (AF) [112], спектроскопия Стоксового сдвига [113, 114] и многие другие. Сдвиг длины волны в RS и интенсивность неупругого рассеяния, вызванного взаимодействием света с различными модами колебаний молекул ткани, использовались для классификации опухолей в многочисленных исследованиях благодаря современным достижениям возможности детектирования слабых оптических сигналов. Например, диагностическая точность исследования патологий желудка [36] и кожи [109] с применением RS оказалась выше 90% и 80% соответственно. Исследования опухолей с применением AF показывают более низкую точность по сравнению с RS [37], но AF характеризуется гораздо более высокой интенсивностью, что позволяет регистрировать сигналы в течение короткого периода времени и быстро сканировать область опухоли. Таким образом, существует необходимость в клинических испытаниях для оптимизации эффективности и достоверности RS-AF для диагностики рака [115], в том числе, для диагностики новообразований кожи.

Экспериментальная установка, реализующая принципы RS и AF; регистрация и обработка спектральных данных

Лабораторная установка представлена на рисунке 2.1: она сочетает в себе принципы RS и AF для *ex vivo* исследования тканей кожи человека. Установка включает термостабилизированный полупроводниковый диодный лазерный модуль NIR LML-785.0RB-04 (центральная длина волны $785 \pm 0,1$ нм, 150 мВт) для возбуждения Рамановских спектров и AF в области NIR и лазерный модуль DPSS (457 нм, 200 мВт) для стимуляции AF в видимой области спектра. Лазерное излучение передается на оптический детектор с помощью возбуждающих волокон (диаметр 100 мкм, 0,22 NA) и коллимирующих линз L1 и L2. NIR (785 нм) лазерное излучение проходит через полосовой фильтр (BPF), который отсекает Рамановский вклад от материала оптического волокна. Первое (DM1) и второе (DM2) дихроичные зеркала пропускают лазерное излучение с длинами волн 785 и 457 нм на линзу L3, которая фокусирует возбуждающее излучение на исследуемом образце кожи человека (фокусное расстояние 7,5 мм). Та же линза L3 собирает Рамановское, AF и обратно

рассеянное излучение. Дихроичное зеркало DM3 расщепляет собранное излучение по каналам видимого и NIR излучения. Далее каждый из каналов содержит соответствующий широкополосный фильтр (LPF1 / LPF2) для элиминации возбуждающего (785 нм и 457 нм) лазерного излучения, согласующую линзу (L4 / L5) и собирающие волокна (диаметр 200 мкм, 0,22NA). Далее излучение поступает на многоканальный спектрограф Shamrock SR-500i-D1-R с цифровой CCD-камерой Andor iDus DU416A-LDC-DD, охлаждаемой до -65С°. Экспериментальная установка была откалибрована последовательно для сигналов RS и AF. Низкошумная регистрация излучения RS и AF проводилась в спектральных диапазонах 790-930 нм и 560-750 нм со спектральным разрешением не менее 0,05 нм.

Все образцы ткани облучали лазером с длиной волны 785 нм в течение 2-3 минут до регистрации спектров, чтобы увеличить соотношение сигнал/шум Рамановской компоненты сигнала из-за уменьшения интенсивности NIR AF за счет эффекта фотообесцвечивания тканей, в то время как интенсивность Рамановского рассеяния остается неизменной [116]. Важно отметить, что форма регистрируемого спектра AF остается неизменной в течение 2-3 мин процесса фотообесцвечивания, и только интенсивность NIR AF монотонно уменьшается. Это монотонное уменьшение спектров AF в процессе фотообесцвечивания также наблюдали Wang с соавт. [117].

Оптический детектор располагался непосредственно над образцом ткани на расстоянии 7-8 мм. Диаметр луча зондирующего излучения на ткани составлял примерно 2-3 мм. Глубина проникновения излучения в ткань составляла около 1-2 мм. Мощность лазера на поверхности кожи составляла 30 мВт для обоих лазеров, что соответствует плотности мощности излучения лазера 1,7 Втсм² на поверхности кожи. Время регистрации сигнала составляло 15 секунд для AF возбуждаемой в видимой области и 30 секунд для анализа RS и NIR AF.

Регистрируемые сигналы в NIR и видимой областях спектра снимались последовательно на одних и тех же участках исследуемой ткани кожи. Спектры Рамановского рассеяния и AF были зарегистрированы для области опухоли и нормальной кожи, непосредственно прилегающей к опухоли (в пределах 2-4 см). Были проведены три независимых измерения спектров для каждой предварительно определенной области исследуемой ткани. Выбор области исследования производится медицинским специалистом. Затем рассчитывалось усредненное значение для трех снятых спектров. Это позволило оценить изменения биохимического состава в злокачественных новообразованиях по сравнению с нормальной кожей и ввести относительные

спектральные критерии (указаны далее в настоящем разделе), которые исключают влияние индивидуальной изменчивости свойств кожи на регистрируемые спектры.

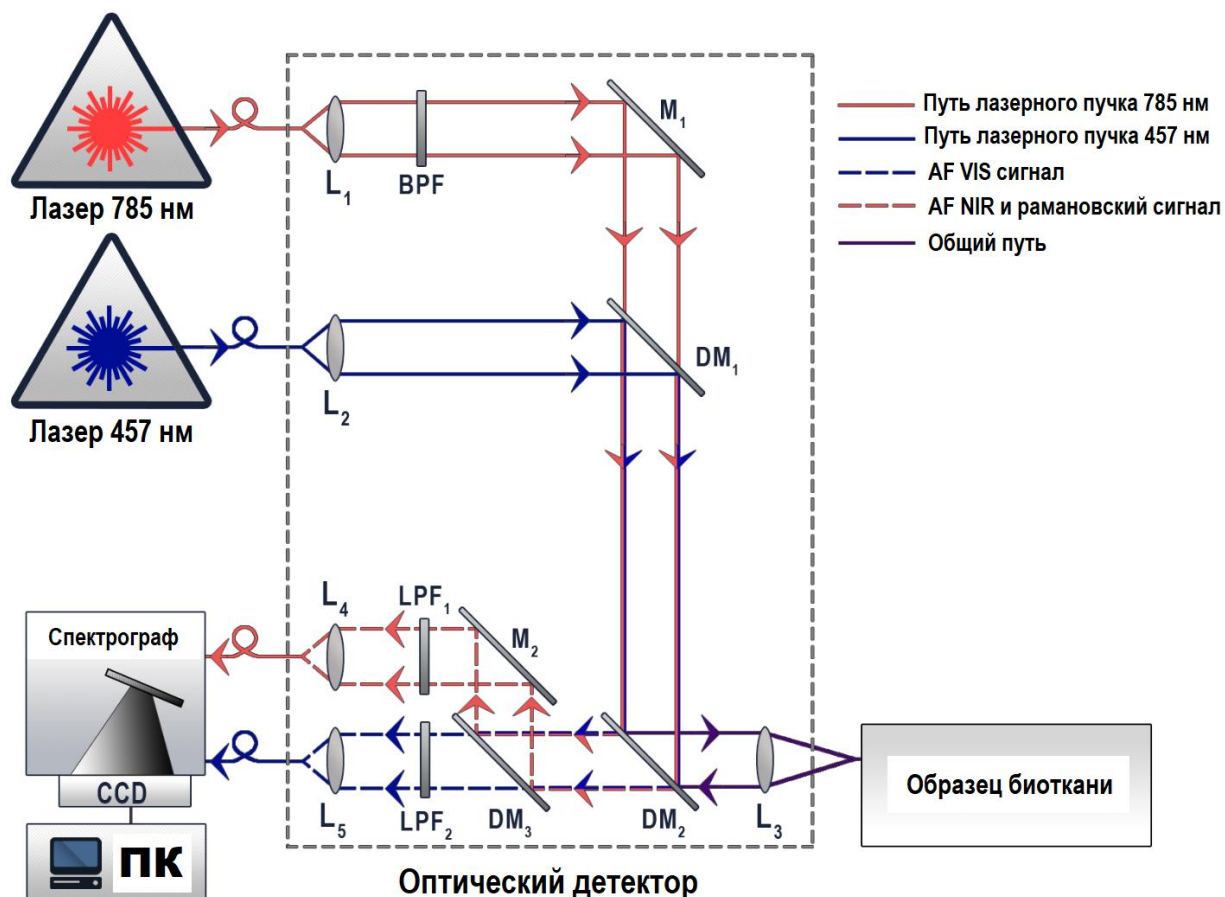


Рисунок 2.1 – Экспериментальная установка, сочетающая принципы RS и AF: L₁, L₂, L₄, L₅ – согласующие линзы; L₃ – фокусирующая линза; BPF: узкополосные фильтры; M₁, M₂ – зеркала; DM₁, DM₂, DM₃ – дихроичные зеркала; LPF₁, LPF₂ – широкополосные фильтры

Лазерное излучение с длиной волны 785 нм одновременно стимулирует Рамановское рассеяние и автофлуоресцентный отклик в спектральном диапазоне ближней ИК области спектра. Зарегистрированные спектры содержат широкую экспоненциально убывающую кривую AF с выделяющимися Рамановскими пиками, которые обычно выделяются методом полиномиальной аппроксимации. Все обработанные спектры RS и AF могут быть сгруппированы в соответствии с гистологическими данными и подвергнуты дальнейшей статистической обработке с использованием метода главных компонент (principal component analysis – PCA). Хорошо известно, что число тестируемых образцов должно быть

больше или такого же порядка, что и у ряда переменных для математически правильного проведения PCA разложения. Анализ полученных спектров проводился на основе ряда априорно predetermined спектральных критериев, описанных ниже. Эти критерии были связаны с относительным содержанием основных хромофоров кожи. Такой подход позволил сократить число переменных с тысяч (для всего спектра) до нескольких переменных и помог включить в анализ особенности здоровой кожи человека. Также данный подход позволил детектировать различия между нормальными и раковыми тканями при регистрации RS и AF спектров.

Предложенный подход позволяет определять многомерное пространство различных критериальных параметров RS и AF. Каждый конкретный тип рака характеризуется своим собственным набором биохимических компонент, которые эквивалентны определенному набору критериальных значений. Таким образом, каждый тип рака заполняет точную область в многомерном фазовом пространстве, и, в результате, появляется механизм для точной оптической идентификации типа опухоли. Была оценена корреляция между предложенными критериями, чтобы найти группы критериев с самой низкой корреляцией для многомерного пространственного анализа. Коэффициенты корреляции Пирсона были рассчитаны для каждой пары предложенных критериев. Дальнейший анализ многомерных фазовых пространств на основе выбранных критериев был выполнен с помощью PCA. Этот тип анализа помогает уменьшить размерность данных, сохраняя при этом большинство изменений в наборе данных. Он использует направления, называемые основными компонентами (PC), вдоль которых изменение данных является максимальным. Изолируя несколько компонент, каждый образец может быть представлен сравнительно небольшим числом PC вместо нескольких переменных. Затем образцы могут быть нанесены на фазовую плоскость, что позволяет оценить сходства и различия между образцами, а также произвести их разделение, например, с помощью DA. DA позволяет разделять два или более классов на основе различных статистических параметров гауссовых распределений. Эффективность предложенного подхода характеризуется чувствительностью и специфичностью, а также возможностью выбора определенных классов в разных областях фазовой плоскости. Анализ распределения данных по тканям кожи проводился с использованием классификаторов на основе линейного и квадратичного DA.

Автофлуоресценция (Нативная флуоресценция – AF) применительно к анализу новообразований кожи

Взаимодействие света с биотканью представляет собой сложный процесс многократного рассеяния и поглощения фотонов в многослойной структуре кожи, в состав которой входит много нативных флуорофоров. Квантовый выход флуоресценции естественных флуорофоров кожи варьируется от тысячной до сотой части поглощенной энергии излучения [118]. Основными поглотителями оптического излучения здоровой кожи являются гемоглобин, вода, липиды и меланин [119]. Клеточные мембраны, ядра, органеллы, меланиновые гранулы являются основными объектами рассеяния тканей кожи. Злокачественные образования изменяют химический компонентный состав тканей кожи, а также приводят к увеличению размера ядер клетки и ее показателя преломления [120]. Среднее значение диаметра нормального клеточного ядра составляет 10-12 мкм, а для опухолевых тканей – около 20-50 мкм. Таким образом, измерение АФ может быть использовано для мониторинга химического состава биотканей и в качестве диагностического инструмента для скрининга рака. Применение АФ было продемонстрировано для диагностики рака гортани [121], легкого [122], молочной железы [123, 124, 125], предстательной железы [126], мочевого пузыря [127], также используется в различных исследованиях биологических жидкостей [128].

Были исследованы интенсивность и форма АФ, стимулированной лазерами 457 и 785 нм, чтобы выявить различия в составе и концентрациях хромофоров в злокачественных и нормальных тканях кожи [129-131]. Типичные нормализованные спектры флуоресценции от кожных тканей представлены на рисунке 2.2. На этих спектрах можно наблюдать три основных локальных максимума в областях 555-575 нм, 595-615 нм и 635-556 нм. Максимум спектров АФ тканей кожи может быть расположен в области 595-655 нм, так как он представляет собой комбинацию двух локальных максимумов. Перераспределение интенсивности АФ в максимумах 595-615 нм и 635-655 нм приводит к смещению главного максимума. Кроме того, это перераспределение интенсивности АФ может приводить к появлению одного или двух сильных максимумов, как показано на рисунке 2.2а для ВСС. Здесь нормальная кожа и ММ имеют только один максимум на длинах волн 614 и 611 нм соответственно, в то время как ВСС имеет два сильных максимума сравнимой интенсивности на длинах волн 620 нм и 663 нм. Приведенные примеры спектров являются общими для нормальной кожи, ММ и ВСС и могут незначительно отличаться от образца к образцу. Все исследованные типы тканей кожи могут иметь один или два максимума в области 595-655 нм, и основной максимум может быть расположен в любой части указанных областей.

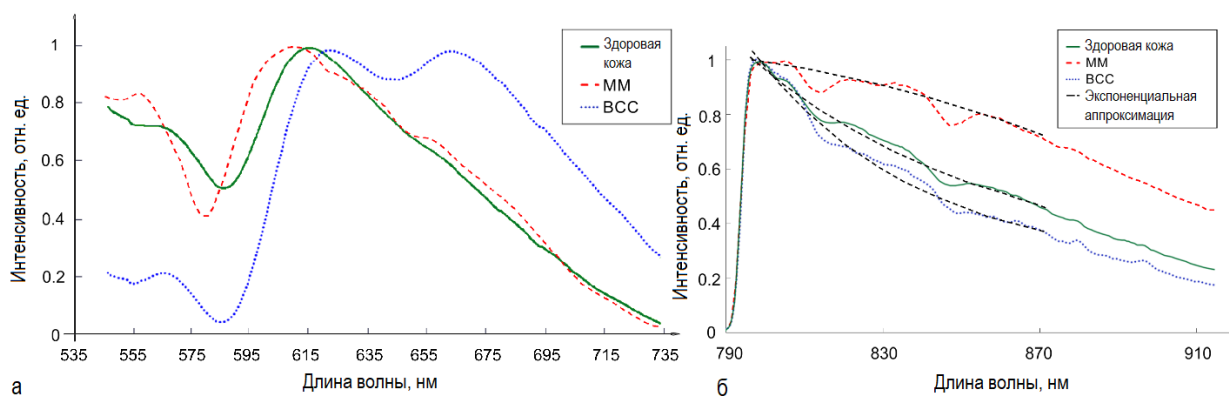


Рисунок 2.2 – Нормализованные *ex vivo* спектры АФ нормальной ткани кожи, ММ и ВСС, стимулированные лазером 457 нм (а) и лазером 785 нм (б)

Основными флуорофорами, излучающими в оранжевой и красной областях видимого спектра, являются липопигменты, флавины и порфирины [132, 133]. Пик в области 555-575 нм обусловлен липидами и флавинами. Липопигменты имеют максимум поглощения около 340 нм и максимум излучения около 545 нм. Флавины характеризуются сильным поглощением в широкой области от 200 нм до 500 нм с сильными максимумами поглощения при 220 и 260 нм и менее сильным поглощением при 380 и 460 нм. Максимум эмиссии флавинов составляет 555 нм [134]. Порфирины характеризуются широким поглощением в области 300-470 нм с максимумами при 400 нм. Эмиссия порфиринов имеет сложную форму с двумя максимумами около 615-630 и 660-670 нм. [132, 133, 135]. Таким образом, положения и интенсивности максимумов в спектрах АФ могут предоставить информацию о химическом составе исследуемых образцов и изменениях патологических образований по сравнению со здоровой кожей. Локальный максимум спектров АФ, наблюдаемый при 555 нм, характеризуется наличием флавинов и липопигментов в тканях кожи, а порфирины определяют форму спектров АФ в красной области спектров.

Эпидермальные поверхностные липиды поддерживают барьерные функции кожи и способствуют поддержанию здоровья кожи и волос. Кроме того, некоторые липиды, обнаруженные на поверхности кожи, делают кожу непривлекательной для грибков и бактерий [136]. С другой стороны, флавины контролируют фотостимулированное образование меланина в специализированных клетках [137] и участвуют в процессе метаболического дегидрирования. Порфирины также играют значительную роль в процессах обмена веществ, как в коже человека, так и в бактериях, живущих на коже человека (таких как *Propionibacterium acnes*) [138, 139]. Это позволяет предположить наличие значительных изменений общего содержания флавинов, липопигментов и

порфиринов в тканях кожи при зарождении и росте опухолей, которые характеризуются повышенной скоростью процессов метаболизма. Рост опухоли нарушает защитную функцию кожи и приводит к колонизации поверхности кожи новыми бактериями, продуцирующими порфирины [140]. Все эти факты показывают возможность выявления рака кожи с помощью АФ, стимулируемой синим лазерным излучением.

Был предложен ряд критериев для исследования изменений содержания флавинов, липидов и порфиринов в тканях кожи. Первой возможной особенностью спектров АФ, стимулированных лазером 457 нм, которые могут быть полезны при определении типа тканей кожи, является соотношение интенсивностей АФ в полосах 555-575 нм (I_{555}) и 595-675 нм (I_{595}). Для ММ, ВСС и нормальной кожи на основе критерия $FI_{VIS} = I_{595} / I_{555}$ можно видеть, что дифференцирование меланом вряд ли возможно с высокой точностью [129]. Предполагая необходимость 100% чувствительности обнаружения ММ с коэффициентом FI_{VIS} , специфичность обнаружения ММ составляет 47,2%, а точность обнаружения ММ составляет всего 53,1%; при этом площадь под ROC кривой (receiver operator characteristic curve) составляет 0,51. Такая точность недостаточна для клинических применений, и для классификации тканей кожи необходимо использовать другие особенности спектров АФ.

Точность классификации кожных тканей может быть улучшена путем дополнительного отслеживания локального смещения положения максимумов для опухолевой кожи относительно здоровой кожи:

$$F\lambda_{VIS} = \frac{|\lambda_{norm} - \lambda_{tumor}|}{\lambda_{norm} + \lambda_{tumor}}, \quad (2.1)$$

где λ_{tumor} и λ_{norm} являются положением максимума спектров АФ для опухоли и нормальной кожа вблизи новообразования для одного и того же образца ткани кожи [130]. Эта особенность включает информацию как для опухоли, так и для здоровой кожи, то есть отражает метаболические процессы в ткани, изменяющие химический состав в области опухоли по сравнению с нормальной тканью. Сдвиг спектра $F\lambda_{VIS}$ в видимом диапазоне помогает оценить изменения концентрации порфиринов в верхних слоях кожи, поскольку опухоли содержат больше бактерий на своей поверхности, чем нормальная кожа [138]. Опять же, предполагая необходимость обнаружения ММ со 100%, специфичность критерия $F\lambda_{VIS}$ составляет 31,6%. Это приводит к общей точности 53,6%, а площадь под ROC кривой

составляет 0,47 для обнаружения ММ с критериями спектрального сдвига в видимой области спектра.

Продемонстрированная точность обнаружения ММ на основе критериального анализа АФ только в видимой области спектра является достаточно низкой. Увеличение точности до 75% и увеличение площади под ROC кривой до 0,72 может быть достигнуто путем одновременного мониторинга обоих критериев, как показано на рисунке 2.3. Здесь классификация ММ и ВСС была выполнена с применением линейного дискриминантного анализа (discriminant analysis – DA) на фазовой плоскости для мониторинга состава порфиринов на поверхности ткани ($F\lambda_{VIS}$) и относительного содержания порфиринов, липидов и флавинов (FI_{VIS}).

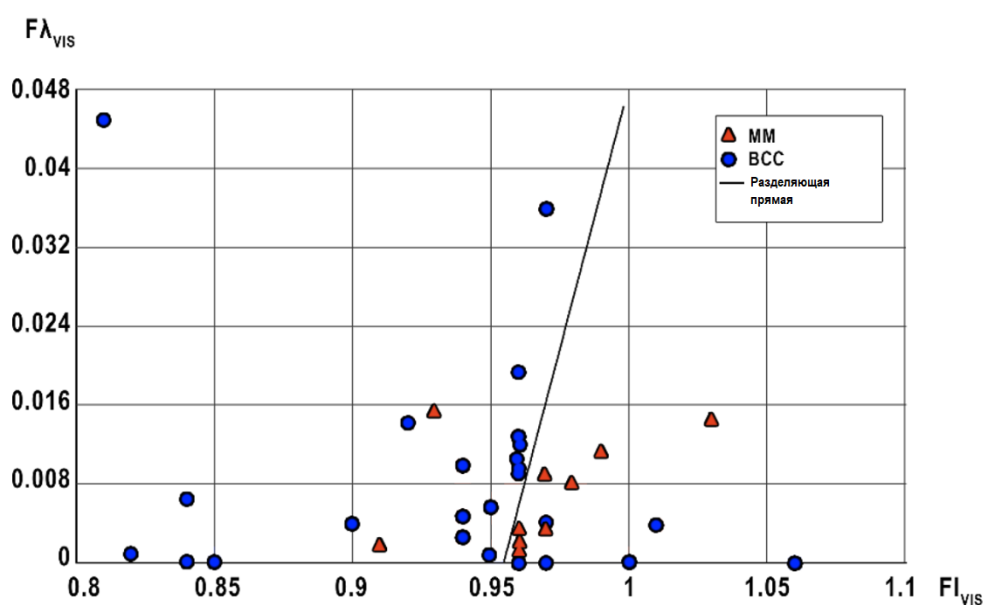


Рисунок 2.3 – Классификация ММ и ВСС на фазовой плоскости с совместным применением критериев АФ, стимулированной в видимой области спектра (изучение состава порфиринов и относительного содержания порфиринов, липидов и флавинов)

Поскольку анализ АФ в видимой области обнаруживает относительное изменение содержания порфиринов, липидов и флавинов в опухоли, точность диагностики может быть улучшена путем дополнительного анализа других компонентов биоткани. Содержание меланина оказывается полезным дополнительным критерием, поскольку ММ обычно являются более пигментированными опухолями, чем ВСС. Кроме того, содержание феомеланина и эумеланина может различаться для злокачественных опухолей кожи [141].

Таким образом, измерение содержания меланина может улучшить классификацию ММ и ВСС оптическими методами.

На рис. 2.2b показаны типичные спектры АФ в ближней ИК области (NIR) для нормальной кожи и опухолей, стимулированные лазером с длиной волны 785 нм. Пунктирная кривая показывает экспоненциальное приближение спектров NIR АФ. В спектральном диапазоне 870-920 нм интенсивность NIR АФ уменьшается с ростом длины волны, и наиболее значительные качественные изменения спектра NIR АФ для различных опухолей наблюдались в диапазоне от 810 до 870 нм. Для сравнительного анализа экспериментальных данных аппроксимируем спектр NIR АФ экспоненциальной функцией вида:

$$I_{ap}(\lambda) = FI_{NIR} * \exp^{F\lambda_{NIR}\left(\frac{\lambda}{\lambda_{max}}\right)} + c, \quad (2.2)$$

где коэффициент FI_{NIR} отвечает за выпуклое или вогнутое поведение аппроксимирующей функции, абсолютное значение коэффициента $F\lambda_{NIR}$ характеризует кривизну зависимости от длины волны в спектрах АФ, а $\lambda_{max} = 870$ нм - правая граница интервала аппроксимации. Коэффициенты FI_{NIR} и $F\lambda_{NIR}$ могут использоваться для оценки содержания меланина [131], поскольку кривизна (абсолютное значение и его знак) и функция наклона аппроксимации зависят от содержания меланина в тканях кожи.

Максимальный разброс значений интенсивности спектров АФ не превышает 7% для здоровой кожи, 12% для ВСС, в то время как для ММ он значительно выше (30-40%) [131]. Снижение интенсивности АФ связано с непрерывным облучением образца, вследствие чего возникает эффект фотообесцвечивания кожи [142]. Явление фотообесцвечивания, связанное с деградацией флуорофоров из-за фотохимического повреждения и модификации молекулярных связей. Порог возможных значений NIR АФ для здоровой кожи, ММ и ВСС не пересекаются, что позволяет их дифференцировать по уровню интенсивности [131]. Однако ситуация противоположна в случае меланоцитарных новообразований (ММ, невус, родинки), для которых характерен высокий уровень АФ. В этом случае точность дифференцирования меланоцитарных новообразований существенно снижается. Например, в наших исследованиях точность дифференцирования ММ и невуса по критериям интенсивности NIR АФ не превышала 52%. Важно отметить, что кривизна поверхности и форма опухоли могут внести существенный вклад в интенсивность измеряемой интенсивности АФ из-за непостоянной конфигурации геометрии детектирования излучения. В результате трудно гарантировать правильность измерений абсолютной интенсивности в клинических применениях, особенно при скрининговых и

профилактических осмотрах. В то же время форма спектра АФ зависит только от относительных изменений химических компонентов и может быть быстро измерена с гарантированной точностью, что особенно важно для применений *in vivo*.

Поэтому целесообразно использовать именно критерий FI_{NIR} (кривизна спектров) для дифференциации ММ и ВСС. В целом анализ коэффициента FI_{NIR} показал возможность разделения ММ и ВСС с общей точностью 60,8%. Реализация критерия $F\lambda_{NIR}$ демонстрирует чувствительность и специфичность для нахождения ММ 69,2% и 85,0% соответственно. Дальнейшее повышение точности обнаружения злокачественных образований с применением NIR АФ может быть достигнуто путем комбинированного анализа обоих критериев (FI_{NIR} и $F\lambda_{NIR}$): результат был признан положительным, когда один из критериев показал, что новообразование представляет собой ММ. В этом случае чувствительность обнаружения ММ достигает 92,3%, но общая точность дифференциации ММ и ВСС составила только 64,6% (площадь под ROC кривой составляет 0,6).

RS для ex vivo исследований новообразований кожи

Традиционная и резонансная RS могут быть эффективно использованы для сравнения состава основных хромофоров тканей в области опухоли и нормальной кожи одного и того же пациента [143, 144]. Необходимо учитывать, что абсолютные значения интенсивности RS могут значительно отличаться от одного образца ткани кожи к другому из-за высокой изменчивости концентрации компонентов биоткани. Поэтому контраст «нормальной ткани» помогает избежать влияния индивидуальных свойств кожи и неоднородности ткани на результаты экспериментов. Применение такого подхода было продемонстрировано в ряде исследований [129, 145].

Типичные регистрируемые спектры Рамановского рассеяния ММ, ВСС и здоровой кожи представлены на рисунке 2.4. Каждый спектр был нормирован на максимальную интенсивность во всем спектральном диапазоне от 1200 до 1800 см^{-1} , чтобы избежать влияния изменчивости тканей кожи. Для всех исследованных образцов наиболее интенсивная полоса RS расположена около 1450 см^{-1} и связана с CH_2 -деформациями белков и липидов [143]. Другие хорошо наблюдаемые полосы: от 1240 до 1280 см^{-1} (растяжение $\text{C} = \text{N}$), от 1300 до 1340 см^{-1} (скручивающие и изгибные колебания CH_2), от 1540 до 1580 см^{-1} (деформационные колебания $\text{C} = \text{C}$ и триптофан) и от 1640 до 1680 см^{-1} (растяжение связи $\text{C} = \text{O}$ в амидах I).

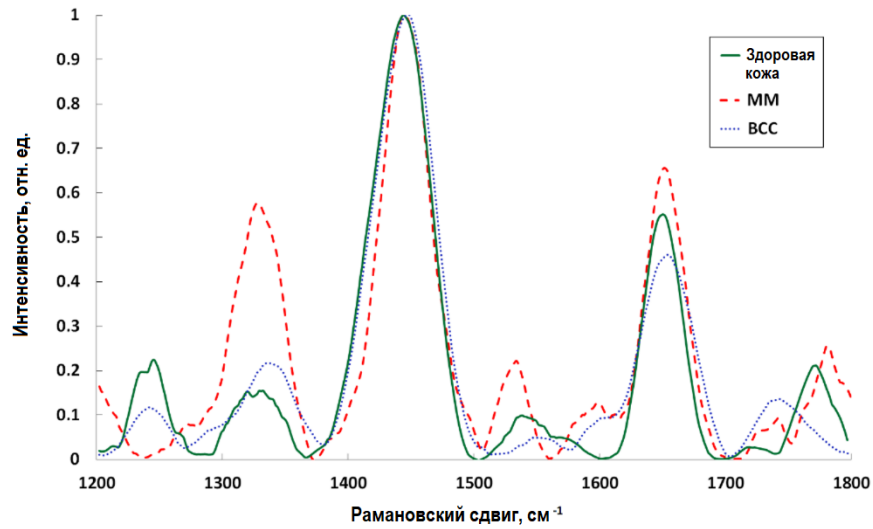


Рисунок 2.4 – Нормализованные *ex vivo* спектры Рамановского рассеяния нормальной ткани кожи, MM и BCC

Анализ Рамановских спектров проводился с помощью двухэтапного метода фазово-пространственного анализа [143, 145], который основан на оценке изменения соотношения между спектральными пиками I_k RS в области опухоли и здоровой ткани вблизи опухоли. Нормализованная интенсивность I_k определялась как отношение максимальной интенсивности комбинационного рассеяния k -ой спектральной полосы к максимальной интенсивности комбинационного рассеяния в полосе 1440-1460 см^{-1} как наиболее интенсивной полосы комбинационного рассеяния типичных спектров комбинационного рассеяния как для рака, так и для нормальной кожи (рисунок 2.4). Такой подход позволяет отделить злокачественную и нормальную ткань на первом этапе анализа. Дифференцирование типов рака среди отобранных раковых образцов проводилось на втором этапе с помощью введенных коэффициентов:

$$RS_k = \frac{|I_k^{(m)} - I_k^{(h)}|}{I_k^{(m)} + I_k^{(h)}}, \quad (2.3)$$

где $I_k^{(m)}$ и $I_k^{(h)}$ - абсолютные значения интенсивности k -ой спектральной полосы для злокачественных образований (индекс m) и здоровой кожи (индекс h) одного и того же пациента. Эти коэффициенты используют информацию как от опухоли, так и от нормальной кожи, расположенной рядом с новообразованием, и, как следствие, позволяют оценить изменение биохимического состава опухоли с учетом индивидуальных особенностей кожи пациента. Были использованы коэффициенты для двух наиболее интенсивных спектральных диапазонов $k = 1320$ и 1660 см^{-1} для дифференциации тканей кожи на фазовой плоскости с применением ДА.

Двухэтапный анализ Рамановских спектров образцов кожи приведен на рисунке 2.5. Здесь каждый тестируемый образец представляет собой одну точку на фазовой плоскости с координатами, соответствующими спектральным коэффициентам Рамановского рассеяния для описанного выше двухступенчатого алгоритма. Рисунок 2.5а представляет собой первый этап анализа, где отделяются нормальные ткани кожи от злокачественных новообразований. Такая классификация возможна с общей точностью 54,7% при использовании линейного ДА. Точность выделения ММ по сравнению со всеми другими типами кожи достигает 72,7%. Можно видеть, что области нормальной кожи и ВСС в основном перекрываются на рисунке 2.5а, и, таким образом, разделение злокачественной и нормальной ткани кожи затруднено. Поэтому коэффициенты I_{1320} и I_{1660} можно считать малоинформативными для анализа злокачественности тканей кожи.

С другой стороны, проблема отделения нормальной кожи от злокачественных тканей не столь актуальна в клинической практике, как проблема точного определения типа злокачественной ткани. Более целесообразно разделять ММ и ВСС. Для этой цели коэффициенты I_{1320} и I_{1660} были дополнены коэффициентами RS_{1320} и RS_{1660} , которые использовались на втором этапе анализа (рисунок 2.5б). Общая точность разделения ВСС и ММ выросла до 80,3% для двухэтапного метода. Однако, достигнутая точность на 8% ниже точности, показанной в предыдущем исследовании [143]. Снижение точности обусловлено большей дисперсией содержания компонентов ткани из-за трехкратного увеличения количества тестируемых образцов тканей кожи.

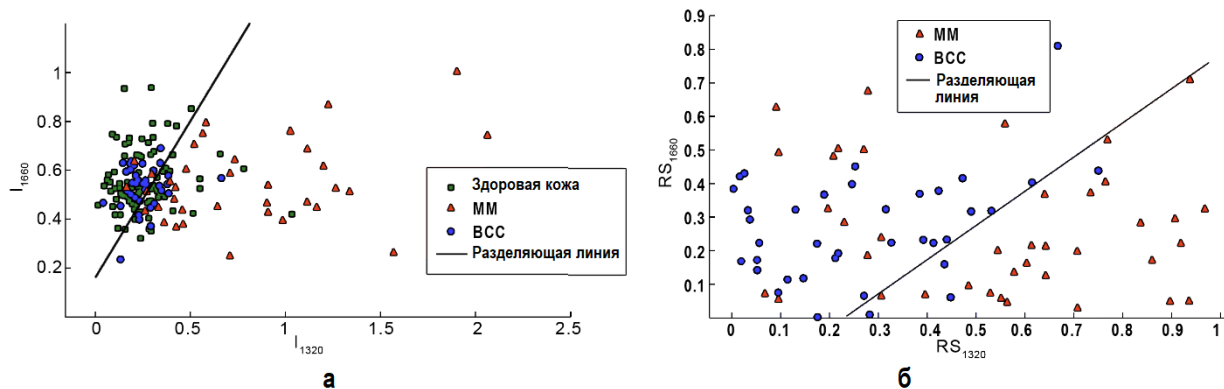


Рисунок 2.5 – Классификация тканей кожи по двухэтапному алгоритму на основе RS: (а) первый шаг – MM vs все другие ткани кожи, и (б) второй шаг – MM vs BCC

Объединение спектральных признаков AF и RS для совместного ex vivo исследования новообразований кожи

Поскольку каждый предложенный критерий отслеживает изменения различных компонентов новообразования, повышение точности классификации новообразований может быть достигнуто путем сочетания критериев, основанных на различных спектроскопических подходах. Например, на рисунке 2.6 представлена фазовая плоскость для анализа пары критериев для мониторинга относительного содержания порфиринов, липидов и флавинов и оценки уровня меланина (FI_{VIS} и $F\lambda_{NIR}$). Комбинация критериев AF в видимой и NIR областях обеспечивает более точное на 8-10% разделение MM и BCC по сравнению с анализом одиночной NIR или видимой AF.

Вместо использования отдельных пар критериев более эффективно одновременно анализировать как можно больше критериев, выполняя классификацию компонентов ткани в многомерном пространстве критериев. Такая классификация была выполнена в четырехмерном пространстве критериев (FI_{NIR} и $F\lambda_{NIR}$ для NIR AF и RS_{1320} и RS_{1660} для анализа RS) для когорты из 158 исследованных образцов тканей кожи (79 образцов нормальной кожи, 39 MM и 40 BCC) и в шестимерном пространстве (дополнительно измерены FI_{VIS} и $F\lambda_{VIS}$ для видимой AF) для когорты из 74 образцов (37 образцов нормальной кожи, 27 BCC и 10 MM) [129].

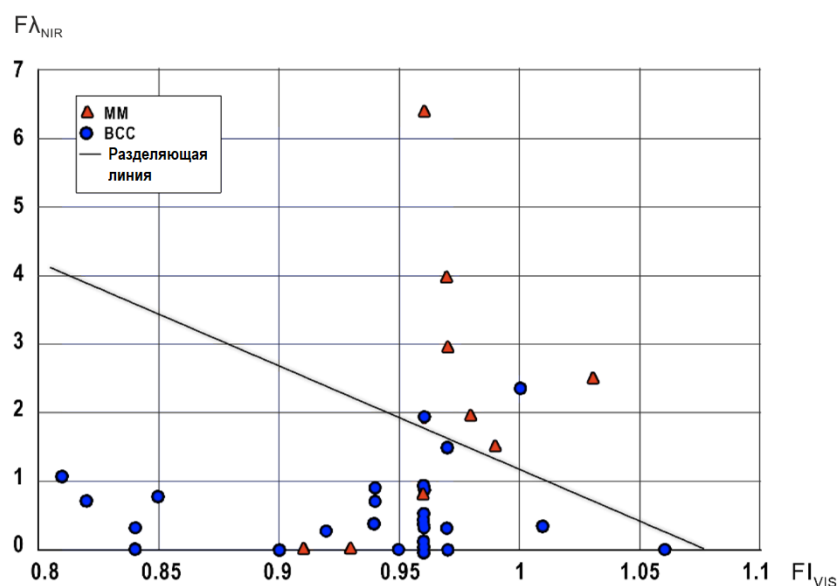


Рисунок 2.6 – Классификация ММ и ВСС на основании относительного содержания порфиринов, липидов и флавинов и оценки уровня меланина (FI_{VIS} и $F\lambda_{NIR}$)

Рисунок 2.7 демонстрирует трехмерное представление PCA четырехмерного пространства [146] (PC – principal components – принципиальные компоненты). Данный тип анализа помогает уменьшить размерность данных, сохраняя при этом большинство особенностей в анализируемом наборе данных. PCA использует направления, называемые основными компонентами, вдоль которых изменение данных является максимальным. Изолируя несколько компонентов, каждый образец может быть представлен сравнительно небольшим числом вместо нескольких переменных. При этом исследуемые образцы могут быть нанесены на график в виде отдельных точек (с координатами, соответствующими положению образца в многомерном пространстве), что позволяет визуально оценить сходства и различия между исследуемыми образцами [147]. При таком подходе сложные оптические методы демонстрируют высокую эффективность разделения ММ и ВСС: чувствительность и специфичность классификации раковых тканей составляют 94,9% и 92,5%, соответственно, в пространстве 4-мерных критериев, и 100% и 96,3% для критериев шестимерном пространстве.

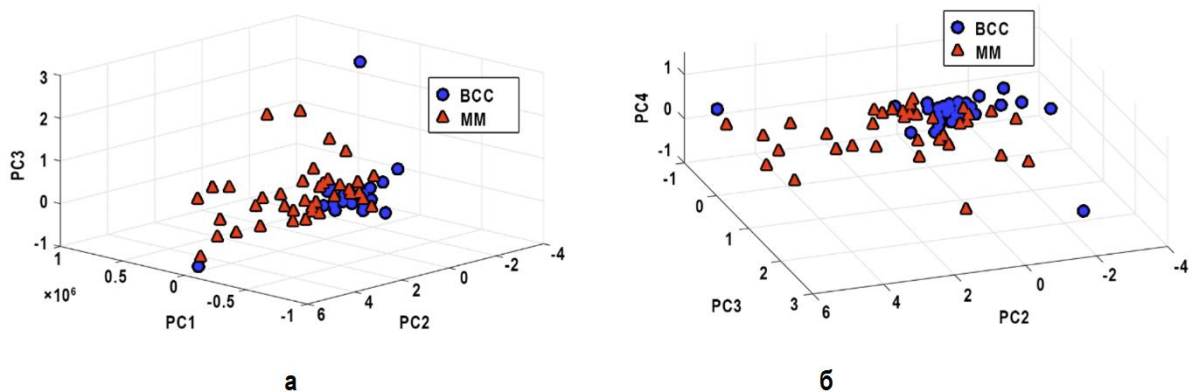


Рисунок 2.7 – Классификация MM и BCC с применением PCA в четырехмерном пространстве признаков: (а) PC1, PC2, и PC3, и (б) PC2, PC3, и PC4

Точность дифференциации MM и BCC несколько выше для случая анализа в шестимерном пространстве признаков. Этот факт может быть вызван как увеличением количества привлекаемых к анализу критериев (дополнительных критериев AF в видимой области), так и уменьшением количества исследуемых образцов. Была рассчитана корреляция между выбранными критериями [129], чтобы оценить сравнительное повышение точности классификации и ее независимости от числа тестируемых образцов ткани. Таблица 2.1 демонстрирует величины рассчитанных корреляций между введенными коэффициентами.

Таблица 2.1 – Корреляция между критериями RS_{1320} , RS_{1660} , FI_{NIR} , $F\lambda_{NIR}$, FI_{VIS} и $F\lambda_{VIS}$. Значимые корреляции (p -value<0.01) выделены жирным шрифтом.

	RS_{1320}	RS_{1660}	FI_{NIR}	$F\lambda_{NIR}$	FI_{VIS}	$F\lambda_{VIS}$
RS_{1320}	1.00	0.63	0.26	0.42	0.18	0.12
RS_{1660}	0.63	1.00	0.02	0.17	0.08	0.28
FI_{NIR}	0.26	0.02	1.00	0.25	0.32	0.22
$F\lambda_{NIR}$	0.42	0.17	0.25	1.00	0.024	0.14
FI_{VIS}	0.18	0.08	0.32	0.024	1.00	0.08
$F\lambda_{VIS}$	0.12	0.28	0.22	0.14	0.08	1.00

Сравнительный анализ полученной точности *ex vivo* диагностики новообразований кожи

Наибольшая точность разделения ММ и ВСС на фазовой плоскости с использованием линейного DA была продемонстрирована при сочетании критериев FI_{NIR} и $F\lambda_{NIR}$, когда один из критериев показал, что новообразование представляет собой ММ. В этом случае значения чувствительности и специфичности для диагностики ММ составили 100% и 63,0% соответственно. Общая точность составляет всего 73,0%, и это даже меньше, чем при реализации одного критерия $F\lambda_{NIR}$. Этот результат, вызванный низкой специфичностью пары критериев FI_{NIR} и $F\lambda_{NIR}$, обусловлен тем, что достаточно большое количество образцов ВСС в этом случае классифицируется как ММ. Точность классификации ММ и ВСС с линейным DA повышается до 87% для одновременного анализа спектров кожи в ближней и видимой областях. Точность дифференциации ММ и ВСС ниже на 5-15%, когда используется только один из спектральных диапазонов. Самая низкая точность была выявлена для комбинации критериев AF видимой области спектра и RS_{1660} . Данные критерии показывают самые низкие значения чувствительности и специфичности, а общая точность обнаружения ММ не превышает 54%. Наиболее полезными критериями для разделения ММ и ВСС являются RS_{1320} и $F\lambda_{NIR}$, показывающие точность 78,9% и 77,2% соответственно. Точность классификации новообразований кожи представлена в Таблице 2.2.

Сравнение достигнутой точности с другими методами диагностики ММ с использованием методов AF позволяет сделать вывод об очень схожих результатах. Например, Борисова с соавт. [93] достигли точности разделения меланом и немеланомных раковых образований кожи с точностью 93,6% благодаря комбинации анализа AF и обратно рассеянного излучения. Таким образом, совместное применение двух спектроскопических методов показало схожую диагностическую точность обнаружения ММ, как и проведение анализа AF в видимой и NIR областях. Wang с соавт. [43] сообщили, что точность диагностики рака кожи с применением AF находится на уровне 80-90%, что сопоставимо с полученными результатами. Значительное улучшение точности диагностики AF при опухолях кожи возможно при мониторинге экзогенных флуорофоров [94]. Однако внедрение экзогенных флуорофоров является дорогостоящим и требует их введения в организм пациента, что делает такое исследование флуоресценции неприемлемым для массового скрининга.

Таблица 2.2 – Чувствительность и специфичность разделения ММ и ВСС при использовании различных критериев и их комбинаций

Критерии	Чувствительность, %	Специфичнос ть, %	Точность, %
<i>RS₁₃₂₀</i>	89.7	67.6	78.9
<i>RS₁₆₆₀</i>	82.0	37.8	60.5
<i>FI_{NIR}</i>	74.4	47.5	60.8
<i>Fλ_{NIR}</i>	69.2	85.0	77.2
<i>FI_{VIS}</i>	100	43.4	50.0
<i>Fλ_{VIS}</i>	100	33.3	51.4
<i>RS₁₃₂₀ and RS₁₆₆₀</i> (двухэтапный метод RS)	97.4	62.2	80.3
<i>FI_{NIR} and Fλ_{NIR}</i> (NIR AF)	92.3	37.5	64.6
<i>FI_{VIS} and Fλ_{VIS}</i> (видимая AF)	80.0	77.8	78.4
<i>FI_{VIS} and Fλ_{NIR}</i> (видимая и NIR AF)	70.0	92.6	86.5
<i>FI_{NIR}, Fλ_{NIR}, RS₁₃₂₀ and RS₁₆₆₀</i> (четырёхмерный подход)	94.9	92.5	93.7
<i>FI_{NIR}, Fλ_{NIR}, RS₁₃₂₀, RS₁₆₆₀, FI_{VIS} and Fλ_{VIS}</i> (шестимерный подход)	100	96.3	97.3

Можно использовать более двух критериев для повышения точности классификации злокачественных тканей, так как в этом случае мы оцениваем широкий набор изменений структурных компонентов биотканей. Анализ классов тканей кожи с помощью

комплексных методов, основанных на четырехмерных или шестимерных подходах, показывает улучшение разделения ММ и ВСС до 8-11% по сравнению с анализом фазовой плоскости, где точность шестимерного подхода на 3,6% выше, чем в случае четырехмерного подхода. Такое повышение точности обусловлено большей вероятностью найти различия между выбранными критериями в многомерном пространстве. С другой стороны, данные для шестимерного подхода были получены для меньшего числа образцов, и только анализ корреляции помог подтвердить, что повышение точности классификации новообразований кожи связано именно с анализом дополнительных биохимических компонентов тканей кожи.

Самый высокий коэффициент корреляции был получен для комбинации диагностических критериев RS_{1320} и RS_{1660} , тогда как пара критериев FI_{NIR} и RS_{1660} показывает самую низкую корреляцию. Пары $F\lambda_{NIR}$, FI_{VIS} и $F\lambda_{VIS}$ также показывают довольно низкую корреляцию по сравнению с парами FI_{NIR} и $F\lambda_{VIS}$, RS_{1320} и RS_{1660} . Корреляция между критериями RS_{1320} и RS_{1660} может быть объяснена проведенной нормировкой полученных Рамановских спектров. Каждый Рамановский спектр был нормирован на свой максимум, поэтому наблюдаются вклад полосы 1450 см^{-1} в критериях RS_{1320} и RS_{1660} . Наличие Рамановской полосы 1450 см^{-1} приводит к их сильной корреляции, превышающей 0,6. Значение корреляции между критериями комбинационного рассеяния (RS_{1320} и RS_{1660}) и критериями NIR AF (FI_{NIR} и $F\lambda_{NIR}$) лежит в интервале 0,02 - 0,43. Значение корреляции, превышающее 0,4, можно объяснить влиянием меланина в критериях NIR AF и RS. Huang с соавт. [148] показали, что основные пики меланина лежат в полосах 1380 и 1580 см^{-1} . Эти пики могут быть связаны с полосами CH_2 , CH_3 и $\text{C}=\text{C}$. Согласно Huang с соавт. [148], концентрация меланина в коже влияет на полосы 1320 - 1340 , 1450 и 1660 см^{-1} . В свою очередь, критерии FI_{NIR} и $F\lambda_{NIR}$ содержат информацию о влиянии меланина на спектры AF, и соответственно, соотносятся с критериями RS_{1320} и RS_{1660} . Эта корреляция играет наиболее значимую роль для пары критериев RS_{1320} и $F\lambda_{NIR}$, где она достигает значения 0,43. Разумно предположить, что такая относительно сильная корреляция обусловлена присутствием ММ в исследуемой когорте образцов, поскольку ММ содержит много меланина.

Соотношение критериев для AF в видимой области (FI_{VIS} и $F\lambda_{VIS}$) с критериями RS и критериями NIR NF не превышает 0,28 и 0,32 соответственно. Эта корреляция ниже, чем корреляция между критериями RS и NIR NF, и может объясняться различным составом биохимических компонентов, измеренных для видимой ФФ. Одним из наиболее важных компонентов, измеренных для AF в видимой области спектра, являются порфирины.

Содержание порфиринов в верхних слоях кожи определяется наличием в эндогенных клетках кожи порфиринов и порфиринов, продуцируемых бактериями [139]. Стимулированные спектры кожи и бактериальные порфирины вносят вклад как в АФ в видимой области, так и в исследуемых полосах RS, так как порфирины содержат много полос CH_2 , CH_3 , $\text{C} = \text{N}$ и $\text{C} = \text{C}$ [149]. В результате, присутствие порфиринов влияет на интенсивность выбранных полос RS и тем самым влияет на величины критериев RS_{1320} и RS_{1660} .

Самую низкую корреляцию показывают критерии пары FI_{VIS} и $F\lambda_{VIS}$ или FI_{VIS} и RS_{1660} . Значение корреляции составляет всего 0,08 для обеих пар. Критерии АФ для видимой области используют информацию от существенно разных биохимических компонентов тканей. Величина критерия FI_{VIS} зависит от содержания флавинов и липопигментов, тогда как величины критерия $F\lambda_{VIS}$ зависят от содержания порфирина. Напротив, критерий RS_{1660} использует информацию Рамановских полос 1450 и 1660 cm^{-1} , которые обусловлены жирными кислотами [150], поскольку метаболизм липидов изменяется во время роста опухоли [151]. Низкая корреляция между критериями FI_{VIS} и RS_{1660} может объясняться вкладом флавинов в критерий FI_{VIS} , так как флавины имеют довольно небольшую интенсивность в Рамановской полосе 1660 cm^{-1} [152].

Поскольку некоторые из выбранных критериев имеют сильную взаимную корреляцию, можно уменьшить количество критериев путем выбора критериев с наименьшими корреляциями для достижения максимальной точности диагностики в трехмерном фазовом пространстве. В трехмерном пространственном анализе мы используем РС с самыми высокими вариациями и с самой низкой корреляцией между собой. Этот анализ обеспечивает точность 85-98% при разделении ММ и ВСС. Различия в точности разделения тканей кожи на основе применения четырехмерного и шестимерного подходов обусловлены введением дополнительных критериев АФ для видимой области спектра. Эти критерии имеют низкую корреляцию с критериями RS и NIR АФ, а их применение повышает чувствительность и специфичность разделения ММ и ВСС приблизительно на 4%.

В целом, такой мультимодальный подход к оптической классификации злокачественных новообразований кожи на основе системы, объединяющей принципы RS, видимого и NIR АФ, показывает высокий потенциал в диагностике ММ и ВСС. Таким образом, предлагаемый подход может быть далее реализован для проведения клинических *in vivo* исследований новообразований кожи.

Комбинация анализа AF с RS исследованием позволяет повысить чувствительность и специфичность выявления ММ до 95-100% за счет участия в критериальном анализе изменений концентрации порфиринов, флавинов и меланина наряду с критериями RS (исследование содержания в ткани липидов и протеинов). Высокий уровень точности классификации злокачественных опухолей кожи свидетельствует о высоком клиническом потенциале предлагаемого метода. Этот метод может использоваться как для точного определения типа опухоли, так и для массовых скрининговых исследований. Например, быстрый анализ больших областей ткани может быть выполнен на первом этапе только с критериями AF, поскольку сигнал AF намного интенсивнее, чем сигнал RS, и его можно зарегистрировать в течение короткого времени. Точность анализа только AF ткани кожи составляет около 87% и может быть увеличена с помощью анализа RS подозрительных областей на следующем этапе. Такой совместный анализ будет характеризоваться 100% чувствительностью и 96% специфичностью.

В главе продемонстрировано, что предлагаемый многопараметрический комплексный анализ RS и AF является быстрым, надежным и экономически эффективным, поскольку он может быть выполнен одновременно и с использованием одного устройства. Дальнейшее повышение эффективности диагностики может быть достигнуто путем включения методов визуализации патологий. Например, Wang с соавт. [153] показали возможность сочетания RS и ОКТ для исследования злокачественности тканей. Другой возможной областью применения комплексного метода RS и AF является гиперспектральная визуализация [154] с одновременной регистрацией куба спектральных данных как для опухоли, так и для здоровой кожи. В результате гиперспектральная визуализация может наиболее эффективно использовать предложенный шестимерный подход.

Несмотря на высокую продемонстрированную точность *ex vivo* мультимодального анализа тканей кожи человека, следует отметить, что переход к *in vivo* исследованиям сопряжен с рядом трудностей. Проведение *in vivo* исследования потребует оптимизации уровня мощности зондирующего излучения, так как использованная мощность лазерного излучения для *ex vivo* анализа новообразований кожи была немного (на 8%) выше установленной международной нормы по безопасному использованию лазерной техники в медицинских приложениях [155]. Понижение мощности зондирующего излучения неизбежно приведет к падению соотношения сигнал-шум для Рамановской компоненты анализируемого сигнала. Кроме того, для получения информации о возможности внедрения метода анализа новообразований кожи с применением «оптической биопсии» в клиническую практику потребуется провести анализ гораздо большего числа образцов

тканей кожи. Потребуется перейти от измерения десятка образцов, как было продемонстрировано в данной главе, к измерениям сотен образцов. Такой переход повлечет за собой необходимость в проведении углубленного статистического анализа регистрируемых спектральных данных. В данной главе основные полосы спектра (как в случае АF, так и для Рамановской компоненты), несущие информацию о хромофорах тканей кожи выбирались на основе анализа научных литературных данных. При этом в различные спектральные полосы (особенно в Рамановские) как правило вносят вклад сразу множество компонентов исследуемой ткани. Учитывая сложность компонентного состава кожи как таковой, а также непредсказуемый компонентный состав каждого конкретного новообразования, возникает необходимость в проведении автоматического анализа регистрируемых спектральных данных.

Выводы по главе:

Применение сочетания АF и RS для анализа новообразований кожи продемонстрировало высокую точность определения типа конкретного новообразования. Такая комбинация позволяет повысить чувствительность и специфичность выявления ММ до 95-100% за счет участия в критериальном анализе изменений концентрации порфиринов, флавинов и меланина наряду с критериями RS (исследование содержания в ткани липидов и протеинов). Точность анализа только АF ткани кожи составляет около 87% и может быть увеличена с помощью анализа Рамановского спектра. Такой совместный анализ будет характеризоваться 100% чувствительностью и 96% специфичностью.

Недостатком предлагаемой методики является усложнение технической реализации прибора, использующего комбинацию АF и RS, а также увеличение длительности анализа исследуемого участка ткани. Как альтернатива усложнению многопараметрического подхода и добавлению новых оптических методов исследования биотканей существует возможность проведения более глубоко статистического анализа для выявления скрытых в спектральных данных закономерностей. Такой подход может быть гораздо точнее, чем простое использование интегральных коэффициентов, с другой стороны, разработка такого подхода требует изучения дополнительных вопросов (например, мультиколлинеарности исследуемых данных), а также требует анализа уровня шумов, неизбежно содержащихся в спектральных данных. В последующих главах будет показана возможность использования современных статистических подходов к анализу зашумленных данных «оптической биопсии».

3 ОПТИЧЕСКАЯ БИОПСИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА *IN VIVO*

3.1 Проведение исследований на тестовой когорте пациентов

В предыдущей главе было описано исследование рака кожи *ex vivo* с использованием методов RS и AF с использованием высокочувствительной лабораторной спектроскопической системы (с охлаждением цифровой камеры до $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$), при этом была достигнута точность 97,3% для диагностики злокачественной меланомы. Следующим шагом настоящих исследований стало дальнейшее развитие вышеописанной методики в условиях клинической практики. Теперь, чтобы развить идею скрининга кожи человека, было решено использовать портативную мобильную установку (с охлаждением детектора всего лишь до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) и предложенную ранее экспериментальную схему регистрации спектров. Чтобы определить возможность достижения требуемого уровня диагностической точности с применением недорогого портативного устройства требуется в первую очередь сравнить отношение сигнал/ шум (signal to noise ratio – SNR) портативного спектрометра к ранее использовавшейся высокочувствительной системе. Было проведено сравнение отношения SNR портативного спектрометра к ранее использовавшейся высокочувствительной системе, чтобы оценить применимость портативного устройства для задач клинической диагностики рака кожи *in vivo* [46, 47].

В данной главе будет описана разработка спектроскопического диагностического аппарата для *in vivo* диагностики и определения типа опухолей кожи в клинической практике с на основе RS и AF с использованием портативного спектрометра [31]. Метод обработки данных на основе PLS-DA использовался для анализа собранных спектральных данных. Несколько классификационных моделей были построены для классификации различных типов новообразований кожи на основе совместного и независимого применения спектроскопии RS и AF. Эти модели помогли оценить вклад каждого спектроскопического метода в окончательную точность диагностики опухолей кожи. Эффективность такой «оптической биопсии» сравнивалась с точностью диагностики специализированного врача-онколога.

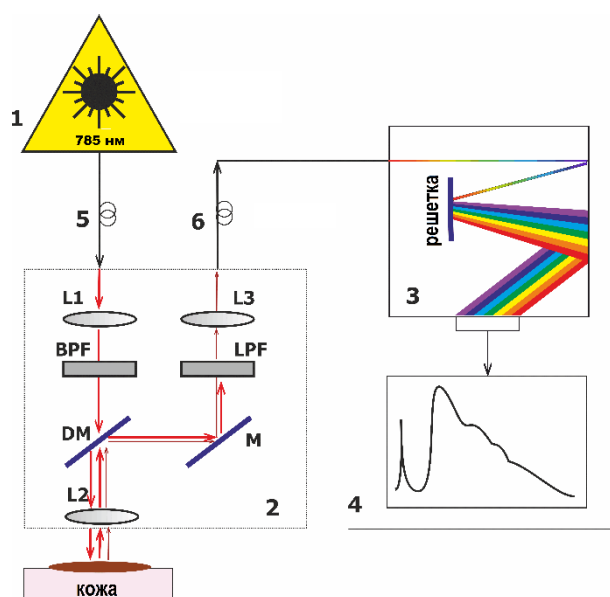
Портативный спектрометр для регистрации Рамановских спектров кожи человека in vivo

На рисунке 3.1 показана экспериментальная портативная система, которая позволяет одновременно регистрировать спектры RS и AF в ближней инфракрасной области. В качестве источника излучения использовался термостабилизированный диодный лазерный модуль LML-785.0RB-04 с центральной длиной волны $785 \pm 0,1$ нм. Мощность лазера на коже составляла примерно 30 мВт при плотности мощности лазерного излучения $1,56$ Вт/см² на коже. данная плотность мощности лазерного излучения не превышает максимально допустимый предел воздействия согласно межгосударственному стандарту [156] (аналог ANSI) $1,63$ Вт/ см². Следует отметить, что рассеянное излучение собиралось с верхнего слоя кожи толщиной от 1 до 2 мм, а наибольший вклад в Рамановский сигнал дает преимущественно дерма (приблизительно 70%) [128, 157]. Оптический детектор был расположен непосредственно над образцом ткани на расстоянии от 7 до 8 мм. Диаметр луча зондирующего излучения на исследуемой ткани составлял примерно 3 мм.

В экспериментальной части *in vivo* исследования был использован лабораторный многоканальный спектрограф Shamrock SR-500i-D1-R с цифровой камерой Andor iDus CCD DU416A-LDC-DD от Oxford Instruments (установка Andor) и мобильный спектрометр QE65 Pro от Ocean Optics Inc. (установка QE) для регистрации NIR спектров RS и AF сигналов. Камера Andor охлаждалась до -65 °С. Регистрацию Рамановского и AF-излучения проводили в спектральных полосах от 790 до 930 нм со спектральным разрешением не менее $0,05$ нм. Регистрация спектров с использованием установки QE проводилась в области 780-1000 нм со спектральным разрешением не менее $0,2$ нм. Детектор QE охлаждался всего лишь до -15 °С.



а



б

Рисунок 3.1 – Портативная Рамановская система для *in vivo* исследований кожи человека:

а – фото, б – оптическая схема

(1 – лазерный модуль, 2 – Рамановский зонд, 3 – спектрометр, 4 – ПК, 5 – волокно возбуждения, 6 – собирающее волокно; лазерное излучение с длиной волны 785 нм подается на оптический детектор с помощью волокон возбуждения (5) и коллимирующей линзы L1, далее проходит через полосовой фильтр (BPF). Дихроичное зеркало (DM) передает лазерное излучение на линзу L2, которая фокусирует возбуждающее излучение на образце. Эта же линза L2 собирает Рамановское, AF и обратно рассеянное излучение. DM и зеркало (M) передают собранное излучение на широкополосный фильтр (LPF) для отсекающего возбуждающего лазерного излучения, согласующая линза L3 и собирающее волокон 6, передают отфильтрованное излучение к многоканальному спектрометру

Установки Andor и QE использовались в лабораторных экспериментах для определения эффективности регистрации Рамановского сигнала, результаты сравнивались для определения уровня SNR для обеих установок. Установка QE была использована для регистрации спектров различных новообразований кожи в исследованиях *in vivo*.

Анализ уровня шумов

Для определения оптимальных характеристик регистрации спектров тканей кожи с помощью установок Andor и QE была использована следующая функция SNR:

$$snr = \frac{S_{RS}}{\sqrt{D_{SN}}}, \quad (3.1)$$

где S_{RS} – уровень Рамановского сигнала (интенсивность Рамановского пика в полосе 1440-1460 cm^{-1} после его выделения из необработанных зарегистрированных спектров с использованием полиномиального приближения [128]);

D_{SN} - дисперсия шума в области 787-800 нм.

Рассчитываемый шум практически характеризует дисперсию темновых токов на фотодетекторе в области спектра, где Рамановский сигнал почти полностью подавляется широкополосным фильтром. Принимая во внимание, что шум является случайным процессом с гипотетически нормальным распределением, SNR возможно количественно определить следующим образом:

$$SNR = \frac{snr}{6}. \quad (3.2)$$

В этом случае SNR имеет то же значение, что и S_{RS} , и связан с динамическим значением диапазона регистрируемых шумов. Использование статистического значения (дисперсии) вместо регистрируемых пиковых значений шума необходимо, чтобы компенсировать природную случайность темнового сигнала.

Для сравнения коэффициентов SNR для установок Andor и QE был проведен ряд тестовых экспериментов. Спектры регистрировались для разного времени накопления сигнала и различной степени охлаждения детекторов. Использовалось максимальное

охлаждение детекторов (-15 °С и -65 °С для установок QE и Andor соответственно) и варьировалось время регистрации сигнала (10–90 с). Далее устанавливалось время регистрации сигнала равное 60 с, при этом менялась степень охлаждения детекторов QE и Andor. Охлаждение детектора Andor варьировалось в диапазоне от -30 до -65 °С. При температуре детектора выше -30 °С регистрировался только шумовой сигнал. Для установки QE регистрация спектров проводилась при температурах -7 °С, -10 °С, -15 °С. Регистрация спектров проводилась для нормальной кожи предплечья здорового добровольца (женщина, 23 года, фенотип кожи II).

Пациенты

Протоколы *in vivo* диагностики тканей кожи были утверждены этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета. Всем пациентам было не менее 18 лет. Информированные согласия были получены от всех пациентов, участвовавших в исследовании, непосредственно до проведения *in vivo* измерений спектральных характеристик кожи.

In vivo исследование опухолей кожи проводилось в Самарском областном клиническом онкологическом диспансере. В данном исследовании приняли участие 54 пациента с опухолями кожи (27 женщин, 27 мужчин, европейцы, I и II фенотип кожи). На первом этапе специализированный онколог обследовал каждого пациента. Онколог определял предварительный диагноз обследуемого новообразования кожи на основании визуального осмотра и дерматоскопического изображения. Затем спектроскопическая система (QE) применялась для проведения оптической биопсии рака кожи и определения диагноза. Следует отметить, что осмотр врача и инструментальная диагностика проводились независимо друг от друга.

Далее выполнялась хирургическая резекция опухоли с последующим гистологическим анализом. Было исследовано 17 злокачественных меланом (ММ): 2 меланомы I стадии (по классификации Бреслоу), 10 меланом II стадии, 3 меланомы III стадии и 2 меланомы IV стадии, 18 базальноклеточных карцином (ВСС) и 19 доброкачественных опухолей (ВН) (дерматофибромы, фибропапилломы, гемангиомы, кератомы, кератоз и др.); все диагнозы определялись на основании гистологического анализа. В данном исследовании с помощью портативной спектроскопической системы зарегистрировано 56 спектров новообразований кожи (19 ММ, 18 ВСС и 19 ВН). Размеры новообразований кожи варьировались в широких пределах от 0,4 до 5 см. Исследуемые новообразования располагались на разных участках

тела. Подробное распределение исследованных новообразований кожи человека, включая информацию о локализации опухоли и финальном диагнозе, приведено в таблице 1.

Таблица 3.1 – Исследованные новообразования кожи человека

	Пациенты		Расположение				Средний возраст, лет	Средний диаметр, см
	М	Ж	Голова	Верхние конечности	Нижние конечности	Торс		
ММ	6	11	4	1	6	6	64 (44-87)	1.9 (0.4-4.8)
BCC	12	6	10	1	1	6	68 (48-83)	1.8 (0.5-3)
BN	9	10	3	5	4	7	58 (30-78)	1.6 (0.4-5)

Статистический анализ in vivo спектральных данных на основе применения проекции на латентные структуры

Необработанные спектры новообразований кожи человека представляют собой комбинацию Рамановского сигнала, AF-сигнала и шума. Анализ спектральных данных проводился в диапазоне от 803 до 914 нм, что соответствует Романовскому смещению 300-1800 см⁻¹. Многофакторный анализ спектральных данных проводился с использованием программного обеспечения MdaTools [158]. Зарегистрированные спектры новообразований были предварительно обработаны с удалением базовой линии, сглаживанием по методу Савицкого-Голея, нормализацией и центрированием данных. Нормализация спектров на стандартное отклонение позволяет частично исключить вариабельность спектров тканей кожи, вызванную изменениями в составе хромофоров для каждого конкретного индивида и изменениями состава хромофоров кожи для разных участков тела человека [159, 160].

Обработка экспериментальных данных проводилась на основе регрессионного анализа с использованием проекции на латентные структуры и дискриминантного анализа (PLS-DA) [161]. Метод PLS-DA позволяет построить регрессионную модель для идентификации спектров по классам новообразований на основе значительных спектральных различий в исследуемой выборке. Количество скрытых переменных для моделей PLS-DA было

выбрано по критерию наименьшей ошибки прогноза в перекрестной проверке (кросс-валидации). Была выбрана модель на основе десятиблоковой перекрестной проверки (10-fold cross validation). Кроме того, оценивалась значимость переменных в проекции (variable importance in projection – VIP) [162]. Оценка VIP показывает важность переменных для способности прогнозирования построенной модели. Чем выше значение VIP-оценки, тем важнее соответствующая переменная в построенной PLS-DA модели. В данном исследовании VIP-оценки позволяют выявить информативные полосы спектров новообразований при проведении регрессионного анализа для классификации различных типов опухолей кожи. Если VIP-оценки выделяют полосы, которые не совпадают с максимумом Рамановских пиков, то значимые для модели различия должны наблюдаться в первой производной (определяющей «наклон» или «крутизну» Рамановских пиков). Чтобы определить точность дифференциации анализируемых типов новообразований, были рассчитаны PLS предикторы, чтобы представить числовое значение диагноза новообразования в построенной модели.

Результаты дифференцирования опухолей кожи представляются с использованием диаграмм в виде ящичков с усами, построенных на основании PLS предикторов, и кривых рабочих характеристик приемника (ROC). Анализ ROC кривых показывает диагностические характеристики построенной модели классификации новообразований кожи. Для количественного анализа точности проводимой классификации была рассчитана площадь под ROC кривой (area under the curve – AUC) [163].

Анализ спектров, зарегистрированных портативной установкой при использовании длины возбуждения 785 нм

Применение установки QE не позволяет выделить Рамановские пики в области от 300 до 1200 см^{-1} из-за низкого уровня сигнал-шум. В данной спектральной области флуоресценция меланина перекрывает слабый Рамановский сигнал [164]. Поэтому в этой области анализировались только AF особенности кожных новообразований. Каждый зарегистрированный спектр был разделен на 2 области: от 300 до 1200 см^{-1} и от 1200 до 1800 см^{-1} . В диапазоне от 1200 до 1800 см^{-1} наблюдался меньший вклад AF и экспоненциальное уменьшение AF, что позволяло выделять Рамановские пики исследуемых тканей кожи из зарегистрированного сигнала [165]. Таким образом, Рамановские пики биотканей являются важными характеристиками спектрального диапазона от 1200 до 1800 см^{-1} . Анализ полного спектра тканей кожи в области 300-1800

cm^{-1} учитывает как спектральные особенности AF, так и RS анализируемых тканей кожи человека.

Таким образом, анализ спектральных данных проводился для полных спектров в диапазоне от 300 до 1800 cm^{-1} и отдельных частей спектра, содержащих преимущественно информацию о Рамановском рассеянии и AF в диапазонах от 300 до 1200 cm^{-1} и от 1200 до 1800 cm^{-1} соответственно. Чтобы определить вклад каждого метода в возможность дифференциации новообразований кожи, были проанализированы разделенные области спектра для AF и RS, а также полный спектр целиком.

Диагностика новообразований кожи человека специализированным специалистом врачом-онкологом

Перед обследованием пациентов с помощью описанной Рамановской системы специализированный онколог проводил предварительную диагностику на основе визуального осмотра подозрительного участка кожи. В исследовании участвовал кандидат медицинских наук с 16-летним практическим опытом диагностики опухолей кожи. Сравнивая результаты предварительной диагностики и гистологического анализа, была получена точность (чувствительность и специфичность) диагностики онколога. Чувствительность рассчитывалась как доля фактических положительных результатов, которые правильно идентифицированы среди всех опухолей кожи; специфичность рассчитывалась как доля фактических негативов, правильно идентифицированных среди другой группы новообразований кожи.

3.2 Оценка влияния шума на использование портативного оборудования при проведении «оптической биопсии» новообразований кожи человека

Чтобы оценить эффективность портативной установки QE для *in vivo* исследования опухолей кожи с использованием оценки RS и AF, были рассчитаны относительные значения SNR для установок QE и Andor, а также был проведен сравнительный анализ SNR для лабораторной и портативной установок. SNR рассчитывалось в разных режимах регистрации спектра и определялось только для Рамановского сигнала потому, что сигнал AF значительно выше уровня шумов. Принимая во внимание, что детектор QE охлаждался до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, его значение SNR будет меньше, чем для установки Andor [44]. Поэтому для компенсации недостаточного охлаждения детектора QE, было решено увеличить время

сбора сигнала. Тестовые эксперименты проводились с различным временем регистрации сигнала и различной температурой охлаждения детекторов. SNR рассчитывался в соответствии с формулой (3.2). Результаты расчета SNR для двух установок представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 3.2 – Рассчитанные значения SNR для установок QE и Andor при различном времени регистрации сигнала (охлаждение детектора -65 °С для установки Andor, -15 °С для установки QE)

Время регистрации сигнала, с	Andor SNR	QE SNR
10	2	0,4
20	3,5	1,6
30	4,5	1,7
40	4,5	1,8
50	6,2	2,8
60	6,3	3
70	6,5	3
80	7,2	4
90	9,2	4,1

Таблица 3.3 – Коэффициенты SNR для спектрометров QE и Andor при различных температурах детектора (при времени регистрации сигнала 60 с)

Температура, °С	Andor SNR	QE SNR
-7	-	2,2
-10	-	2,4
-15	-	3
-30	0,3	-
-40	0,7	-
-50	1,7	-
-60	4	-
-70	6,3	-

Как видно из таблиц 2 и 3, сигнал SNR в 2-2,5 раза ниже для установки QE по сравнению с установкой Andor для одних и тех же условий. Однако уровень SNR, демонстрируемый установкой Andor, может быть достигнут при использовании спектрометра QE путем увеличения времени регистрации сигнала. В ранее описанных *ex vivo* исследованиях была использована установка Andor для регистрации спектров тканей кожи со временем экспозиции 30 секунд [47]. При 30-секундном времени накопления сигнала для регистрации спектров с помощью спектрометра QE было достигнуто довольно низкое значение SNR, что явно является недостаточным для изучения такой многокомпонентной среды, как кожа человека. В то же время, возможно достичь SNR, эквивалентного установке Andor, увеличив время накопления сигнала до 60-70 секунд. Дальнейшее увеличение времени накопления позволяет получить большее значение SNR для установки QE, но при этом важно принять во внимание некоторые клинические процедуры. Исследование подозрительных участков кожи человека с помощью такой оптической системы проводится в режиме реального времени по назначению врача. Очень сложно долго сохранять условия регистрации сигнала (зафиксировать пациента). Кроме того, время приема пациента у врача (обследование пациента, сбор анамнеза и установление предварительного диагноза) ограничено. Принимая это во внимание, пришлось минимизировать длительность сбора сигнала до минимума. Поэтому все измерения спектров *in vivo* были выполнены с использованием портативного Рамановского спектрометра со временем накопления сигнала 60 секунд и охлаждением детектора до -15 °С.

3.3 Оптическая биопсия меланом, базальноклеточного рака и доброкачественных новообразований кожи

Из-за многослойной и многокомпонентной структуры кожи ее взаимодействие со светом представляет собой сложный процесс, который включает поглощение фотонов, флуоресценцию хромофоров кожи и многократное рассеяние света. В тканях основными веществами, которые активно поглощают и флуоресцируют свет, являются гемоглобин, вода, липиды, флавины, белки, коллагены, нуклеиновые кислоты, меланин и др. [118]. Таким образом, развитие патологии приводит к изменению в биохимическом составе тканей, меняющему поглощающие и флуоресцентные свойства новообразования по сравнению с тканями здоровой кожи.

Интенсивность АФ и форма кривой существенно различаются для разных видов патологии кожи. Характерные особенности формы спектров АФ наблюдаются в диапазоне от 300 до 1200 см^{-1} , в то время как медленное экспоненциальное уменьшение интенсивности АФ характерно в диапазоне от 1200 до 1800 см^{-1} . Спектры характеризуются наличием локальных экстремумов (пиков и минимумов) в ближнем инфракрасном диапазоне, которые появляются из-за вклада эндогенных флуорофоров, особенно меланина, в общий АФ сигнал кожи. Эти особенности спектров АФ связаны с более высокой концентрацией меланоцитов и кератиноцитов в ММ, невусах и других пигментированных тканях кожи по сравнению с нормальной кожей и ВСС. Меланин интенсивно флуоресцирует в ближней инфракрасной области [166], что объясняет высокую интенсивность АФ от пигментированных образований. В области от 300 до 310 см^{-1} наблюдается максимум интенсивности АФ. Это значение различается для разных типов новообразований: интенсивность в начальной области спектра выше для пигментных новообразований по сравнению с ВСС и амеланотическими опухолями. Однако в одном из исследований [130] было показано, что максимум интенсивности АФ является неоднозначно важным диагностическим критерием, потому что он зависит от слишком многих факторов [128], таких как мощность возбуждения, расположение оптического зонда; а при непрерывном излучении уменьшение уровня интенсивности объясняется эффектом фотообесцвечивания тканей [116, 167].

Типичные пики Рамановского рассеяния для новообразований кожи описаны в одном из крупных исследований [47]. Рамановские спектры тканей кожи человека показывают вклад молекулярных колебаний, связанных с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами и аминокислотами: от 1250 до 1300 см^{-1} (амид III, C - N, N - H), от 1320 до 1360 см^{-1} (триптофан). От 1440 до 1460 см^{-1} (полосы CH_2/CH_3 в белках и липидах), от 1550 до 1560 см^{-1} (триптофан), от 1640 до 1680 см^{-1} (C = O валентные колебания группы амид I) [168].

Были проанализированы 4 модели классификации новообразований кожи. Сначала злокачественные опухоли (malignant – MLG) разделялись от доброкачественных опухолей (benign – BN). Затем были продифференцированы опухоли MLG между собой (в основном ММ против ВСС). Принимая во внимание, что ММ является наиболее агрессивной опухолью кожи, была проведена дифференциация ММ по сравнению с другими новообразованиями кожи. Кроме того, учитывалась дифференциация ВСС по сравнению со всеми другими новообразованиями кожи. Каждая диагностическая модель была построена на основе анализа значений VIP, в котором были выделены спектральные полосы с наиболее важными различиями между изученными новообразованиями.

Типичные спектры образований ВСС и ВН с VIP для модели MLG и ВН показаны на рисунке 3.2. Согласно анализу VIP, наиболее информативные различия между спектрами новообразований MLG (n = 37) и ВН (n = 19) наблюдаются в полосах 533, 713, 877, 946, 1048, 1281, 1439, 1562 и 1644 см⁻¹. Таким образом, построенные модели учитывают как Рамановские, так и AF особенности новообразований. На рисунке 3.2а показана диаграмма размаха предикторов PLS на основе извлеченных различий данной модели. Спектральные различия между опухолями MLG и ВН позволяют достичь 100% точности разделения, а ROC AUC равна 1 (рисунок 3.3д). Подобно этой модели, мы провели анализ PLS-DA для других 3 моделей. Краткое описание полученных результатов представлено ниже.

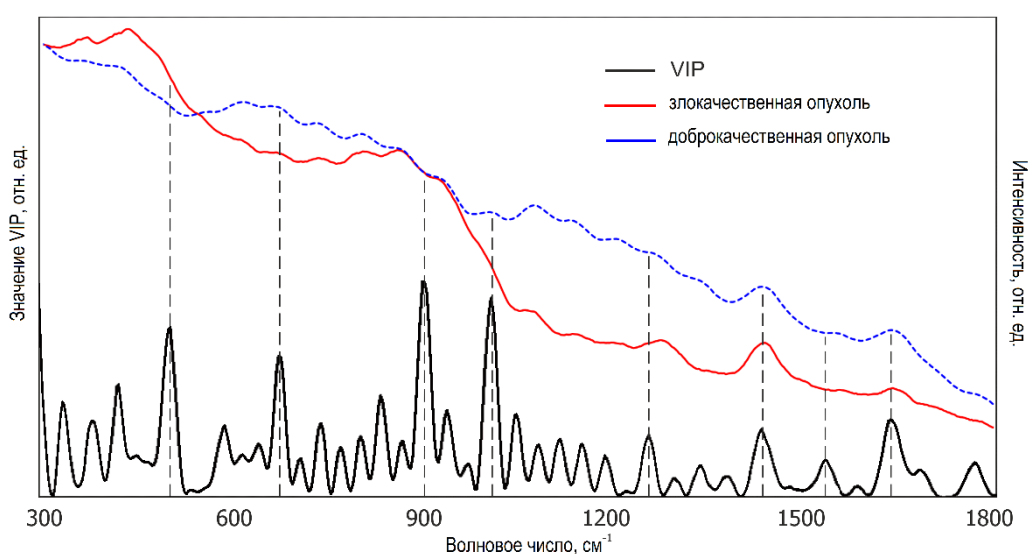


Рисунок 3.2 – VIP-анализ для классификации MLG и ВН

Важные различия между спектрами ММ и ВСС обнаружены в полосах 471, 900, 1075, 1190, 1444, 1535 и 1655 см⁻¹. Распределение PLS предикторов, рассчитанных для спектров ММ и ВСС, представлено на рисунке 3.3б. Линия принятия решения на этой диаграмме отделяет ММ от ВСС с чувствительностью 84,2% и специфичностью 94,4%, а ROC AUC составляет 0,936. Кривая ROC на рисунке 3.3е была построена на основе значения предиктора PLS при различных пороговых значениях.

Чтобы отличить ММ от других новообразований кожи, анализ VIP выделяет пики 940, 1084, 1185, 1439, 1527 и 1644 см⁻¹ как информативные полосы. По распределению предикторов PLS была достигнута чувствительность 73,7% и специфичность 97,4% (рисунок 3.3в), ROC AUC равнялась 0,923.

На основе спектральных различий в диапазонах 345, 394, 443, 713, 877, 943, 1048, 1152, 1217, 1562 и 1683 см^{-1} спектры ВСС и других новообразований кожи были дифференцированы с точностью 91% (94,7% чувствительность и 89,2% специфичность). Кривая ROC этой модели с ROC AUC 0,969 представлена на рисунке 3.3з.

Была проведена классификация новообразований на основе разделенных спектров комбинационного рассеяния и AF путем разделения всех спектров области от 300 до 1800 см^{-1} на два диапазона: от 300 до 1200 см^{-1} (в основном вклад AF) и от 1200 до 1800 см^{-1} (в основном вклад RS). Независимый анализ этих двух спектральных диапазонов представлен ниже.

Используя только диапазон AF для дифференциации опухолей кожи MLG и BN, диагностические различия были обнаружены в диапазонах 440, 529, 713, 877, 943, 980, 1048 и 1084 см^{-1} . Для этой модели была построена диаграмма размаха PLS-предикторов (рисунок 3.4а). При оптимальном пороговом значении коэффициента PLS-DA была получена 93-процентная точность дифференциации опухолей. ROC AUC построенной модели составляет 0,987.

Используя данные о спектрах тканей кожи с типичными пиками комбинационного рассеяния, можно заключить, что различия в полосах 1200, 1249, 1281, 1315, 1392, 1440, 1529 и 1644 см^{-1} вносят значительный вклад в классификацию спектров MLG и BN. Достигнута 100% дифференцирующая точность, и ROC AUC равен 1. Оценки VIP моделей PLS-DA, основанные на раздельном анализе AF и RS, представлены на рисунке 3.4.

Аналогичный анализ разделенных спектров был проведен для других 3 случаев: MM против классификации ВСС, MM против всех других новообразований кожи, ВСС против всех других новообразований кожи. В таблице 3.2 представлены результаты всех рассмотренных PLS-DA моделей.

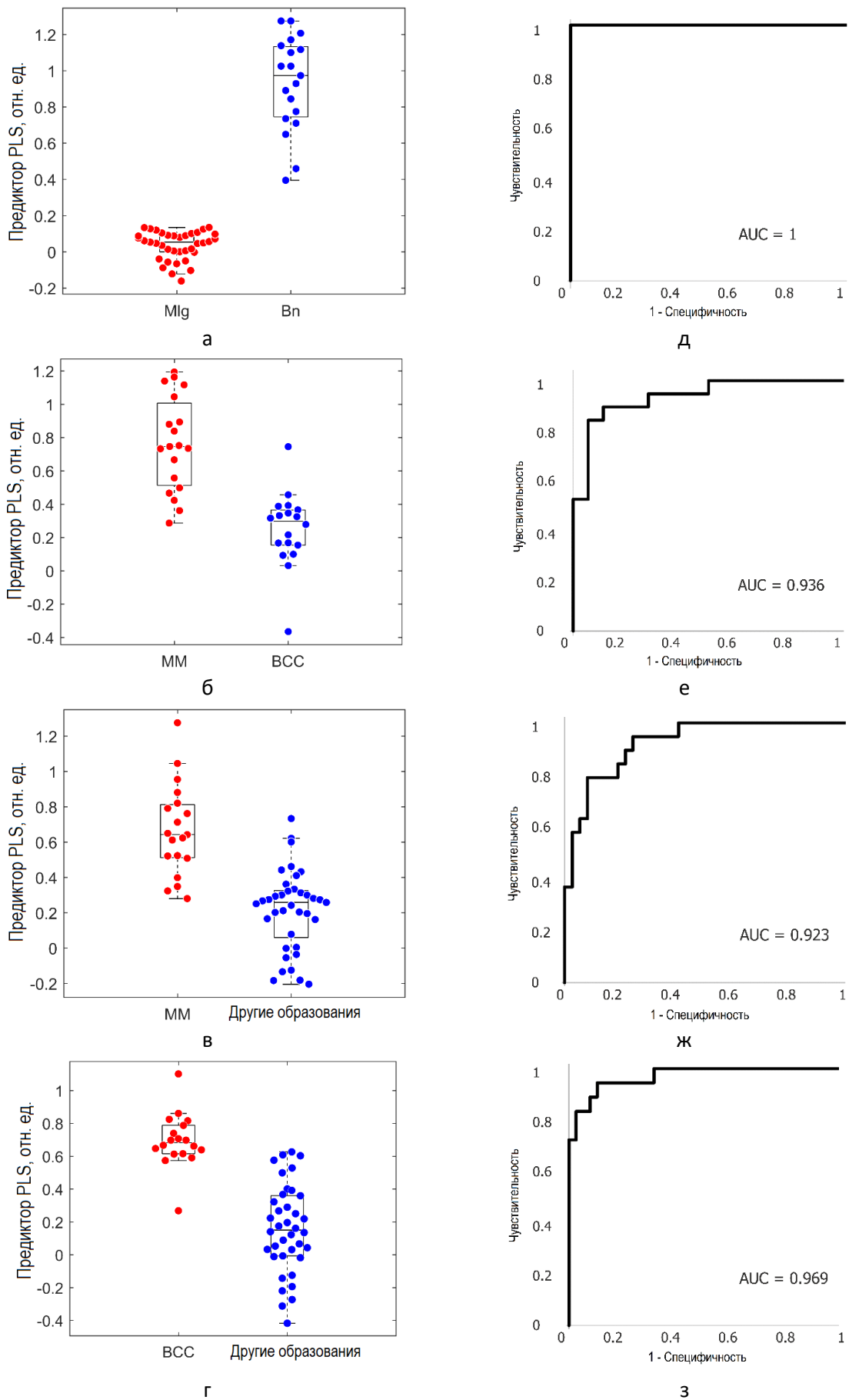
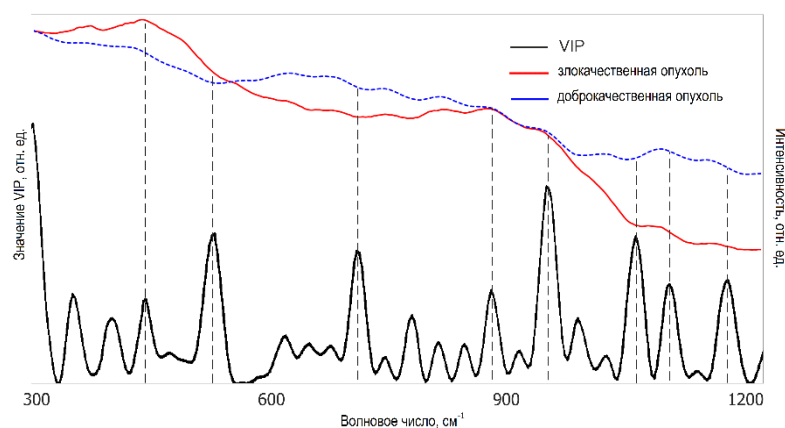
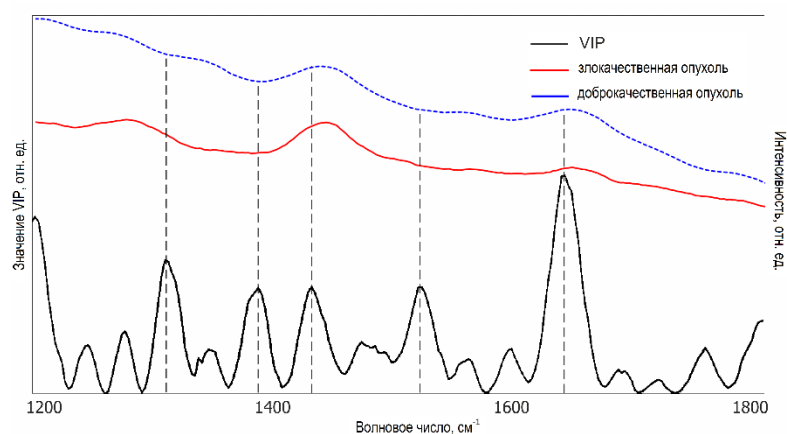


Рисунок 3.3 – PLS-DA и ROC анализ для дифференциации новообразований кожи человека



(а) для АФ части спектра в области 300-1200 см⁻¹



(б) для Рамановской части спектра в области 1200-1800 см⁻¹

Рисунок 3.4 – Оценка VIP для разделенных спектральных областей АФ и Рамана. а – спектры АФ в диапазоне от 300 до 1200 см⁻¹, б – для спектров комбинационного рассеяния в диапазоне от 1200 до 1800 см⁻¹

Точность диагностики новообразований кожи также оценивали при первичном осмотре онкологом. 1 из 19 ММ была предварительно определена как опухоль ВN, а еще одна ММ была определена как злокачественная опухоль без указания типа. Пять из 19 опухолей ВN были идентифицированы как ММ, а еще 7 опухолей ВN – как ВСС. Онколог обнаружил подозрение на ММ у 4 исследованных ВСС. Были рассчитаны точность, чувствительность и специфичность предварительной диагностики онкологом (таблица 3.4).

Таблица 3.4 - Результаты дифференциации новообразований кожи

	AF (300-1200 cm^{-1})	RS (1200-1800 cm^{-1})	AF +RS (300-1800 cm^{-1})	Онколог
MLG vs BN	93% (95%-89%)	100% (100%-100%)	100% (100%-100%)	63% (89.5%-37%)
MM vs BCC	83.8% (84.2%-83.3%)	78.4% (89.5%-66.7%)	89.2% (84.2%-94.4%)	85.3% (89.5%-81%)
MM vs другие новообразования	78.9% (68.4%-84.2%)	89.3% (79%-94.6%)	89.5% (73.7%-97.4%)	83.7% (89.5%-77.8%)
BCC vs другие новообразования	89.3% (89.5%-89.2%)	87.3% (88.9%-86.5%)	91.1% (94.7%-89.2%)	80.4% (77.8%-81.6%)

Успешное применение портативного QE-спектрометра подтверждена полученными результатами дифференциации новообразований кожи. Высокая точность разделения патологий MLG и BN объясняется патологическими процессами в злокачественных новообразованиях, которые приводят к специфическим изменениям структуры и состава различных органических соединений. При развитии злокачественного кожного заболевания увеличивается содержание продуктов обмена в патологических участках кожи, изменяется концентрация белков и липидов. Белки преимущественно способствуют появлению полос в спектральном диапазоне от 1240 до 1270, 1340, от 1440 до 1460 и 1665 cm^{-1} , спектральные особенности, возникающие из-за вклада липидов, преимущественно триолеина, наблюдаются в спектральном диапазоне 1271-1301 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1650- 1660 cm^{-1} [168]. Одним из существенных отличий злокачественных образований от доброкачественных является процесс метаболизма и разрушения коллагена. Клетки злокачественных опухолей образуют быстрорастущие низкодифференцированные структуры, развитие которых сопровождается повышенной активностью коллагеназы [164]. Коллагеназа разрушает молекулярные связи коллагеновых волокон, и изменения в спектрах комбинационного рассеяния кожной ткани могут наблюдаться в полосах 1248, 1454 и 1665 cm^{-1} , связанных с пиками коллагена [169].

Отметим, что отражение биохимических особенностей малигнизации тканей на рамановском сигнале также позволяет получить 100% точность дифференцирования без учета спектров AF. В то же время, как показал VIP-анализ, ключевым диагностическим признаком является разница в интенсивности в полосе 1644 cm^{-1} . Вклад в полосу 1640–1660

cm^{-1} вносят колебание $\text{C} = \text{O}$ в амид I структурных белков, $\text{C} = \text{C}$ -алкильное растяжение липидов и нуклеиновых кислот [164]. Интенсивность полосы амид I, согласно предыдущим исследованиям [33, 170], ниже для спектров раковых опухолей по сравнению со спектрами доброкачественных образований и здоровой кожи.

ВСС обладает гораздо большей подвижностью и инвазивностью опухолевых клеток из-за более высокого уровня актина по сравнению с ММ [171, 172]. Полосы, отвечающие за содержание актина, наблюдаются вблизи 1210, 1342, 1452 и 1613 cm^{-1} . В моделях «ММ против ВСС», «ММ против других опухолей» и «ВСС против других опухолей» анализ VIP идентифицировал области 1207-1217 и 1433-1444 cm^{-1} , представляющие различия в концентрации актина. В спектрах ММ наблюдается уменьшение интенсивности в области амида I с 1644 до 1660 cm^{-1} . Полоса от 1644 до 1660 cm^{-1} является ключевым диагностическим признаком всех моделей, поскольку отражает наиболее важные изменения в структуре белков, липидов и нуклеиновых кислот. Кроме того, значительный пик комбинационного рассеяния при 1645 cm^{-1} характеризуется вкладом воды [169]. Feng с соавторами [172] отметили, что вода является важным веществом для дифференцировки плоскоклеточного рака, но для других новообразований кожи (ВСС, ММ и других пигментных поражений) доля воды составляет менее 5% для всего диапазона от 800 до 1800 cm^{-1} . Следовательно, область с большим волновым числом должна использоваться для изучения вклада воды в дифференциацию кожных образований [105]. Другой информативный биохимический компонент – это меланин, который вносит вклад в основном в форму спектра АФ. Спектры ММ имеют выпуклую форму и характеризуются локальными минимумами и максимумами, тогда как спектры ВСС более плоские и гладкие. Таким образом, полосы, выделенные при анализе VIP-анализа в области от 283 до 1200 cm^{-1} , являются особенностями формы спектров АФ, которая зависит от вклада эндогенных флуорофоров, в основном меланина.

Анализ спектров АФ и комбинационного рассеяния позволил обнаружить, что сигнатуры АФ более информативны для диагностики ВСС, в то время как для диагностики ММ наиболее информативные диагностические признаки коррелируют с полосами комбинационного рассеяния. Во всех моделях наилучшая дифференциация опухолей возможна с общим спектральным диапазоном анализа от 283 до 1800 cm^{-1} . Этот факт подтверждает эффективность комбинированного анализа комбинационного рассеяния света и АФ. Анализ PLS-DA всего спектра позволил классифицировать различные группы опухолей, учитывая каждую особенность спектров, включая максимальную интенсивность и точную оценку положения полос.

Многие исследования [111, 173] показали, что использование только АФ недостаточно для эффективной классификации опухолей. В настоящем исследовании была выполнена дифференциация опухолей MLG и BN с достаточно высокой точностью 93% только на основе анализа АФ. Однако следует отметить, что в группе образований BN было всего 3 пигментных образца. В случае пигментных образований, советующих ММ и BN, точность классификации может быть значительно снижена [130].

Комбинированный анализ RS и АФ используется во многих исследованиях для повышения точности диагностики рака различных органов. Bergholt с соавторами [165] показали повышение точности до 91,5% для комбинированного анализа рака желудка и здоровой ткани, в то время как только анализ Рамановского рассеяния и АФ показал точность 89,3% и 86,3% соответственно.

На основании имеющихся данных было произведено сравнение точности первичного осмотра кожных образований онкологом с результатами оптической биопсии. Согласно данным, представленным в таблице 3.4, точность дифференциации ММ и ВСС сопоставима с точностью диагноза онколога, а точность дифференциации ММ составляет от 85% до 90%. Для сравнения, согласно статистическим данным, уровень точности диагностики ММ зависит от опыта медицинской практики: 80% точности наблюдается у опытных дерматологов, 62% у опытного врача и около 40% у врача, не специализирующегося в дерматологии [8].

В проведенном исследовании точность первичного осмотра онкологом представлена низкой специфичностью 37% при чувствительности 89,5%. Низкая специфичность вызвана осознанием неправильной классификации злокачественных опухолей, поскольку онкологи часто избегают пропуска потенциально опасных опухолей. Результаты гистологического анализа исследуемой когорты показали, что 12 из 19 пациентов были неправильно диагностированы с предварительным диагнозом злокачественная опухоль. Пациенты с неподтвержденным предварительным диагнозом меланомы могут испытывать сильный стресс и беспокойство, что влияет как на их психологическое, так и на физическое состояние. Поэтому правильный диагноз - залог успешного лечения опухоли. Применение предлагаемой портативной спектроскопической системы позволит врачу любой категории и квалификации успешно определить характер исследуемого кожного образования и тем самым установить наличие или отсутствие злокачественного новообразования.

Для разработки методов RS подходящих для диагностики рака различные научные группы используют высокочувствительное оборудование с высокой степенью охлаждения

детектора [39, 55, 145, 168, 170, 174]. Как видно из рассмотренных работ, в основном использовался диапазон охлаждения от -120°C до -60°C . В настоящем исследовании был получен результат дифференциации кожных новообразований, сопоставимый с результатами упомянутых исследований. При этом использовался портативный спектрометр с охлаждением только до -15°C . Эта особенность существенно отличает предлагаемое оборудование по стоимости и возможности использования в клинических исследованиях для диагностики рака кожи.

Использование предлагаемого портативного экономичного спектрометра идеально подходит для реализации идеи скрининга рака кожи. Компактность и удобство транспортировки делают такие системы наиболее привлекательными и удобными для массовых досмотровых съемок. Таким образом, использование портативного Рамановского спектрометра наряду с предложенным методом анализа спектральных данных является многообещающим подходом, который может стать незаменимым инструментом для медицинских специалистов при обследовании кожных образований и выявлении злокачественных новообразований.

В данном разделе было продемонстрировано, что предлагаемый метод, основанный на комбинированном применении RS и AF, может быть эффективным и быстрым подходом для классификации патологий кожи из-за преимуществ, связанных с функциями AF и Рамановского рассеяния, и возможности регистрации обоих оптических сигналов с помощью одного портативного устройства. Одновременный анализ изменений эндогенных хромофоров с помощью RS и AF – мощный инструмент для выявления злокачественных новообразований тканей.

Достигнутый уровень точности классификации новообразований кожи свидетельствует о высоком клиническом потенциале предлагаемого подхода. Этот результат показывает возможность неинвазивного медицинского применения портативного спектроскопического оборудования для исследования подозрительных участков кожи на наличие злокачественных новообразований. В то время как традиционные методы анализа включают сбор биологического материала и проводятся в течение нескольких дней, предлагаемый метод предлагает способ анализа опухолей кожи в реальном времени с помощью портативного устройства. В наших будущих исследованиях мы планируем увеличить количество тестируемых кожных патологий и провести исследование различных типов опухолей кожи с разными подтипами и стадиями, чтобы прояснить ограничения предлагаемого метода.

3.4 Анализ in vivo AF и RS характеристик кожи человека для проведения «оптической биопсии» в клинических условиях

Чтобы удовлетворить острую потребность в простых в использовании недорогих устройствах RS для скрининга рака кожи, была разработана портативная система RS с переносным Рамановским датчиком [31]. Такие компактные системы на основе RS также использовались, например, для анализа кожи человека при мониторинге диабета [175, 176]. В отличие от лабораторных систем [39, 108, 177] с высокой степенью охлаждения детектора (от -60 до -120 °С) предлагаемое устройство работает только при -15 °С, что значительно снижает габариты, вес и стоимость системы. При этом необходимое время для сбора спектров увеличивается с 0,1-1 с (для лабораторных систем) до 30–60 с. В предыдущем разделе была продемонстрирована применимость разработанной портативной системы *in vivo* в клинических исследованиях на когорте 56 пациентов (19 меланом, 18 базальноклеточных карцином (BCC) и 19 доброкачественных новообразований (BN)) и получили точность классификации от 89% до 100% для кожных новообразований (меланомы против других новообразований, BCC против других новообразований, меланомы против BCC и злокачественные новообразования против доброкачественных новообразований) [31]. Однако эти высокие значения диагностической точности, вероятно, могут снизиться с увеличением количества исследуемых образцов. Чтобы проверить данное предположение были проведены *in vivo* измерения более 600 кожных тканей, включая различные пигментные и непигментированные кожные заболевания. В этом разделе демонстрируются результаты и производительность предлагаемой спектроскопической системы, сочетающей RS и AF для классификации меланомы и других новообразований кожи на основе оценки биохимического состава тканей. Анализ полученных спектроскопических данных проводился для отдельной и совместной реализации RS и AF и различных диагностических задач.

Описание когорты пациентов, принявших участие в «оптической биопсии» новообразований кожи

Протоколы диагностики тканей кожи *in vivo* одобрены этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета (Самарская область, Самара, Россия, протокол № 132, 29 мая 2013 г., клинические исследования подпадают под Кодекс этики врача России, утвержденного на 4-й конференции Российской медицинской ассоциации и в рамках Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации).

Все пациенты были не моложе 18 лет. Перед *in vivo* исследованием у всех пациентов было получено информированное согласие. Исследование опухолей кожи *in vivo* проводилось в Самарском областном клиническом онкологическом диспансере. В исследование были включены пациенты, обследованные врачами общей практики в поликлиниках Поволжья и направленные в Самарский областной клинический онкологический диспансер с подозрением на рак кожи. Пациентам проводились спектральные измерения каждого (до 2) очагов поражения кожи, каждому со своим диагнозом. Поражения не рассматривались для включения, если они были менее 3 мм в поперечном направлении (меньше диаметра зондирующего луча), располагались на участке тела, который был недоступен для зонда комбинационного рассеяния, инфицирован или ранее подвергался биопсии, удалению, или травмирован.

С мая 2017 г. по декабрь 2019 г. были получены спектры 617 образцов кожных новообразований. В данное исследование было включено 615 пациентов. Каждого пациента осматривал специализированный онколог. На основании визуального осмотра и анализа дерматоскопических изображений врач-онколог поставил предварительный диагноз исследуемому новообразованию кожи. Затем предложенная спектроскопическая система была использована для регистрации спектров кожных тканей. Все новообразования, анализируемые в данном исследовании, оценивались врачами-терапевтами и специализированными онкологами как подозрительные на предмет наличия рака, поэтому у каждого из исследованных новообразований была взята эксцизионная биопсия. Диагноз для каждого протестированного новообразования был установлен с помощью гистопатологического анализа. Окончательный набор спектральных данных содержал 204 злокачественных опухоли (70 злокачественных меланом (MM), 122 базальноклеточных карцином (BCC), 12 плоскоклеточных карцином (SCC)) и 413 доброкачественных опухолей (26 дерматофибром (DF), 62 папиллом (PP), 40 гемангиом (HE), 113 образцов себорейного кератоза (SK), 170 невусов (NE) (все типы), 1 кожный рог и 1 доброкачественная опухоль эпидермального придатка). Размеры кожных новообразований варьировались от 0,3 до 5 см. Исследуемые новообразования располагались на разных участках тела обследованных пациентов. Подробное распределение новообразований кожи человека, включая информацию о локализации опухолей, представлено в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Сводка пациентов и новообразований, оцененных с помощью Рамановской спектроскопии

		Пациенты				Локализация			
		Количество	Средний возраст (min-max)	М	Ж	Голова и шея	Туловище	Верхние конечности	Нижние конечности
Злокачественные опухоли	Все злокачественные опухоли	204	65 (25-87)	78	126	86	74	26	18
	BCC	122	68 (26-87)	50	72	74	34	12	2
	SCC	12	70 (58-84)	5	7	7	4	1	-
	MM	70	58 (25-84)	23	47	5	36	13	16
Доброкачественные опухоли	Все доброкачественные опухоли	413	60(20-86)	100	313	106	209	44	54
	NE	170	44 (18-86)	32	138	36	101	21	12

	DF	26	48 (23-71)	5	21	8	10	5	3
	PP	62	59 (20-79)	18	44	13	30	4	15
	HE	40	52 (19-80)	13	27	8	14	5	13
	SK	113	62(21-84)	32	81	40	53	9	11
	Кожный рог	1	79	-	1	-	1	-	-
	доброкач ественная опухоль эпидерма льного придатка	1	80	-	1	1	-	-	-

Регистрация спектральной информации при проведении «оптической биопсии» новообразований кожи

Подробности об экспериментальной портативной Рамановской системе, которая позволяет одновременно регистрировать RS и AF сигналы в ближней инфракрасной области (NIR), можно найти в предыдущем разделе. Возбуждение регистрируемых спектров выполнялось лазерным модулем (LuxxMaster LML-785.0RB-04, PD-LD, Нью-Джерси, США) с центральной длиной волны 785 нм. Ручной Рамановский зонд (RPB785, InPhotonics, Массачусетс, США) может фокусировать возбуждающее излучение, а также собирать и фильтровать рассеянное излучение. Собранный сигнал был разложен на спектр с помощью портативного спектрометра (QE65Pro, Ocean optics, Флорида, США). Ноутбук (или компьютер) необходим для сохранения данных, полученных спектрометром, и выполнения последующего анализа данных. Регистрацию спектров проводили в области 780-1000 нм со спектральным разрешением 0,2 нм. Все измерения спектров *in vivo* проводились при времени накопления сигнала 60 секунд и охлаждении детектора до -15 °С. Мощность лазера на коже составляла 30 мВт при плотности мощности лазерного излучения на коже около 0,3 Вт/см². Рамановский зонд располагался непосредственно над образцом ткани на расстоянии от 7 до 8 мм. Средний диаметр облучаемого участка ткани составлял около 3,5 мм.

Из-за очень низкой эффективности используемого детектора в области 920-1000 нм анализ спектральных данных проводился в диапазоне от 803 до 914 нм, что соответствует Рамановскому сдвигу от 300 до 1800 см⁻¹. Каждый из полученных совместных спектров комбинационного рассеяния и AF представляет собой дискретный набор из 515 параметров (предикторов). Количество полученных параметров зависит от спектрального разрешения, и весь набор параметров может быть статистически проанализирован, чтобы найти спектральные полосы, несущие наиболее информативные данные для различения тканей. Перед статистическим анализом необработанные спектральные данные комбинационного рассеяния центрировались, сглаживались фильтром Савицкого-Голея и нормализовались с использованием стандартного отклонения стандартного метода нормальных переменных (SNV). Центрирование данных снижает рейтинг модели на единицу и применимо в случаях унифицированной модели. Метод SNV вычитает среднее значение из каждого спектра и делит каждое значение сигнала на стандартное отклонение всего спектра. Для выравнивания разброса экспериментальных данных используется метод SNV. Следует отметить, что применение предлагаемой портативной установки практически не позволяет выделить пики КР в области от 300 до 1200 см⁻¹ из-за низкого отношения сигнал/шум [31].

В этой спектральной области АФ меланина перекрывает слабый сигнал комбинационного рассеяния [164], и в основном можно анализировать особенности кожи АФ. В диапазоне от 1200 до 1800 см^{-1} наблюдается меньший вклад АФ, что позволяет выделить пики комбинационного рассеяния ткани в зарегистрированном сигнале. Фон АФ в диапазоне от 1200 до 1800 см^{-1} вычитался из необработанных зарегистрированных спектров в соответствии с алгоритмом, предложенным Zhao с соавторами [177].

Статистический анализ спектральных данных «оптической биопсии» с применением метода проекции на латентные структуры

Следуя результатам исследований рака кожи с помощью RS систем *in vivo* [108, 177] диагностическая эффективность предложенной системы RS была оценена в соответствии с различными задачами или дихотомическими группами на основе клинической значимости. Эти задачи включали:

1. Дискриминация злокачественных (MM, BCC, SCC) и доброкачественных (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка) новообразований;
2. Дискриминация MM и доброкачественных пигментных новообразований кожи (NE + SK);
3. Дискриминация MM и SK.

В первой задаче рассматривается способность Рамановской спектроскопии различать злокачественные и предраковые поражения, требующие лечения, по сравнению с доброкачественными состояниями. В двух других задачах тестировалось различение MM и доброкачественных пигментных поражений кожи, а также MM и SK, которые также можно спутать из-за сходства внешнего вида [108].

Описанные задачи были проанализированы для различных спектроскопических случаев:

1. Был проанализирован весь зарегистрированный набор спектральных данных (содержащий сигналы АФ и комбинационного рассеяния в диапазоне 300-1800 см^{-1}) (далее в тексте для краткости данная модель будет называться «Full»);
2. Была проанализирована только АФ часть (область от 300 до 1200 см^{-1}) набора спектральных данных (модель будет называться «AF»);

3. Анализировалась только Рамановская часть (область от 1200 до 1800 см⁻¹) набора спектральных данных (модель будет называться «Raman»);

4. Был проведен совместный анализ AF и Рамановских частей (результаты были объединены с реализацией логистической регрессии) (модель будет называться «Raman + AF»).

Обработка экспериментальных данных проводилась с помощью регрессионного анализа с использованием дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (PLS-DA) [161]. PLS-DA может построить регрессионную модель для определения спектров для классов новообразований на основе значительных спектральных различий. Стабильность полученных классификационных моделей PLS-DA проверялась 10-кратной перекрестной валидацией (кросс-валидацией). Количество скрытых переменных (или главных компонент – PC) для моделей PLS-DA было выбрано по критерию локального минимума среднеквадратичной ошибки (RMSE) выполненной 10-кратной перекрестной проверки. Несмотря на то, что увеличение количества ПК приводит к минимизации RMSE и повышению точности модели классификации, RMSE в кросс-валидации начинает различаться по сравнению с RMSE для полученной модели, и следует использовать только несколько первых PC, которые не вызывают изменения RMSE в процессе кросс-валидации. Кроме того, оценивалась значимость переменных в прогнозе (VIP) [178]. Для определения точности дифференциации проанализированных типов новообразований были рассчитаны предикторы PLS, чтобы представить числовое значение диагноза новообразования в построенной модели.

Многовариантный анализ проводился с использованием пакета MDAtools в программе R studio для реализации алгоритма SIMPLS для части PLS метода PLS-DA [158]. Для трех вышеуказанных диагностических задач были использованы все собранные спектроскопические данные *in vivo*. Оценка прогностической ценности положительного (PPV) (отношение истинно-положительных результатов к общему количеству истинно-положительных и ложноположительных результатов), прогнозируемой ценности отрицательного результата (NPV) (отношение истинно-отрицательных результатов к общему количеству истинно-отрицательных и отрицательных результатов), ложноотрицательный) и соотношение биопсий (количество отрицательных биопсий, проводимых для каждой истинно положительной биопсии, показывающей рак кожи - от ложноположительных к истинно положительным) были выполнены с уровнями чувствительности 90%, 95% и 99%. Результаты были представлены с использованием диаграмм размаха с разбросом предикторов PLS и кривых AUC рабочей характеристики

приемника (ROC) с 95% доверительным интервалом (CI). Диаграммы размаха и ROC кривые были построены с использованием пакета pROC в программе Rstudio [179]. Логистическая регрессия для совместного анализа AF и Raman частей была построена в программе SPSS21 Statistics (IBM). Значимость AUC и сравнения между разными AUC проверяли стандартным способом [180].

Результаты спектрального исследования новообразований кожи с применением «оптической биопсии»

На рисунке 3.5 показаны средние значения и дисперсия сигналов комбинационного рассеяния (а, б) и AF (в, г) исследуемых новообразований кожи. AF кожных тканей, стимулированная лазером с длиной волны 785 нм, представляет собой нелинейную убывающую функцию, тогда как сигнал комбинационного рассеяния представляет собой набор отдельных полос, объединяющих ряд узких поддиапазонов, объединенных в более широкие пики. Спектры нормированы с использованием SNV. Для всех протестированных образцов кожи основные полосы комбинационного рассеяния появляются в пределах 1270-1340, 1440-1460, 1540-1560 и 1640-1670 cm^{-1} и обусловлены присутствием основных компонентов кожи, таких как липиды, белки и т.д. [31] Однако из-за их сложного биохимического состава точное определение хромофоров довольно сложно, и для классификации тканей кожи простой анализ отдельных полос комбинационного рассеяния неэффективен [31]. Спектры AF визуально различимы для пигментированных и непигментированных тканей, но визуального анализа недостаточно для разделения доброкачественных и злокачественных новообразований. Поэтому зарегистрированные спектры были проанализированы с помощью многомерного PLS-DA, чтобы оценить кривизну формы AF и найти поддиапазоны комбинационного рассеяния, которые могут быть полезны для классификации тканей кожи.

PLS-DA для всех задач классификации использует от 1 до 4 основных компонентов (PC). Полученные PC для каждой построенной модели выделяют наиболее информативные спектральные полосы, которые могут быть полезны при классификации тканей. На рисунке 3.6 показаны VIP для всех построенных моделей PLS-DA. VIP представляет собой взвешенную сумму нагрузок и выделяет исключительно все спектральные характеристики для всех нагрузок, полученных в модели классификации. На рисунке 3.6 показано, что «Raman» VIP используют данные из узких диапазонов в областях 1270-1340, 1440-1460, 1540-1560 и 1640-1670 cm^{-1} , VIP «AF» используют данные, основанные на кривизне

широкой ниспадающей AF кривой, а «Full» VIP – это сочетание свойств Рамана и AF. В модели «Full» узкие полосы RS низкой интенсивности маскируются широкими пиками AF высокой интенсивности.

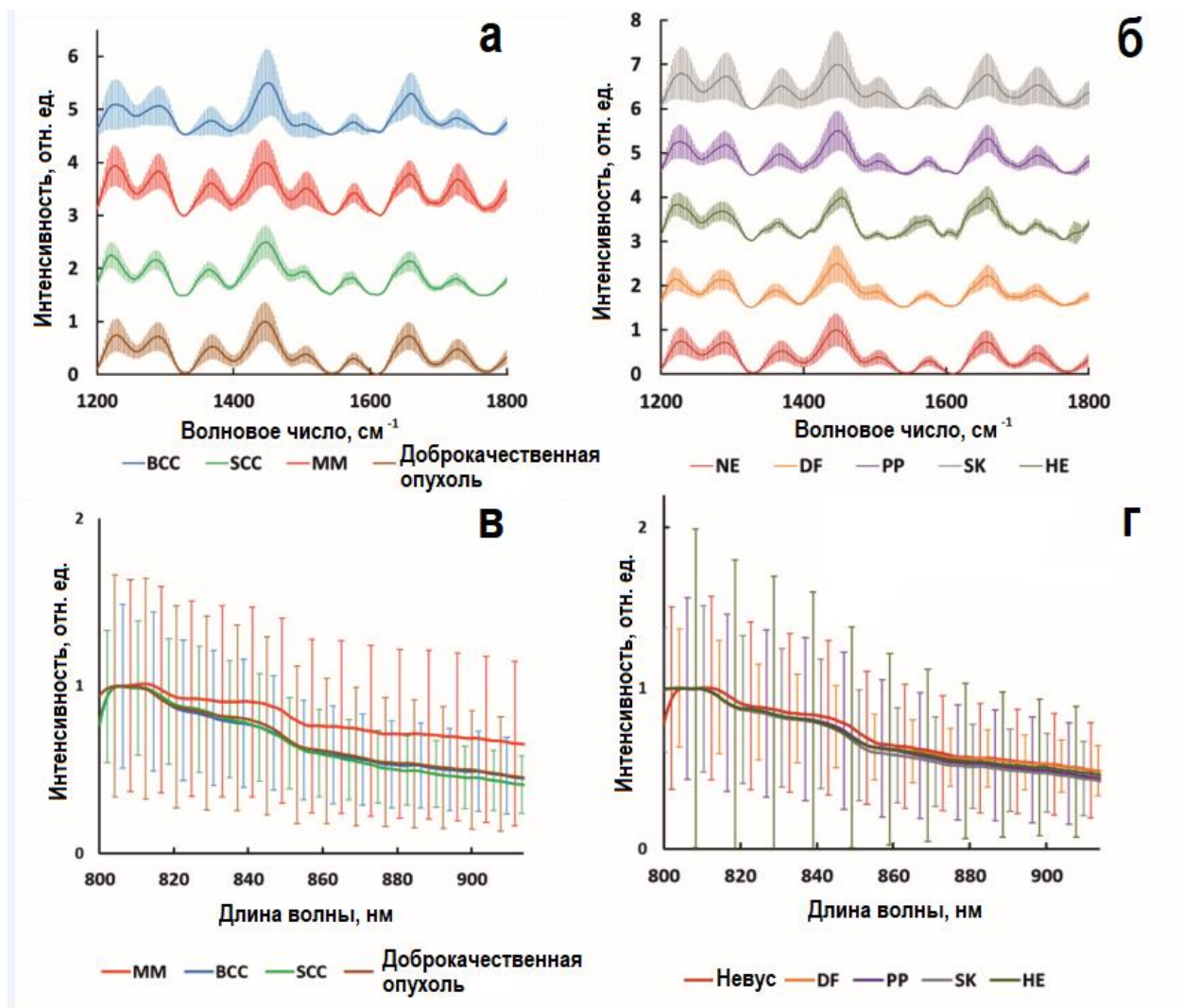
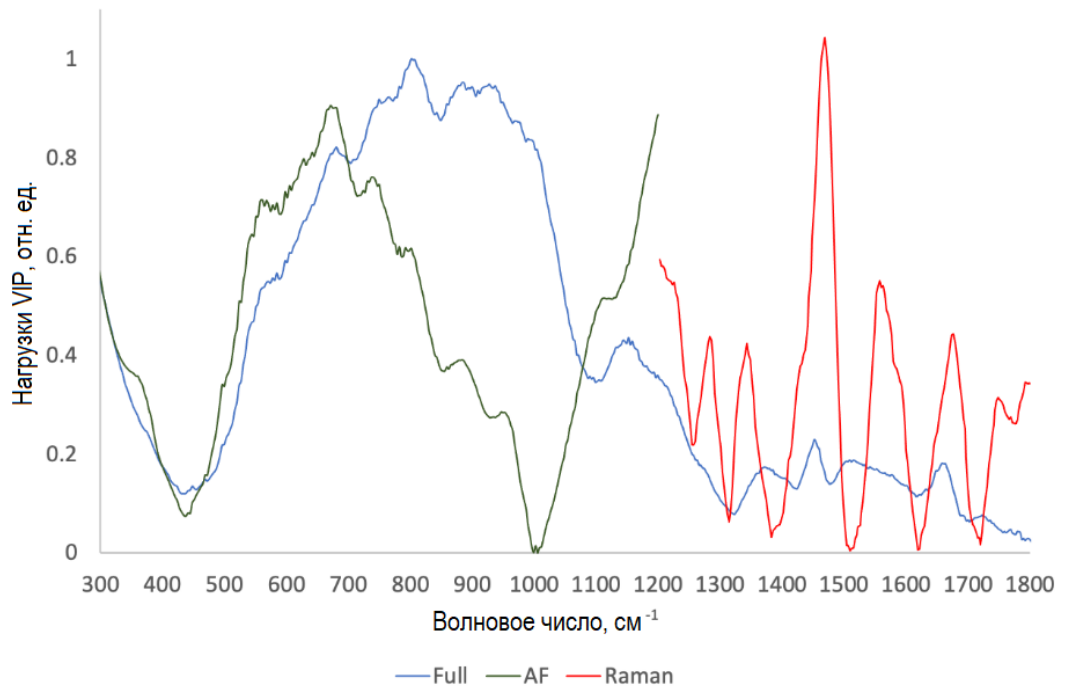
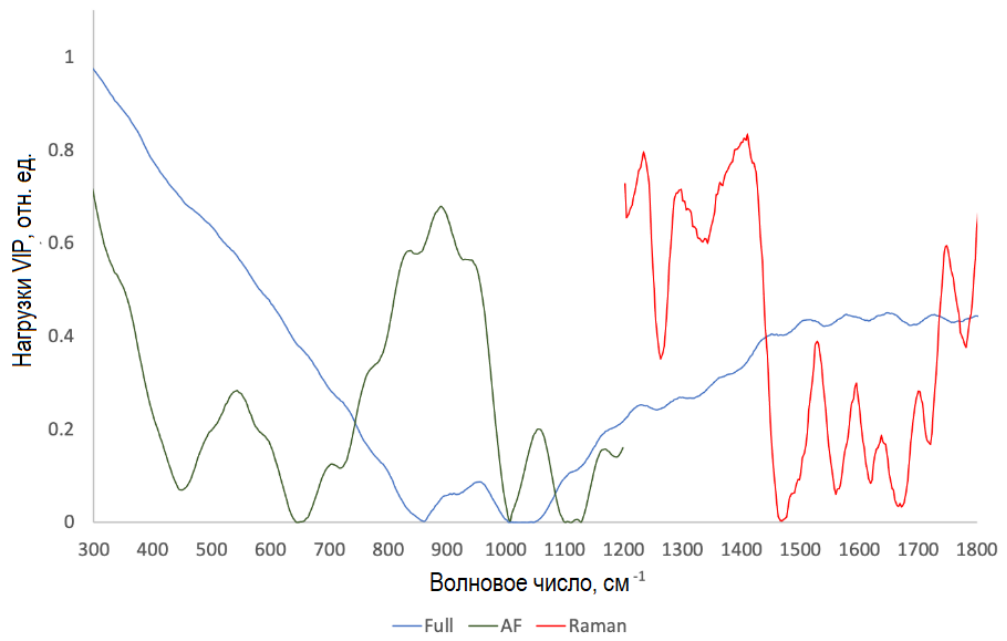


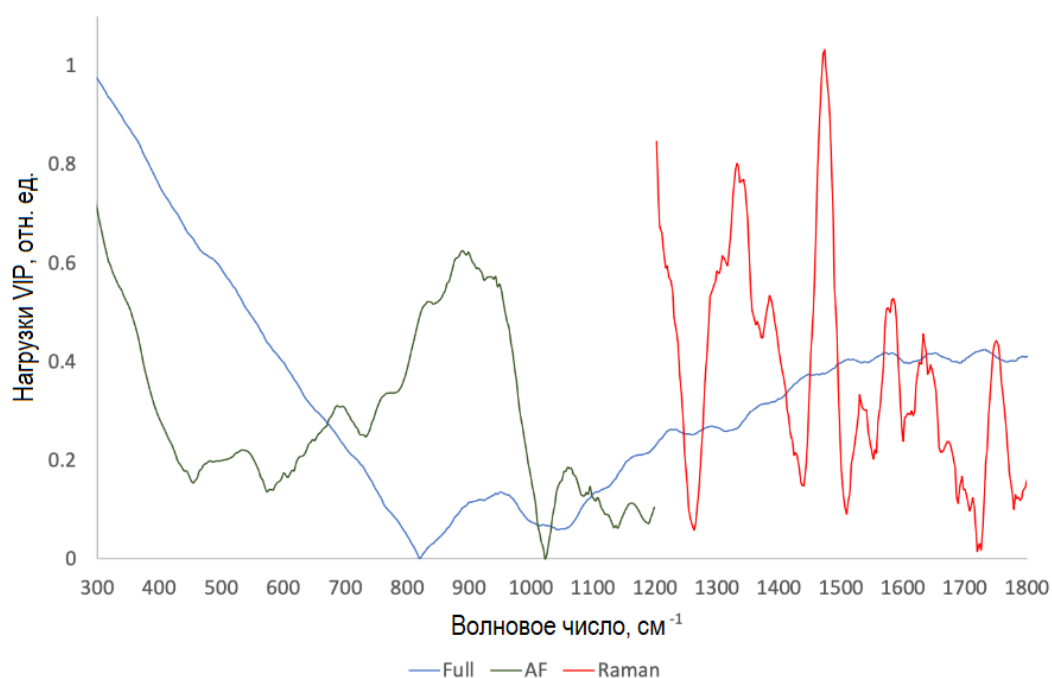
Рисунок 3.5 – Средние (сплошные линии) и стандартные отклонения обычных рамановских (а, б) и AF (в, г) спектров новообразований кожи. Все спектры нормализованы по минимуму и максимуму. Спектральные вариации анализировали методом PLS-DA для классификации новообразований кожи. MM – злокачественная меланома; BCC – базальноклеточная карцинома; SCC – плоскоклеточный рак; BN – доброкачественные опухоли; DF – дерматофиброма; PP – папиллома; HE – гемангиома; SK – себорейный кератоз



а



б



В

Рисунок 3.6 – VIP для построенных моделей PLS-DA: (а) злокачественная (MM, BCC, SCC; n = 204) по сравнению с доброкачественными новообразованиями (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка, n = 413), (б) MM (n = 70) против доброкачественных пигментных новообразований (NE + SK; n = 283), (в) MM (n = 70) против SK (n = 113); Анализ спектров комбинационного рассеяния в диапазоне 1200-1800 cm^{-1} (Raman), анализ спектров AF в диапазоне 300-1200 cm^{-1} (AF), анализ полных зарегистрированных спектров в диапазоне 300-1800 cm^{-1} (Full)

На рисунке 3.7 показаны результаты для классификации спектров злокачественных (MM, BCC, SCC; n = 204) и доброкачественных (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка, n = 413) спектров новообразований кожи на основе PLS-DA. На рисунке 3.7 показаны кривые ROC (а-г) для построенных моделей и диаграммы размаха (д-з) для четырех спектроскопических случаев. Модели PLS-DA, построенные для двух других задач классификации диагнозов, представлены на рисунках 3.8 и 3.9, где показаны кривые ROC и диаграммы размаха для случаев MM (n = 70) против NE + SK (n = 283) и MM (n = 70) против SK (n = 113).

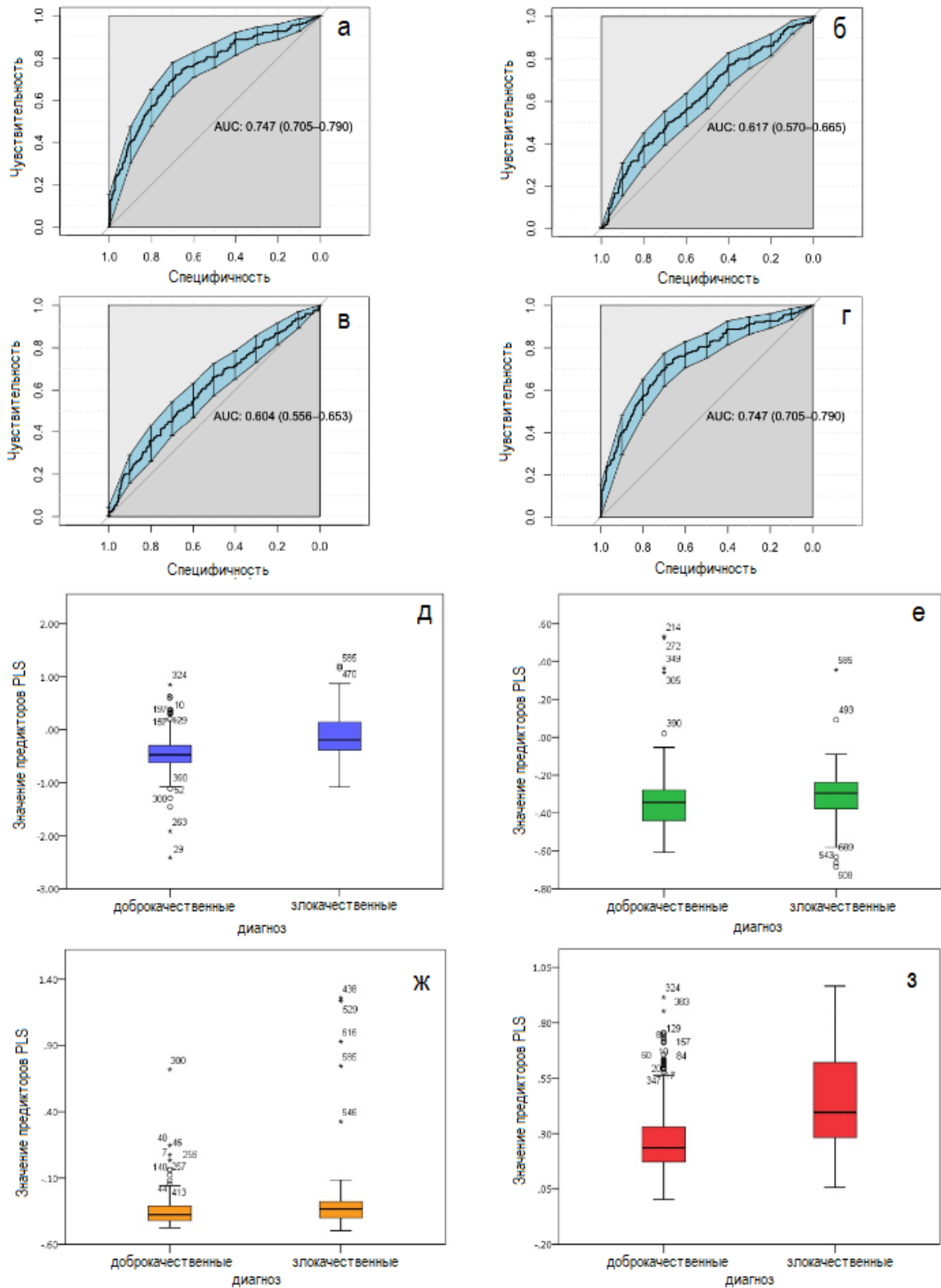
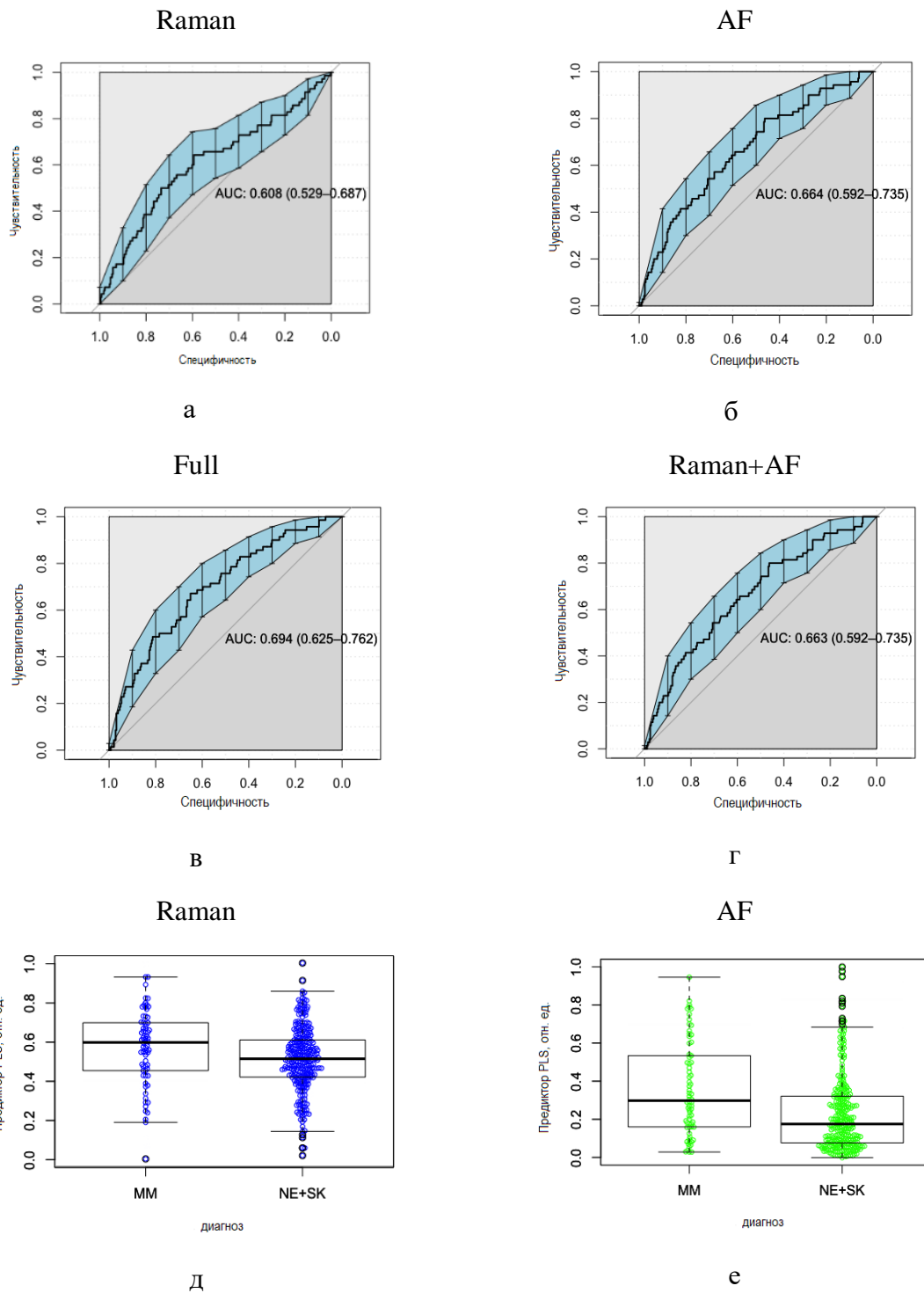


Рисунок 3.7 – Классификация злокачественных и доброкачественных новообразований на основе анализа PLS-DA. Апостериорная вероятность отличить рак кожи (MM, BCC, SCC; n = 204) от доброкачественных новообразований кожи (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка, n = 413); (а-г) кривые ROC и 95% доверительный интервал получены из соответствующих

апостериорных вероятностей, и все AUC значимы ($P < 0,001$); (д-з) диаграммы размаха для полученных предикторов PLS, кружки (o) – значения, превышающие в 1,5 раза межквартильный диапазон, звездочки (*) – значения, превышающие 3-кратный межквартильный диапазон.



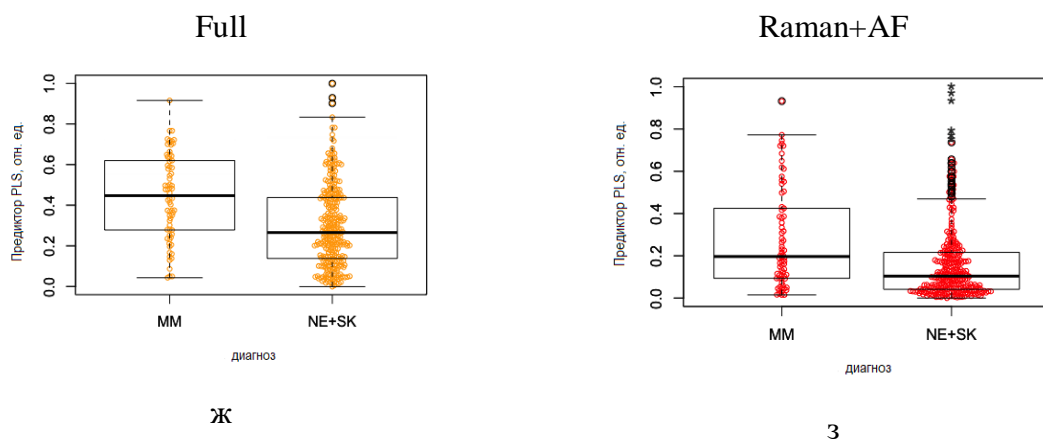


Рисунок 3.8 – Классификация ММ (n = 70) и доброкачественных пигментных поражений (NE + SK; n = 283) на основе анализа PLS-DA; (а-г) кривые ROC и 95% доверительный интервал получены из соответствующих апостериорных вероятностей, и все AUC значимы (P <0,001); (д-з) прямоугольные диаграммы для достигнутых предикторов PLS, кружки (o) – значения, превышающие в 1,5 раза межквартильный размах, звездочки (*) – значения, превышающие в 3 раза межквартильный размах

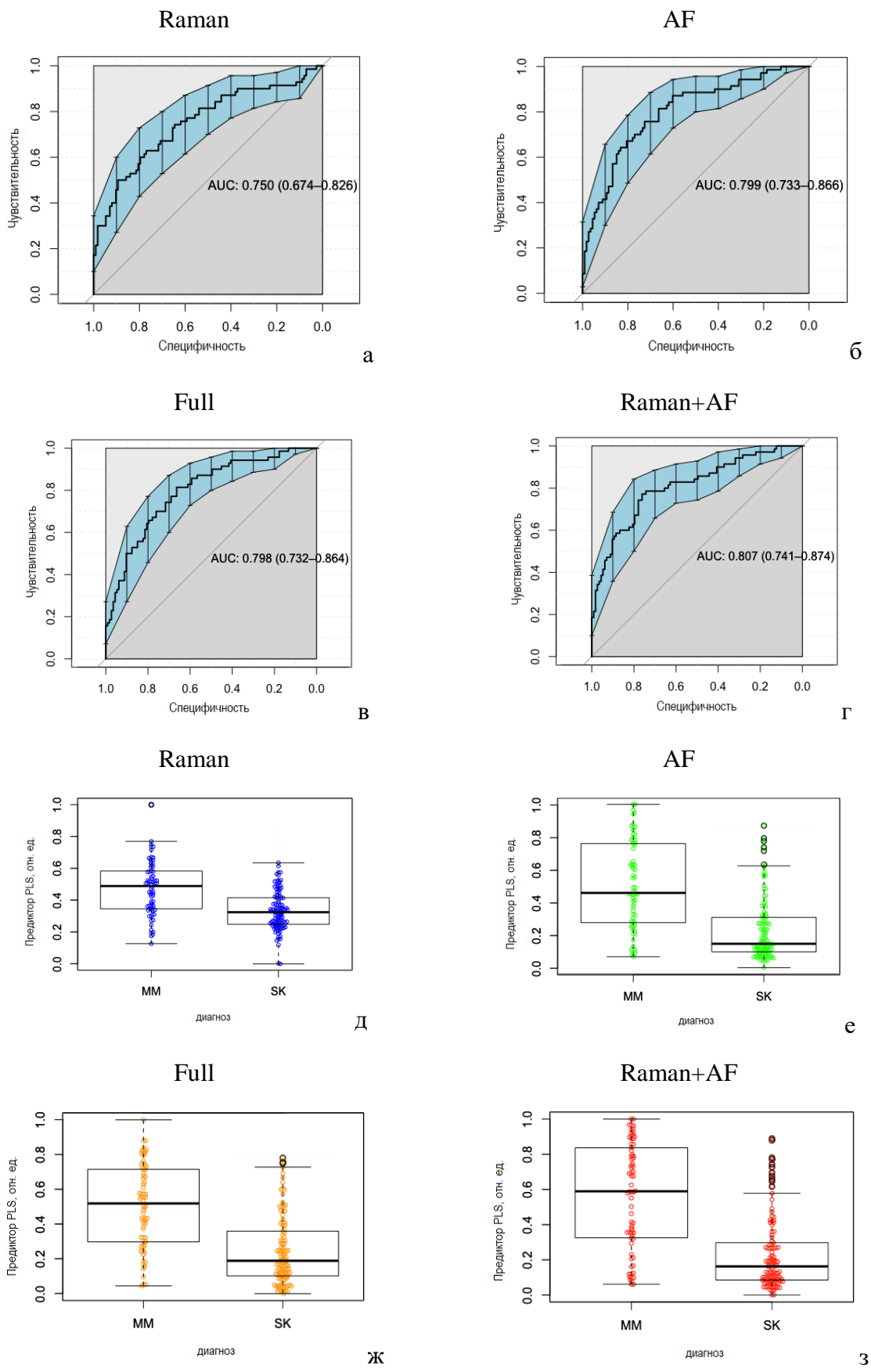


Рисунок 3.9 – Классификация MM (n = 70) и SK (n = 113) на основе анализа PLS-DA; (а-г) кривые ROC и 95% доверительный интервал получены из соответствующих апостериорных вероятностей, и все AUC значимы (P < 0,001); (д-з) прямоугольные

диаграммы для полученных предикторов PLS, кружки (o) – значения, превышающие в 1,5 раза межквартильный диапазон.

Лучшие модели классификации новообразований кожи демонстрируют более высокие значения ROC AUC, и целесообразно сравнить ROC AUC построенных моделей классификации. В случае злокачественных (MM, BCC, SCC; n = 204) по сравнению с доброкачественными (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка; n = 413) классификация новообразований, самая высокая ROC AUC составляет 0,75 (0,71-0,79, 95% CI) и получено для анализа спектров комбинационного рассеяния. Комбинация функций комбинационного рассеяния и AF, основанная на логистической регрессии, показывает одинаковую ROC AUC, тогда как полный спектральный анализ дает только 0,60 (0,56-0,65, 95% CI) ROC AUC. Только анализ «AF» показывает 0,62 (0,57-0,67, 95% CI) ROC AUC. Наилучшее разделение MM (n = 70) и NE + SK (n = 283) возможно с анализом спектров «AF» и «Full», демонстрируя 0,66 (0,59-0,74, 95% CI) и 0,69 (0,63-0,76, 95% CI) ROC AUC соответственно. Анализ комбинационного рассеяния показывает только 0,61 (0,53-0,69, 95% CI) ROC AUC, анализ комбинационного рассеяния + AF показывает 0,66 (0,59-0,74, 95% CI) ROC AUC. В случае классификации MM (n = 70) против SK (n = 113), наивысшая ROC AUC 0,81 (0,74-0,87, 95% CI) была получена для совместного анализа «Raman + AF»; отдельно анализы «Raman» и «AF» показывают значения ROC AUC 0,75 (0,67-0,83, 95% CI) и 0,80 (0,73-0,87, 95% CI) соответственно. «Full» анализ показывает 0,80 (0,73-0,86, 95% CI) ROC AUC.

Результаты классификации кожных тканей для трех диагностических задач (злокачественные против доброкачественных; MM против NE + SK и MM против SK) представлены в таблице 3.6 для отдельного и совместного анализа Рамановского рассеяния и AF кожных новообразований и для анализа «Full» спектров.

Таблица 3.6 – Классификация кожных тканей для трех диагностических задач (злокачественные (MM, BCC, SCC) против доброкачественных (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка); MM против NE + SK и MM против SK) и четыре спектроскопических задачи (анализ спектров комбинационного рассеяния в диапазоне 1200-1800 см⁻¹ («Raman»), анализ спектров AF в диапазоне 300-1200 см⁻¹ («AF»), анализ полных зарегистрированных спектров в диапазоне 300-1800 см⁻¹. («Full») и совместный анализ RS и AF сигналов («Raman + AF»))

Задача классификации	ROC AUC (95% CI)			
	Raman (1200-1800cm ⁻¹)	AF (300-1200cm ⁻¹)	Full spectra (300-1800cm ⁻¹)	Raman + AF (logistic regression)
Злокачественные (n=204) vs доброкачественные (n=413)	0.75 (0.71-0.79)	0.62 (0.57-0.67)	0.60 (0.56-0.65)	0.75 (0.71-0.79)
MM (n=70) vs NE+SK (n=283)	0.61 (0.53-0.69)	0.66 (0.59-0.74)	0.69 (0.63-0.76)	0.66 (0.59-0.74)
MM (n=70) vs SK (n=113)	0.75 (0.67-0.83)	0.80 (0.73-0.87)	0.80 (0.73-0.86)	0.81 (0.74-0.87)

Классификатор «Raman + AF» демонстрирует лучшую точность для задачи MM vs SK и для разделения злокачественных и доброкачественных новообразований. Однако для полученных значений ROC AUC для классификаторов Raman + AF и классификатора Raman нет статистически значимой разницы (для всех указанных диагностических задач $p > 0,1$). Для задачи MM vs NE + SK лучшую производительность демонстрирует классификатор спектров «Full», однако его отличие от классификатора «Raman + AF» статистически не значимо ($p > 0,3$), а также от «Raman» классификатора ($p > 0,07$). Поэтому дальнейшее обсуждение результатов «оптической биопсии» новообразований кожи человека в данной главе будет сосредоточено на описании только классификатора «Raman + AF».

Для классификации злокачественных и доброкачественных новообразований классификатор «Raman + AF» с чувствительностью 90% демонстрирует специфичность более 32%, с положительной прогностической ценностью (positive predictive value - PPV) 40% и отрицательной прогностической ценностью (negative predictive value - NPV) 85%. Расчетное значение «коэффициента биопсии» (biopsy ratio - BR) составляет 1,53:1. В таблице 3.7 показаны соответствующие параметры (специфичность, PPV, NPV и коэффициент биопсий) для чувствительности 90%, 95% и 99% для трех задач классификации диагнозов в случае классификатора «Raman + AF». Те же характеристики

для классификаторов «AF», «Full» и «Raman» представлены в таблицах 3.8, 3.9 и 3.10 соответственно.

Таблица 3.7 Сводка диагностических параметров, полученных для ROC кривых в соответствии с различными уровнями чувствительности в случае анализа компонентов Ramap + AF (логистическая регрессия) (PPV, отношение истинно-положительных результатов к общему количеству истинно-положительных и ложноположительных результатов; NPV, отношение от истинно-отрицательных к общему количеству истинно-отрицательных и ложноотрицательных; и «коэффициент биопсии», количество отрицательных биопсий, проводимых для каждой истинно-положительной биопсии, показывающей рак кожи)

Задача классификации	Чувствительность (95% CI)	Специфичность (95% CI)	PPV	NPV	Коэффициент биопсий
Злокачественные (n=204) vs Доброкачественные (n=413)	0.99 (0.97-1.00)	0.03 (0.01-0.08)	0.34	0.86	1.98:1
	0.95 (0.91-0.98)	0.14 (0.06-0.30)	0.35	0.85	1.84:1
	0.90 (0.85-0.94)	0.32 (0.15-0.45)	0.40	0.85	1.53:1
MM (n=70) vs NE+SK (n=283)	0.99 (0.91-1.00)	0.06 (0.04-0.11)	0.21	0.96	3.84:1
	0.95 (0.89-1.00)	0.10 (0.04-0.29)	0.21	0.89	3.82:1
	0.90 (0.79-0.96)	0.26 (0.10-0.41)	0.23	0.89	3.32:1
MM (n=70) vs SK (n=113)	0.99 (0.93-1.00)	0.13 (0.07-0.29)	0.41	0.96	1.41:1
	0.95 (0.87-1.00)	0.27 (0.210-0.45)	0.45	0.90	1.23:1
	0.90 (0.80-0.97)	0.40 (0.25-0.66)	0.48	0.87	1.08:1

Таблица 3.8 – Сводка диагностических параметров, полученных для ROC кривых в соответствии с различными уровнями чувствительности в случае анализа компонентов АФ (300 – 1200 см⁻¹) (PPV, отношение истинно-положительных результатов к общему количеству истинно-положительных и ложноположительных результатов; NPV, отношение от истинно-отрицательных к общему количеству истинно-отрицательных и ложноотрицательных; и «коэффициент биопсии», количество отрицательных биопсий, проводимых для каждой истинно-положительной биопсии, показывающей рак кожи)

Задача классификации	Чувствительность (95% CI)	Специфичность (95% CI)	PPV	NPV	Соотношение биопсий
Злокачественные (n=204) vs доброкачественные (n=413)	0.99 (0.99-1.00)	0.00 (0.00-0.06)	0.33	0.99	2.04:1
	0.95 (0.91-0.97)	0.11 (0.01-0.16)	0.35	0.82	1.89:1
	0.90 (0.84-0.95)	0.16 (0.11-0.23)	0.35	0.76	1.89:1
ММ (n=70) vs NE+СК (n=283)	0.99 (0.91-1.00)	0.06 (0.04-0.10)	0.20	0.99	3.84:1
	0.95 (0.89-0.99)	0.10 (0.04-0.29)	0.21	0.89	3.82:1
	0.90 (0.79-0.96)	0.26 (0.10-0.42)	0.23	0.88	3.33:1
ММ (n=70) vs СК (n=113)	0.99 (0.94-1.00)	0.14 (0.07-0.27)	0.42	0.96	1.40:1
	0.95 (0.89-1.00)	0.24 (0.13-0.55)	0.44	0.89	1.29:1
	0.90 (0.81-0.96)	0.42 (0.21-0.69)	0.49	0.87	1.03:1

Таблица 3.9 – Сводка диагностических параметров, полученных для ROC кривых в соответствии с различными уровнями чувствительности в случае анализа компонентов Raman (1200-1800 см⁻¹) (PPV, отношение истинно-положительных результатов к общему количеству истинно-положительных и ложноположительных результатов; NPV, отношение от истинно-отрицательных к общему количеству истинно-отрицательных и ложноотрицательных; и «коэффициент биопсии», количество отрицательных биопсий, проводимых для каждой истинно-положительной биопсии, показывающей рак кожи)

Задача классификации	Чувствительность (95% CI)	Специфичность (95% CI)	PPV	NPV	Коэффициент биопсий
Злокачественные (n=204) vs доброкачественные (n=413)	0.99 (0.97-1.00)	0.03 (0.01-0.08)	0.34	0.86	1.98:1
	0.95 (0.91-0.98)	0.14 (0.05-0.29)	0.35	0.85	1.84:1
	0.90 (0.85-0.94)	0.32 (0.15-0.45)	0.39	0.84	1.54:1
MM (n=70) vs NE+SK (n=283)	0.99 (0.99-1.00)	0.01 (0.01-0.07)	0.20	0.99	4.08:1
	0.95 (0.89-1.00)	0.06 (0.01-0.13)	0.20	0.83	4.00:1
	0.90 (0.80-0.97)	0.12 (0.05-0.24)	0.20	0.83	3.95:1
MM (n=70) vs SK (n=113)	0.99 (0.93-1.00)	0.04 (0.01-0.12)	0.39	0.85	1.57:1
	0.95 (0.86-1.00)	0.09 (0.03-0.41)	0.39	0.74	1.54:1
	0.90 (0.80-0.96)	0.35 (0.05-0.56)	0.46	0.73	1.16:1

Таблица 3.10 – Сводка диагностических параметров, полученных для ROC кривых в соответствии с различными уровнями чувствительности в случае анализа всех компонентов Full (300-1800 см⁻¹) (PPV, отношение истинно-положительных результатов к общему количеству истинно-положительных и ложноположительных результатов; NPV, отношение от истинно-отрицательных к общему количеству истинно-отрицательных и ложноотрицательных; и «коэффициент биопсии», количество отрицательных биопсий, проводимых для каждой истинно-положительной биопсии, показывающей рак кожи)

Задача классификации	Чувствительность (95% CI)	Специфичность (95% CI)	PPV	NPV	Коэффициент биопсий
Злокачественные (n=204) vs доброкачественные (n=413)	0.99 (0.97-1.00)	0.01 (0.00-0.04)	0.33	0.81	2.04:1
	0.95 (0.91-0.97)	0.08 (0.02-0.15)	0.34	0.75	1.97:1
	0.90 (0.85-0.95)	0.15 (0.09-0.23)	0.34	0.75	1.91:1
ММ (n=70) vs NE+СК (n=283)	0.99 (0.94-1.00)	0.08 (0.05-0.17)	0.21	0.97	3.75:1
	0.95 (0.89-0.99)	0.17 (0.07-0.33)	0.22	0.93	3.55:1
	0.90 (0.80-0.96)	0.30 (0.16-0.46)	0.24	0.92	3.16:1
ММ (n=70) vs СК (n=113)	0.99 (0.93-1.00)	0.15 (0.07-0.27)	0.42	0.96	1.39:1
	0.95 (0.89-1.00)	0.25 (0.12-0.53)	0.44	0.89	1.28:1
	0.90 (0.80-0.97)	0.49 (0.22 0.67)	0.52	0.89	0.92:1

Когда рассматриваются только пигментные новообразования (ММ (n = 70) против NE + SK (n = 283)), классификаторы «AF» и «Raman + AF» показывают 0,66 ROC AUC, в то время как классификация «Full» спектров приводит к AUC для соответствующей кривой ROC 0,69. Это увеличение ROC AUC является статистически незначительным ($p > 0,5$). Классификатор «Raman + AF» при чувствительности 90% демонстрирует специфичность более 26%, с PPV 23% и NPV 89%. Расчетное значение коэффициента биопсии составляет 3,32: 1. Для задачи классификации ММ (n = 70) по сравнению с SK (n = 113) AUC для соответствующей кривой ROC составляет 0,81, а классификатор «Raman + AF» при чувствительности 90% демонстрирует специфичность более 40% с PPV. 48% и NPV 87%. Расчетное значение коэффициента биопсии составляет 1,08: 1.

Для всех трех диагностических задач (злокачественные против доброкачественных; ММ против NE + SK; ММ против SK) и четырех методов классификации спектров («AF», «Raman», «Full», «Raman + AF») диапазон ROC AUCs от 0,60 до 0,81. PPV и NPV варьируются от 20% до 52% и от 73% до 99%. Значение коэффициента биопсии варьируется в диапазоне от 0,92: 1 до 4,08: 1.

Сравнение точности построенных моделей классификации новообразований кожи при использовании портативной Рамановской системы с точностями, полученными при использовании других подходов

Анализ полученных результатов показывает, что совместное исследование оптических свойств тканей кожи с помощью Рамановского рассеяния и AF дает наилучшие результаты при классификации новообразований кожи, что связано с одновременным анализом Рамановских и AF характеристик тканей кожи. Наименьшая эффективность была достигнута при классификации ММ и пигментных новообразований (NE + SK). Такой результат обусловлен высокой интенсивностью AF в регистрируемых спектрах. В исследованиях тканей Рамановского рассеяния в ближнем инфракрасном диапазоне AF часто рассматривается как паразитный сигнал, а высокие частоты AF маскируют пики комбинационного рассеяния низкой интенсивности [31, 164, 181]. Основным NIR флуорофором в тканях кожи человека является меланин [181], и поскольку меланомы и невусы часто содержат много меланина, классификация меланом и пигментных поражений с помощью недорогих Рамановских устройств затруднена из-за высокого фона AF. Соответственно, соотношение биопсий для классификации ММ и пигментных новообразований методом комбинационного рассеяния составляет 3,95: 1 при

чувствительности 90%. Соотношение биопсий для классификации ММ и пигментных поражений для АФ составляет 3,33: 1 при чувствительности 90%, что также доказывает, что оценка АФ имеет довольно низкий потенциал для диагностики новообразований кожи [130, 181]. Наилучшие коэффициенты биопсии для дифференциации злокачественных новообразований от доброкачественных и дифференциации ММ от СК показали значения равные 1,53: 1 и 0,92: 1 соответственно. Проведенное исследование показало, что достигнутые значения коэффициентов биопсий довольно низки по сравнению с коэффициентами биопсий, получаемыми при диагностике меланом путем визуального осмотра опытных пользователей дерматоскопии (коэффициент биопсии около 8: 1) и других медицинских работников (более 30: 1) [182-185]. Мультиспектральная визуализация рака кожи с помощью устройства MelaFind продемонстрировала коэффициент биопсий 10,8: 1 при оценке пигментных новообразований в большом мультицентровом проспективном исследовании [186].

Полученные результаты анализа новообразований кожи с помощью портативной Рамановской установки целесообразно сравнить с данными анализа кожных новообразований, выполняемыми на других Рамановских установках с использованием дорогостоящих детекторов с глубоким охлаждением. Самое крупное исследование новообразований кожи с помощью Рамановского анализа было проведено Lui с соавторами [108]. Здесь следует отметить, что, как и в настоящем исследовании, так и в исследовании Lui с соавторами, были оценены одни и те же три задачи бинарной классификации новообразований кожи. ROC AUC, полученные Lui с соавторами для разных задач классификации и разных способов анализа спектров варьировались в диапазоне от 0,82 (0,73-0,92; 95% CI) до 0,90 (0,80-0,99; 95% CI), в то время как в настоящем исследовании AUC ROC составляла от 0,60 (0,56-0,65; 95% CI) до 0,81 (0,74-0,87; 95% CI). Значение коэффициента биопсий варьировалось в исследовании Lui с соавторами от 0,47: 1 до 5,65: 1 (при уровнях чувствительности 90%, 95% и 99%). В проведенном исследовании значения коэффициентов биопсий варьировались в диапазоне от 0,92: 1 до 4,08: 1 для тех же уровней чувствительности. Таким образом, при более низких средних значениях ROC AUC для предлагаемого портативного Рамановского устройства по сравнению с установкой RS с глубоко охлаждаемым детектором были продемонстрированы сопоставимые значения коэффициентов биопсий новообразований кожи человека.

Для классификации злокачественных ($n = 232$) и доброкачественных новообразований кожи ($n = 286$) самый высокий ROC AUC, полученный Lui с соавторами составил 0,90 (0,80–0,99; 95% CI), специфичность составляла 0,66 (0,61-0,71; 95% CI), PPV составляла 68%,

NPV составляла 89%, а значение коэффициента биопсий составляло 0,47: 1 при чувствительности 90%. Продемонстрированные результаты показали лучшую эффективность для различения злокачественных ($n = 204$) и доброкачественных новообразований ($n = 413$) с классификатором «Raman + AF», который обеспечил ROC AUC 0,75 (0,71-0,79; 95% CI), со специфичностью 0,32 (0,15-0,45; 95% ДИ), PPV 40%, NPV 85% и соотношением биопсии 1,53: 1 при чувствительности 90%. Однако, поскольку классификаторы «Raman + AF» и «Raman» не показывают существенных различий, похоже, что AF не влияет на эффективность распознавания злокачественных и доброкачественных новообразований. Наблюдаемое снижение специфичности, PPV и коэффициента биопсии в основном вызвано более низким уровнем SNR для недорогой портативной установки по сравнению с устройством с глубоким охлаждением детектора.

Классификация ММ ($n = 44$) по сравнению с пигментными новообразованиями кожи ($n = 286$; NE + SK) была проведена Lu1 с соавторами с ROC AUC 0,82 (0,73-0,92; 95% CI), со специфичностью 0,63 (0,57-0,69; 95% CI), PPV 27%, NPV 98% и значением коэффициента биопсии 2,67: 1 при чувствительности 90%. При использовании портативной Рамановской установки продемонстрирована классификация ММ ($n = 70$) по сравнению с пигментными новообразованиями кожи ($n = 283$; NE + SK) с ROC AUC 0,66 (0,59-0,74; 95% CI), специфичностью 0,26 (0,10-0,41; 95% CI), PPV 23%, NPV 89% и значением коэффициента биопсии 3,32: 1 при чувствительности 90%. Классификация ММ ($n = 44$) и SK ($n = 114$) была проведена Lu1 с соавторами с ROC AUC 0,90 (0,80–0,99; 95% CI), специфичностью 0,66 (0,57-0,75; 95% CI), PPV 51%, NPV 94% и значением коэффициента биопсии 0,98: 1 при чувствительности 90%. Использование портативной Рамановской установки продемонстрировало классификацию ММ ($n = 70$) по сравнению с SK ($n = 113$) с ROC AUC 0,81 (0,74-0,87; 95% CI) со специфичностью 0,40 (0,25-0,66; 95% CI), PPV 48%, NPV 87% и значением коэффициента биопсий 1,08: 1 при чувствительности 90%. Что касается классификации злокачественных новообразований и доброкачественных новообразований, предлагаемое устройство обеспечивает более низкие значения ROC AUC в классификации ММ и пигментных новообразований по сравнению с установкой с глубоко охлаждаемым детектором, однако портативное Рамановское устройство демонстрирует сопоставимые значения требуемых значений коэффициентов биопсий, PPV и NPV. В основном этот факт можно объяснить разным уровнем отношения сигнал/шум для портативных устройств, вызванным высоким вкладом AF. В результате Lu1 с соавторами использовали 4–8 PC при проведении PLS-DA, в то время как в настоящем анализе используется только 1-4 PC в PLS-DA. Использование такого небольшого количества PC (например, только 1 в задаче ММ vs

SK, «Full» модель) можно объяснить преобладанием сигнала AF в регистрируемых спектрах.

Важно отметить, что в соответствии с достигнутыми ROC AUC все четыре рассматриваемых спектроскопических задачи (Raman, AF, Full и Raman + AF) демонстрируют статистически незначимые изменения ($p > 0,2$) для задач классификации MM против NE + SK и для задач классификации MM против SK. В то же время для задачи классификации злокачественных и доброкачественных новообразований классификатор Raman показывает более высокую эффективность, чем классификатор AF (изменения статистически значимы, $p < 0,01$), тогда как классификатор Raman + AF показывает результаты, равные классификатору Raman. Такие результаты можно объяснить преобладанием AF в регистрируемом сигнале. Сильный сигнал AF маскирует слабые пики Рамановского рассеяния, и анализ спектров затруднен, особенно для пигментных новообразований. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, чтобы точно установить лучший способ анализа зашумленных спектров кожи с помощью недорогих Рамановских устройств.

Демонстрируемые результаты были дополнительно сравнены с методами компьютерной диагностики (CAD) на основе дерматоскопии и спектроскопии. Кокрановский обзор [177] приложений CAD-систем для диагностики рака кожи у взрослых людей продемонстрировал среднюю чувствительность 90% (84% -94%; 95% CI) со средней специфичностью 74% (64%-83%; 95% CI) для систем CAD на базе дерматоскопии; соотношение биопсии составляло 1,14: 1. Для систем CAD на основе спектроскопии средняя чувствительность составила 93% (84%-97%; 95% CI), а средняя специфичность - 44% (25%-65%; 95% CI), значение коэффициента биопсии составило 2,42: 1. Значения чувствительности и специфичности, продемонстрированные системами CAD, несколько выше, чем соответствующие значения в нашем исследовании, однако коэффициенты биопсии для портативной системы сопоставимы, если не лучше, чем коэффициенты биопсии, полученные с помощью систем CAD. Здесь важно отметить, что большинство исследований, включенных в обсуждаемый Кокрановский обзор, содержали образцы кожи только десятков субъектов (24 исследования были включены в обзор систем CAD на основе дерматоскопии, а 18 исследований были включены в системный обзор CAD на основе спектроскопии). Даже авторы Кокрановского обзора заявляют: «... доказательная база в настоящее время слишком скудна, чтобы понять, влияют ли результаты CAD-системы на принятие различных клинических решений на практике», поскольку «... доказательная база для отдельных систем слишком ограничена, чтобы делать выводы на которых может быть

выбрано предпочтительное для практики устройство». На данный момент довольно сложно сравнивать производительность предлагаемой портативной спектроскопической системы и существующих САД-систем из-за ограниченной доказательной базы для отдельных САД-систем [177]. Однако предлагаемая система может оказаться выигрышной, поскольку она демонстрирует очень многообещающие значения требуемых соотношений биопсии. Важной особенностью предлагаемой системы является низкая стоимость, особенно по сравнению с Рамановскими системами с глубоким охлаждением. Кроме того, предлагаемую Рамановскую систему можно использовать в клинических условиях почти без обучения пользователей и без опыта внедрения систем САД.

Другое сравнение может быть выполнено для разработанной системы и визуального осмотра с дерматоскопией и без нее. Кокрановский обзор Dinnes с соавторами [145] предоставили данные для анализа кожных новообразований в случаях личного визуального осмотра и визуального осмотра на основе изображений. Для личного визуального осмотра при фиксированной чувствительности 80% специфичность составила 75% только для визуального осмотра и 95% для визуального осмотра в сочетании с дерматоскопическим анализом. При специфичности 80% полученная чувствительность составила 76% для только визуального осмотра и 92% для визуального осмотра в сочетании с дерматоскопическим анализом. Для визуального осмотра на основе изображений при фиксированной чувствительности 80% специфичность составила 42% для только визуального осмотра и 82% для визуального осмотра в сочетании с дерматоскопическим анализом. При специфичности 80% полученная чувствительность составила 47% только для визуального осмотра и 81% для визуального осмотра в сочетании с дерматоскопическим анализом. Предлагаемый подход позволяет классифицировать злокачественные и доброкачественные новообразования при фиксированной чувствительности 80% и специфичности 53%. При специфичности 80% полученная чувствительность составила 57%. Для классификации ММ и пигментных новообразований специфичность 44% была получена для чувствительности 80%, а чувствительность 42% была найдена для специфичности 80%. Для классификации ММ и SK специфичность 69% была обнаружена для чувствительности 80%, а чувствительность 66% была найдена для специфичности 80%.

Точность настоящего исследования, как правило, ниже, чем точность личного осмотра и дерматоскопического анализа при осмотре на основе изображений, представленном в Кокрановском обзоре, но выше, чем точность исключительно визуального осмотра на основе изображений. Однако Dinnes с соавторами считают, что «... наблюдается более

высокая точность наблюдателей, имеющих большой опыт и тех, которые классифицируются как «эксперты-консультанты» по сравнению с теми, кто считается менее опытным в дерматоскопии...». Точность визуального осмотра и дерматоскопического анализа сильно зависит от опыта специалиста, в то время как предлагаемый в настоящей главе подход полностью автоматизирован и не зависит от мнения врача, проводящего осмотр пациента. В целом, одновременный анализ дерматоскопии, невооруженным глазом и спектроскопическая оценка кожных повреждений требуется в будущих исследованиях, чтобы полностью оценить возможности предлагаемой портативной спектроскопической системы по сравнению с визуальным осмотром и дерматоскопическим анализом. В частности, в исследовании Menzies с соавторами (изученные новообразования кожи $n = 2430$, ММ $n = 382$), чувствительность и специфичность 90%, 81%, 85% и 62%; и 59%, 60%, 36%, 63% были получены для экспертов, дерматологов, стажеров и терапевтов, соответственно [187]. Предлагаемая портативная спектроскопическая система дает возможность классифицировать новообразования кожи со средней точностью выше, чем точность врачей общей практики и начинающих специалистов, и с сопоставимой или меньшей точностью квалифицированных дерматологов и экспертов. Однако довольно сложно сделать некоторые точные выводы, поскольку обсуждаемые исследования основаны на разных популяциях, разных устройствах, разных данных и моделях.

Таким образом, в соответствии с полученной точностью такие недорогие портативные Рамановские системы могут использоваться в приложениях массового скрининга для повышения точности обнаружения новообразований кожи непосредственными специалистами и терапевтами. Кроме того, предлагаемые системы могут использоваться в клинических условиях для оценки кожных тканей, а результаты такого анализа могут быть добавлены к оценке морфологии новообразования, выполняемой во время дерматоскопического анализа. Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить совместную применимость дерматоскопического анализа и недорогих Рамановских систем.

Таким образом, в данной главе было продемонстрировано применение портативной недорогой системы Рамановской спектроскопии для независимой от оператора классификации новообразований кожи. Такие системы способны оценивать свойства тканей кожи с помощью комбинационного рассеяния и AF в ближней инфракрасной области; тогда как анализ спектроскопических данных проводился на основе PLS-DA. Для предлагаемого подхода классификация новообразований кожи возможна с несколько

меньшей точностью, чем для устройств с глубоко охлаждаемыми детекторами. Хотя время сбора спектра составляет 60 секунд для недорогой системы и около 1 секунды (или даже меньше) для устройств с глубоко охлаждаемыми детекторами, точность автоматического анализа с помощью предлагаемой системы выше, чем точность врачей общей практики и врачей без многолетнего опыта диагностики, и сравнима или меньше точности квалифицированных дерматологов. Важной особенностью предлагаемого подхода является то, что его можно легко комбинировать с другими оптическими методами анализа кожных новообразований, такими как САD-системы на основе дерматоскопии и спектроскопии [145, 177] или применение анализа AF в видимой области [22, 188-190] и / или анализ диффузного отражения в видимой и ближней ИК областях [111, 128, 191, 192]. Оценка цвета новообразований проблематична с предлагаемой спектроскопической установкой, и спектральный анализ NIR может быть дополнен анализом изображений новообразований. Сочетание предложенного подхода и дерматоскопии дает возможность одновременного анализа морфологических и биохимических свойств тканей, что может значительно повысить точность классификации новообразований. Однако эту комбинацию необходимо протестировать в будущих крупных клинических испытаниях, чтобы доказать, что мультимодальные недорогие портативные оптические устройства могут быть более точными, чем настольные системы и дерматоскопический анализ, проводимый обученными экспертами. Кроме того, эти недорогие портативные системы могут быть протестированы на предмет их способности анализировать другие заболевания (например, выявлять и контролировать диабет [175, 176] или почечную недостаточность [193]) и выявлять неоплазию в других частях тела.

Выводы по главе

Предлагаемый мультимодальный подход, включающий одновременный анализ AF и RS при исследовании новообразований кожи человека, может быть реализован с использованием небольшой портативной Рамановской системы с длиной волны возбуждения 785 нм. При этом анализ спектральных данных «оптической биопсии» может проводиться с применением PLS-DA. Такой анализ автоматически позволяет выявлять наиболее важные спектральные регионы, учет которых максимизирует точность создаваемых классификаторов новообразований кожи. Точность проводимого анализа не уступает точности врачей общей практики и начинающих специалистов, но оказывается сравнима или немного ниже точности опытных врачей-онкологов-дерматологов. Разделение различных злокачественных и доброкачественных новообразований кожи было

показано на примере трех диагностических примеров и возможно с точностью выше 85% и ROC AUC выше 0,81.

Для дальнейшего совершенствования предлагаемого метода «оптической биопсии» необходимо создать более точный классификатор, который смог бы автоматически учитывать слабый Рамановский сигнал на фоне доминирующего AF сигнала, а также бы позволял точнее определять положение наиболее информативных спектральных полос для максимально эффективного определения типа новообразований кожи. Кроме того, целесообразно протестировать разработанную для классификации новообразований кожи методику проведения «оптической биопсии» на возможность выявления и классификации других заболеваний.

4 РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Набор метаболитов, синтезируемых организмом, составляет его метаболом. Метаболическое фенотипирование, которое в настоящее время чаще всего называют «метаболомикой», определяется как «количественное измерение динамического мультипараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические стимулы или генетическую модификацию». Наиболее известными компонентами метаболома, широко используемыми в клинической практике для диагностики заболеваний и определения их прогноза являются глюкоза, мочева кислота, креатинин, холестерин и его фракции, триглицериды. В последние десятилетия стало известно, что содержание так называемых конечных продуктов гликирования (КПГ) – неэнзимного связывания белков с глюкозой тесно связано не только со старением кожи, но отражает воспалительные, дегенеративные процессы в жизненно важных органах - сердце, мозге, почках, коже. Исследование состояния сосудистой стенки легло в основу концепции современной кардиологии «сосудистого возраста». Потеря эластичности крупных артериальных сосудов – аорты и ее ветвей сопряжено с увеличением летальности от сердечно-сосудистых заболеваний, главными из которых являются инфаркт миокарда и инсульт, с которыми связано не менее 50% общей смертности в популяции. Доказано, что деградация эластина и коллагена – основных материалов аортальной стенки происходит благодаря образованию обсуждаемых гликированных соединений. Эти процессы определяются генетическими факторами и факторами образа жизни, среди которых характер питания, статус курения, образ жизни и тд. Определение метаболического профиля тканей человека является перспективным для выявления так называемых биомаркеров – суррогатных критериев, имеющих доказанное прогностическое значение, что позволяет проводить стратификацию риска с тем, чтобы в группе пациентов с неблагоприятными параметрами осуществлять наиболее агрессивную стратегию, направленную на их нормализацию. Выявление новых биомаркеров, связанных с патологической перестройкой сердца и сосудов является актуальным для науки и практики подхода, направленного на борьбу со старением и обусловленными старением заболеваниями.

Хроническая болезнь почек - одна из самых частых патологий среди неинфекционных заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения [194], 10% населения планеты страдает хроническими заболеваниями почек, миллионы из которых ежегодно умирают от патологий почек. Трансплантация почки в настоящее время является наиболее

часто выполняемой трансплантацией во всем мире. По оперативным данным за период с 2008 года по настоящее время, в 104 странах (население которых составляет почти 90% населения мира) выполнено более 100 800 трансплантаций целых органов, из них на трансплантацию почки пришлось 69 400 операций. Однако у реципиентов трансплантата существует риск развития множества осложнений, связанных в первую очередь с функциональным состоянием пересаженного органа и сердечно-сосудистой системы. В целом это привело к необходимости разработки и последующего использования универсальных методов мониторинга статуса получателей.

Почечная недостаточность приводит к распаду водных соединений, электролитов, азотистых соединений и другим нарушениям обмена веществ в организме человека [195, 196]. Подобные изменения, а также различные физиологические и патологические характеристики внутренних органов тесно связаны с состоянием кожи и влияют на ее компонентный состав. [197]. Следовательно, анализ изменений в составе различных слоев кожи человека – одно из ведущих направлений терапевтических дисциплин. Кроме того, кожа доступна и поэтому привлекательна как объект диагностики *in vivo*. При изучении компонентного состава кожи используются различные биохимические и иммунохимические методы лабораторных анализов. Однако эти методы инвазивны и требуют дополнительных реагентов. Помимо применяемых сегодня методов лабораторного анализа, для изучения компонентного состава кожи человека могут успешно применяться различные физические методы [198]. В настоящее время Рамановская спектроскопия используется в клинических экспериментальных исследованиях для определения состава кожи. В конце 20 - начале 21 века Caspers с соавторами опубликовали ряд работ, описывающих применение конфокальной Рамановской спектроскопии для анализа молекулярного состава, структуры и профилей концентрации молекул в коже, которые нашли множество применений в фундаментальных и прикладных дерматологических исследованиях [199-202]. В настоящее время Рамановская спектроскопия используется в анализе кожи для количественной оценки содержания определенного компонента в коже [203], для определения доставки лекарств через кожу [204], для определения биофизических связей между колебательными характеристиками и конкретными композиционными и химическими изменениями, связанными со старением. [59], и т.д. Возможности использования Рамановской спектроскопии также включают анализ патологических изменений кожи. Например, Feng с соавторами предложили первую биофизическую модель комбинационного рассеяния света, примененную к данным скрининга рака кожи *in vivo* [172].

В настоящей главе описываются спектральные характеристики Рамановского рассеяния кожи человека при развитии почечной недостаточности. Следует отметить, что портативные экономичные устройства представляют особый интерес в клинической практике. При аналогичных требованиях к используемому оборудованию получение статистически достоверной информации о развитии того или иного патологического процесса в организме человека при анализе кожи возможно с помощью методов хемометрики [31]. Поэтому целью проведенной работы являлось проведение оптического анализа кожи *in vivo* у гемодиализных пациентов с почечной недостаточностью с помощью Рамановской спектроскопии в ближней инфракрасной области с последующим многомерным анализом полученных спектральных данных с применением метода проекции на латентные структуры.

4.1 Когорта исследованных пациентов, проходящих процедуру гемодиализа, и участники эксперимента без хронических заболеваний

В данном исследовании анализ тканей кожи *in vivo* проводился в течение 2018-2019 гг. в Самарской областной клинической больнице имени В.Д. Середавина и Самарского национального исследовательского университета. Исследуемые испытуемые отбирались методом стратифицированной случайной выборки. Исследование проводилось на трех группах испытуемых: целевая группа, состоящая из 85 гемодиализных пациентов с почечной недостаточностью (серия 90 спектров), взрослая контрольная группа, состоящая из 40 здоровых добровольцев (80 спектров) без системных заболеваний, и молодая контрольная группа, состоящая из 84 здоровых добровольца (168 спектров) без системных заболеваний. Все обследованные были европеоидной расы с I и II фототипом кожи. Распределение фототипов в каждой исследованной группе было равномерным, без преобладания конкретного фототипа. Информация об испытуемых представлена в таблице 4.1. Для каждого испытуемого проводилась стандартизированная регистрация спектральных характеристик кожи предплечья. Информированное согласие было получено от всех пациентов, все участники были старше 18 лет. Протоколы исследования *in vivo* одобрены этическим комитетом Самарской областной клинической больницы имени В.Д. Середавина, эксперименты проводились в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

Таблица 4.1 – Исследованные пациенты, проходящие гемодиализ и здоровые добровольцы, принявшие участие в исследовании

Группа	Количество объектов	Количество спектров	Ж	М	Возраст min-max (средний)
Целевая группа (гемодиализные пациенты с почечной недостаточностью)	85	90	37	48	36-78 (61)
Здоровая взрослая группа	40	80	11	29	36-77 (59)
Здоровая молодая группа	84	168	39	45	18-25 (21)

4.2 Регистрация спектров кожи больных, находящихся на гемодиализе, с помощью портативной Рамановской системы

Исследование спектральных характеристик Рамановского рассеяния кожи проводилось на экспериментальной установке, показанной на рисунке 3.1. Стимуляция зарегистрированных спектров проводилась с помощью лазерного модуля (LuxxMaster LML-785.0RB-04, PD-LD, Нью-Джерси, США) с центральной длиной волны 785 нм. Рамановский зонд (RPB785, InPhotonics, Массачусетс, США) может фокусировать возбуждающее излучение, а также собирать и фильтровать рассеянное излучение. Фокусное расстояние используемого Рамановского зонда составляло 7,5 мм при расстоянии между исследуемым образцом кожи и выходной линзой Рамановского зонда 7 мм. Следует отметить, что рассеянное излучение собиралось с верхних слоев кожи. Из-за многократного рассеяния первичного излучения полный спектр записывается с области ткани, где происходит объемное рассеяние зондирующего излучения, а не с конкретной точки фокусировки. Наибольший вклад в Рамановскую составляющую дает дерма (примерно 70%) [157]. Область лазерного облучения с учетом многократного рассеяния имела диаметр около 3,5 мм. Выходная мощность лазера от Рамановского зонда составляла 30 мВт. Плотность мощности лазера на исследуемой коже составила 0,3 Вт/см², что не превышает максимально допустимого предела воздействия по ANSI 0,35 Вт/см². Собранный сигнал

был разложен в спектр с помощью портативного спектрометра (QE65Pro, Ocean optics, Флорида, США).

Спектры регистрировали в диапазоне 780-1050 нм со спектральным разрешением 3,5 см⁻¹ и временем экспозиции 20 секунд. Результирующий необработанный спектр для каждого объекта представляет собой автоматическую последовательную запись трех спектров с последующим усреднением в программном обеспечении SpectraSuite. Таким образом, время записи необработанного спектра для каждого объекта исследований составляло 60 секунд.

4.3 Статистический анализ спектральных данных «оптической биопсии» пациентов с почечной недостаточностью и здоровых индивидов с применением метода проекции на латентные структуры

Спектры кожи предплечья регистрировались с помощью программы SpectraSuite (Ocean optics, Флорида, США). Непосредственно перед регистрацией спектральных характеристик исследуемых образцов производилась предварительная регистрация фонового сигнала системы без образца кожи. После этого фоновая составляющая автоматически вычиталась из последующих записанных спектров кожи с использованием встроенного алгоритма в программе SpectraSuite. Каждый из полученных спектров представляет собой дискретный набор из 515 параметров (предикторов). Перед регрессионным анализом необработанные спектральные данные были сглажены фильтром Савицкого-Голея и нормализованы с использованием стандартного отклонения метода нормальных переменных (SNV). Применялся фильтр Савицкого-Голея с шириной окна фильтра 15, 1 порядок полинома использовался для сглаживания и 0 порядок производной (без производной). SNV - это простая предварительная обработка для удаления эффектов рассеяния (смещение базовой линии и наклон) из спектральных данных. В алгоритме SNV сначала выполняется центрирование каждого спектра, а затем его масштабирование путем деления на его стандартное отклонение. Центрирование данных снижает рейтинг модели на единицу и применимо в случаях унифицированной модели. Метод SNV вычитает среднее значение из каждого спектра и делит каждое значение сигнала на стандартное отклонение необработанного спектра. Разброс экспериментальных данных выравнивается методом SNV.

Отдельные анализы были выполнены для: необработанных спектров (называемых «Full»), компонента автофлуоресценции (называемая «AF») и компонента Рамановского

рассеяния (называемая «Raman»). Для разделения автофлуоресценции и Рамановского сигнала полученные необработанные спектры обрабатывали полиномиальным методом [205]. Необработанные спектры кожи были подвергнуты полиномиальной аппроксимации со степенями полинома от 3 до 10, потому что, согласно работе Zhao с соавторами [205], полиномиальная аппроксимация характеризуется требованием выбора степени полинома в каждом конкретном случае с учетом особенностей спектральных характеристик выборки в области аппроксимации. Сравнительный анализ аппроксимации спектральных характеристик кожи полиномами различной степени позволил аналитически определить полиномиальную функцию шестого порядка как наиболее подходящую степень полинома для исследования спектральных характеристик кожи, полученных с помощью используемой экспериментальной установки. Таким образом, компонент автофлуоресценции был аппроксимирован полиномиальной функцией шестого порядка. Компонент Рамановского рассеяния необработанного спектра был извлечен путем вычитания компонента автофлуоресценции из сырого регистрируемого спектра.

Обработка экспериментальных данных проводилась с помощью регрессионного анализа. Тот факт, что каждый испытуемый характеризуется спектральными данными и априорной информацией о конкретном классе (целевой или контрольной группе), помог решить задачу контролируемой классификации. Полученный набор экспериментальных данных был подвергнут дискриминантному анализу с проекцией на скрытые структуры (PLS-DA). Поскольку анализируемые спектральные данные являются мультиколлинеарными, методы проекционного анализа могут дать статистически достоверный результат. PLS-DA – один из наиболее распространенных подходов к решению подобных проблем. Полученные наборы экспериментальных данных (Full, AF, Raman) были подвергнуты многомерному анализу с целью построения следующих моделей:

- Почечная недостаточность VS группа взрослых здоровых: разделение пациентов с почечной недостаточностью и взрослых здоровых добровольцев.
- Молодая здоровая группа VS взрослая здоровая группа: дискриминация молодых здоровых добровольцев и взрослых здоровых добровольцев.
- Почечная недостаточность VS вся здоровая группа: выявление пациентов с почечной недостаточностью среди всех исследованных здоровых добровольцев.

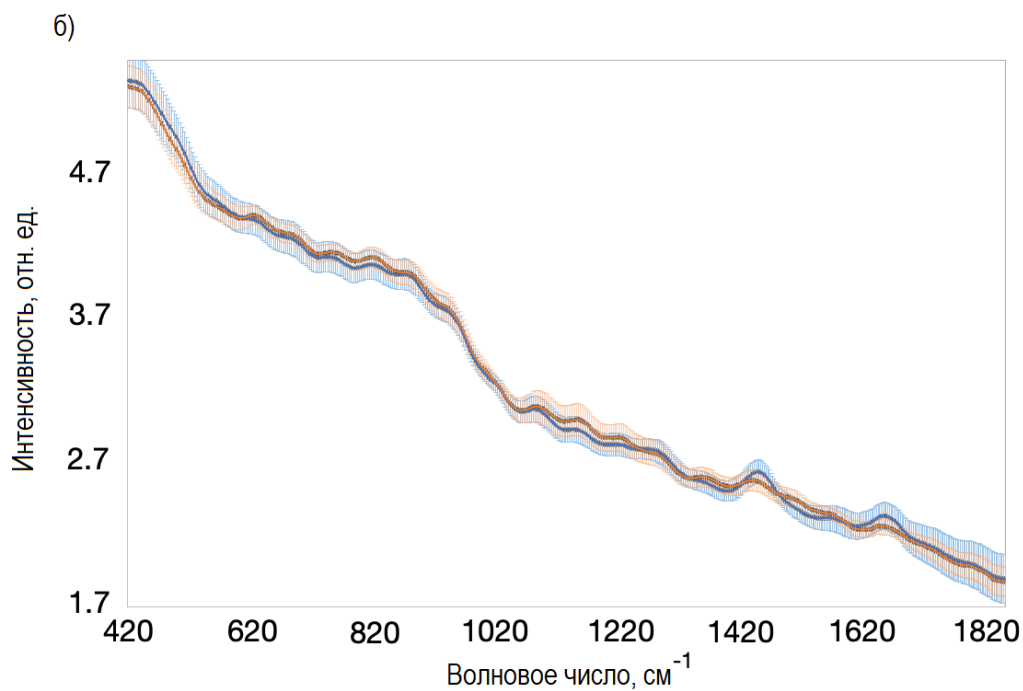
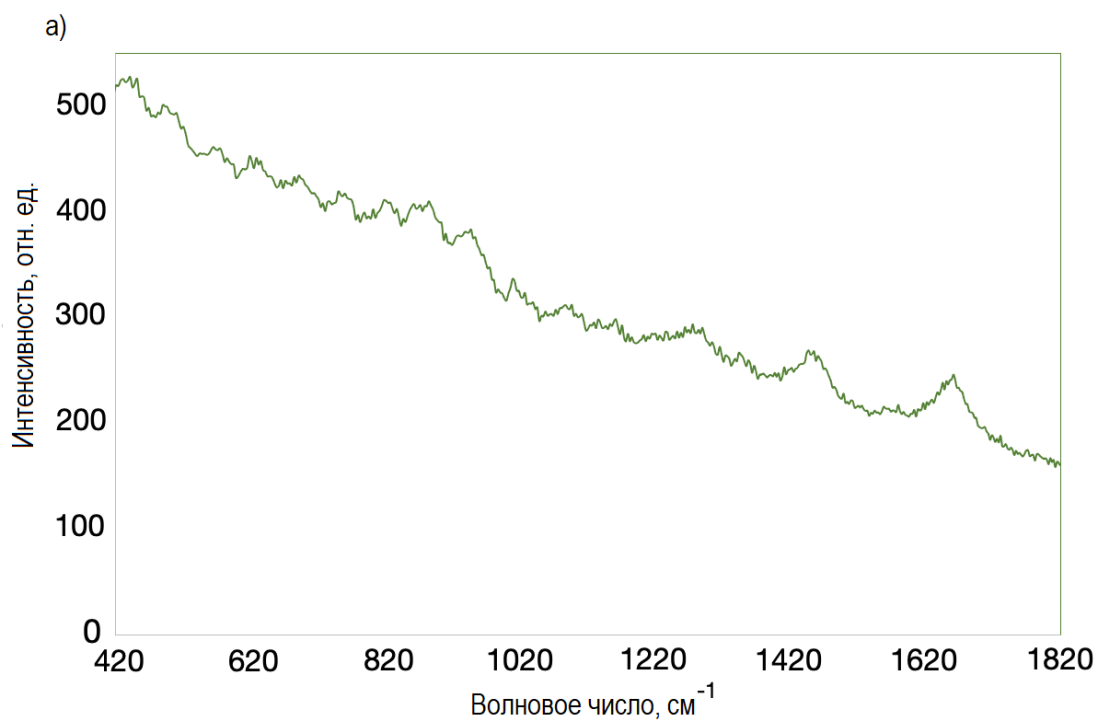
При построении регрессионной модели информативные полосы спектров определялись путем анализа важности переменных в проекционном распределении (VIP).

VIP позволяет оценить влияние отдельных переменных массива матриц предикатов на модель. Многовариантный анализ проводился с использованием пакета `mdatools` [158]. Повторная k -кратная перекрестная проверка (кросс-валидация) выполнялась для анализа каждой регрессионной модели. Эта перекрестная проверка проводилась по следующему алгоритму: 10% образцов исключаются из набора данных, модель строится на основе оставшейся части данных. Затем исключенная часть образцов возвращается, и цикл повторяется 9 раз с исключением следующих частей образцов. Перекрестная проверка позволяет определить оптимальное количество векторов нагрузки (Principal Components) при построении модели, чтобы избежать переобучения модели. Выбор оптимального количества векторов нагрузки осуществлялся в соответствии с первым локальным минимумом на графике ошибок (root mean square error – RMSE), рассчитанным для различного количества компонентов и прогнозов перекрестной проверки. Кроме того, сравнение результатов перекрестной проверки с характеристиками построенных моделей позволяет определить устойчивость модели классификации.

Коэффициент корреляции оценок VIP отдельных моделей был рассчитан с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics версии 21. Корреляция рассчитывалась с использованием алгоритма парной корреляции Пирсона. Пара оценок VIP двух отдельных моделей используется в качестве пары переменных при вычислении корреляции. Расчет коэффициента корреляции Пирсона оценивался по всему спектральному диапазону баллов VIP двух отдельных моделей.

4.4 Результаты исследования спектральных особенностей кожи пациентов с почечной недостаточностью

На рисунке 4.1 (а) показан пример необработанного зарегистрированного спектра, а на рисунке 4.1 (б) показаны усредненные предварительно обработанные спектры со стандартным отклонением для группы здоровых людей и группы пациентов с почечной недостаточностью. Как видно из рисунка 4.1, спектральные характеристики кожи в обеих исследуемых группах достаточно схожи, поэтому эффективное различение исследуемых групп может быть выполнено только при многомерном статистическом анализе спектральных данных.



- здоровая группа,
средний преобработанный спектр
- группа пациентов с почечной недостаточностью,
средний преобработанный спектр

Рисунок 4.1 – (а) Пример регистрируемого спектра кожи пациента с почечной недостаточностью, (б) Усредненные спектры кожи здоровых людей и кожи пациентов с почечной недостаточностью

Группа с пациентов с почечной недостаточностью VS группа взрослых здоровых людей

Для различения целевой группы и взрослой здоровой группы был проведен анализ PLS-DA. Рассмотрим матричный анализ сырых спектров кожи предплечья. Модель PLS-DA для выявления субъектов с почечной недостаточностью путем анализа спектральных характеристик кожи предплечья обеспечивает специфичность, чувствительность и точность на уровне 0,92, 0,76 и 0,81 соответственно. На рисунке 4.2 представлены VIP-баллы матрицы необработанных спектров кожи для модели PLS-DA для выявления субъектов с почечной недостаточностью.

Следует подчеркнуть, что вклады Рамановской и автофлуоресцентной составляющей, а также вклад от эффекта эталона различаются для отдельных испытуемых, что приводит к существенным различиям в интенсивности и виде сырых регистрируемых спектров кожи предплечья. В некоторых случаях применение экспериментальной установки QE не позволяет выделить пики Рамановского рассеяния в спектральной области $300-1200\text{ см}^{-1}$ из-за низкого уровня отношения сигнал/шум [31]. В этой спектральной области автофлуоресценция и шум детектора могут перекрывать слабый Рамановский сигнал. Начиная с 1200 см^{-1} наблюдается меньший вклад автофлуоресценции, что позволяет выделить пики Рамановского рассеяния кожи в регистрируемом сигнале. Как видно из рисунка 4.2, спектральная полоса около $420-580\text{ см}^{-1}$, связанная с автофлуоресценцией, является важной информативной и дополняющей Рамановские особенности в построенной модели классификации для определения субъектов с почечной недостаточностью с использованием PLS-DA при анализе Full модели спектров кожи. Однако полные спектральные характеристики содержат Рамановскую составляющую, для которой автофлуоресценция является паразитным фоном. Следовательно, анализ Рамановской составляющей и автофлуоресцентной составляющей по отдельности может повысить информативность анализа. Соответственно, были проанализированы спектральные характеристики кожи следующим образом: автофлуоресцентная составляющая в области от 420 до 1200 см^{-1} и Рамановская составляющая в области от 1200 до 1800 см^{-1} . В таблице 4.2 представлены характеристики построенных моделей для выявления пациентов с почечной недостаточностью среди взрослой здоровой группы.

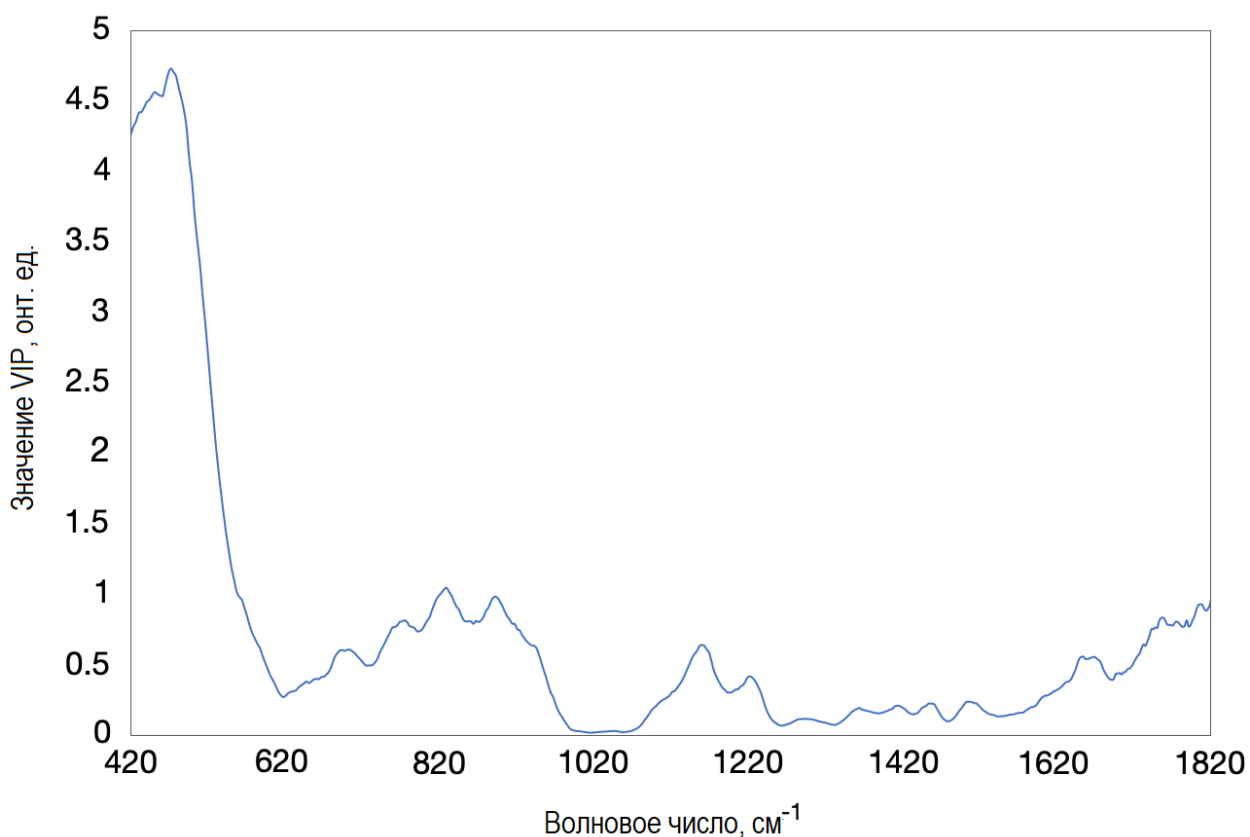


Рисунок 4.2 – VIP показатели модели разделения группы здоровых людей от пациентов с почечной недостаточностью по анализу спектров предплечья

Таблица 4.2 – Специфичность, чувствительность, точность выделения группы пациентов с почечной недостаточностью и взрослой здоровой группы.

Модель PLS-DA		Специфичность	Чувствительность	Точность
Почечная недостаточность VS взрослая здоровая группа	Full (2 PC)	0.92	0.76	0.81
	AF (2 PC)	0.91	0.84	0.88
	Raman (4 PC)	0.99	0.94	0.96

Группа молодых здоровых VS группа взрослых здоровых

Ряд изменений кожи, возникающих при развитии патологии почек, таких как ксероз кожи, сухость кожи, нефрогенный системный фиброз, приобретенный перфорирующий дерматоз и накопление конечных продуктов гликирования, не связаны исключительно с почечной недостаточностью. Например, ксероз кожи является одним из наиболее частых

основных симптомов многих дерматологических, внутренних и неврологических заболеваний [206], а накопление конечных продуктов гликирования характерно для курильщиков, пожилых людей, диабетиков [207-209]. Возраст - один из важнейших факторов, влияющих на состояние кожи. Некоторые возрастные деструктивно-дегенеративные процессы в коже вызывают различные структурные и биохимические изменения. С возрастом кожа претерпевает такие структурные изменения, как уменьшение толщины эпидермиса [210], более толстые кератиноциты [211], более тонкие коллагеновые пучки [212] и т.д. В свою очередь, биохимические изменения связаны с изменением концентрации различных эндогенных пигментов (например, липофусцин, меланин) [213], снижением количества гликозаминогликанов [214], снижение оборота эластина [215] и так далее. Поэтому следующим этапом проведенного исследования стал анализ специфики выявления метаболических изменений кожи при почечной недостаточности в том случае, когда группа исследуемых лиц неоднородна по возрасту. Для этого сначала была построена регрессионная модель дискриминации между молодой здоровой группой и взрослой здоровой группой. Наиболее информативными Рамановскими полосами кожи для возрастной дискриминации являются $1365-1370\text{ см}^{-1}$, $1395-1405\text{ см}^{-1}$, $1650-1660\text{ см}^{-1}$, $1760-1790\text{ см}^{-1}$. Специфичность, чувствительность и точность построенной регрессии представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Специфичность, чувствительность, точность выделения молодой здоровой группы и взрослой здоровой группы.

Модель PLS-DA		Специфичность	Чувствительность	Точность
Молодые здоровые VS взрослые здоровые	Full (3 PC)	0.91	0.99	0.96
	AF (4 PC)	0.90	0.99	0.96
	Raman (6 PC)	0.93	0.99	0.97

Группа с почечной недостаточностью VS вся здоровая группы

Далее была построена регрессионная модель, для дискриминации группы пациентов с почечной недостаточностью и всей группы здоровых людей, включая всех исследованных взрослых и молодых добровольцев. Характеристики построенной модели представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Специфичность, чувствительность, точность выделения группы с патологией почек и всей здоровой группы.

Модель PLS-DA		Специфичность	Чувствительность	Точность
Группа с почечной недостаточностью VS вся здоровая группа	Full (3 PC)	0.71	0.96	0.89
	AF (8 PC)	0.87	1.0	0.96
	Raman (7 PC)	0.99	1.0	0.99

4.5 Сравнительный анализ построенных регрессионных моделей для выявления патологий почек

Как видно из полученных результатов, точность выделения группы пациентов с почечной недостаточностью при анализе необработанного спектра ниже, чем при анализе отдельно автофлуоресцентной и Рамановской составляющих. Следует отметить, что отклик CCD-сенсора в используемом спектрометре снижается с увеличением длины волны рассеянного излучения в ближнем ИК-диапазоне; соответственно, в необработанном спектре присутствуют шумы, связанные с уменьшением отклика CCD-сенсора. Следовательно, предварительная обработка необработанного спектра и разделение Рамановской и автофлуоресцентной составляющих рекомендуется для минимизации шумового воздействия на Рамановский сигнал и выявления пациентов с почечной недостаточностью при изучении спектральных характеристик кожи.

Рассмотрим результаты, полученные при анализе автофлуоресцентной составляющей. Коэффициент корреляции Пирсона между оценками VIP модели «почечная недостаточность vs вся здоровая группа» и оценками VIP модели «почечная

недостаточность vs взрослая здоровая группа» при анализе компонента автофлуоресценции составлял 0,241, что указывает на отсутствие значимой корреляции. Следовательно, спектральные полосы компонента аутофлуоресценции, идентифицированные при построении модели «почечная недостаточность против взрослой здоровой группы» и характеристики группы с почечной недостаточностью, не являются информативными для модели «почечная недостаточность против всей здоровой группы». Следовательно, многомерный анализ автофлуоресцентного компонента кожного спектра не является специфическим методом определения спектральных характеристик, связанных с метаболическими изменениями в коже при почечной недостаточности. Тем не менее, многомерный анализ особенностей автофлуоресценции в ближней инфракрасной области позволил идентифицировать пациентов с почечной недостаточностью среди здоровых добровольцев той же возрастной группы со специфичностью, чувствительностью и точностью на уровне 0,91, 0,84 и 0,88. Полученные результаты сопоставимы с результатами, полученными Zhang с соавторами [216]. Прогностическое значение уровня аутофлуоресценции кожи у пациентов, страдающих заболеваниями, связанными с нарушением функции почек и сосудистыми заболеваниями, было изучено в работе [216], где авторы использовали метод опорных векторов (support vector machine – SVM) для классификации аутофлуоресценции кожи в видимой области для неинвазивной оптической диагностики сахарного диабета 2 типа. Источник возбуждающего света с пиковой интенсивностью при 370 нм использовался для возбуждения автофлуоресценции кожи и измерения испускаемого света от кожи в диапазоне 420-600 нм. Zhang с соавторами изучили спектры автофлуоресценции кожи у 63 пациентов с диабетом 2 типа и 140 человек контрольной группы и получили точность, чувствительность и специфичность на уровне 0,83, 0,70, 0,96 соответственно.

Рассмотрение результатов анализа Рамановской составляющей стало следующим этапом работы. Коэффициент корреляции Пирсона между оценками VIP модели «почечная недостаточность против всей здоровой группы» и оценками VIP модели «почечная недостаточность против взрослой здоровой группы» при анализе Рамановского компонента составил 0,937, что указывает на значительную корреляцию. Следует также отметить, что коэффициент корреляции между оценками VIP модели «почечная недостаточность VS вся здоровая группа» и оценками VIP модели «молодая здоровая группа VS взрослая здоровая группа» демонстрирует отсутствие значительной корреляции и достигает значения 0,033. Следовательно, многомерный анализ Рамановского компонента спектра кожи специфичен для выявления спектральных особенностей, связанных с метаболическими изменениями в

коже при почечной недостаточности, и возрастной фактор не оказывает значительного влияния на анализ. Кроме того, компонент Рамановского рассеяния является наиболее информативным для выявления пациентов с почечной недостаточностью при многомерном анализе спектральных характеристик кожи. Точность, чувствительность и специфичность анализа Рамановской составляющей достаточны для применения в клинических условиях. Следует подчеркнуть, что в данной работе изучались испытуемые с I и II фототипом кожи без предварительного воздействия УФ-излучения (принятия значительных солнечных ванн). При обследовании кожи после воздействия УФ-излучения или более пигментированных фототипов кожи возможно повышение содержания меланина в коже. Как следствие, увеличивается вклад меланина в автофлуоресценцию, что может повлиять на отношение сигнал/шум для сигнала Рамановского рассеяния кожи и ухудшить точность классификации объектов при анализе Рамановской составляющей. На рисунке 4.3 показаны оценки VIP матриц спектров Рамановского рассеяния в построенных регрессионных моделях.

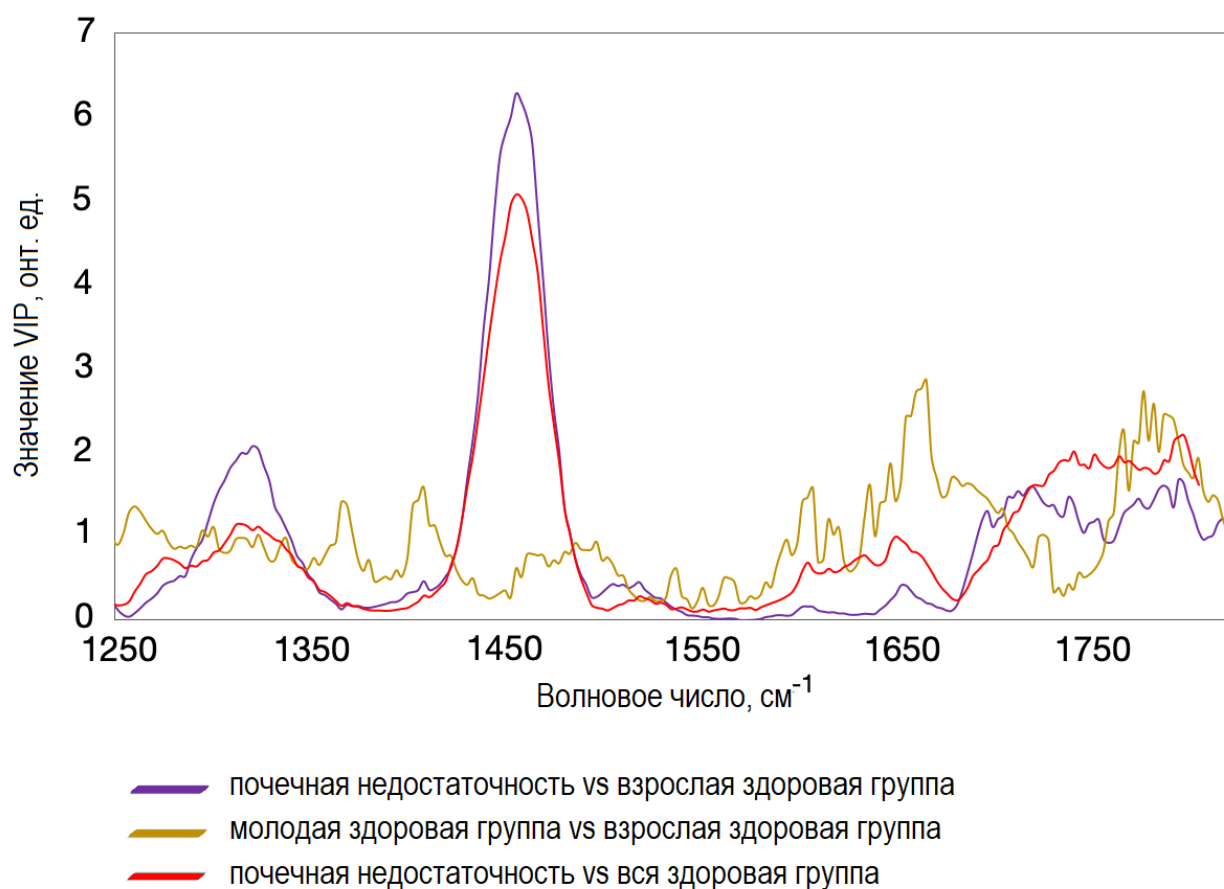


Рисунок 4.3 – VIP матрицы Рамановских спектров в построенных регрессионных моделях

Анализ рисунка 4.3 демонстрирует, что спектральные полосы, характерные для почечной недостаточности, не перекрываются с полосами, которые информативны при различении здоровых кожных тканей по возрасту. В таблице 4.5 показано соответствие основных информативных Рамановских полос для каждой построенной регрессионной модели.

Таблица 4.5 – Значимые Рамановские полосы построенных регрессионных моделей (ν = растягивающее колебание, δ = деформационные колебание)

Модель PLS-DA (Рамановский компонент)	Информативные спектральные полосы, cm^{-1}	Колебание, обуславливающее появление полосы	Ссылки
Почечная недостаточность VS взрослая здоровая группа	1315-1330	Amide III, $\delta(\text{CH}_2)$ в α -helix коллагена	[216]
	1450-1460	$\delta(\text{CH})$ в протеинах и липидах	[217]
Почечная недостаточность VS полная здоровая группа	1700-1800	$\nu(\text{C}=\text{O})$ в липидах и фосфолипидах $\nu(\text{COO})$	[218] [319]
	1365-1370	$\nu(\text{C}-\text{N})$ в цитозине и гуанине	[216]
Молодая здоровая группа VS Взрослая здоровая группа	1395-1405	Симметричные колебания $\delta(\text{CH}_3)$ в метиловой группе протеинов	[320]
	1650-1660	Amide I, $\nu(\text{C}=\text{O})$ в α -helix	[321]
	1760-1790	$\nu(\text{COO})$	[319]

Конкретные метаболические изменения, связанные с наиболее информативными спектральными полосами, могут быть идентифицированы путем анализа распределения VIP. Для этого необходимы совместные исследования Рамановского рассеяния кожи с забором исследуемого материала и биопсией. В перспективе такой подход сможет

расширить описание метаболических изменений кожи при наличии почечной недостаточности, а также контролировать содержание конкретных компонентов, имеющих прогностическое значение при анализе риска различных осложнений. Например, M. J. Noordzij с соавторами предоставили обзор того, как накопление конечных продуктов гликирования в тканях организма связано с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и смертностью у пациентов с почечной недостаточностью и пациентов с диабетом [222]. В подавляющем большинстве имеющихся в настоящее время исследований конечных продуктов гликирования с помощью Рамановской спектроскопии использовалось оборудование с конфокальной микроскопической системой. Например, Glenn с соавторами количественно изучили продукты конечных продуктов продвинутого гликирования в мембране Бруха, полученные после вскрытия [223]. Pawlak с соавторами [224] использовали Рамановскую микроскопию для исследования спектральных характеристик конечных продуктов гликирования как возможных маркеров прогрессирующей дисфункции сетчатки. Pereira с соавторами [225, 226] провели *in vivo* тесты конечных продуктов гликирования в коже и с помощью конфокальной Рамановской спектроскопии и показали влияние хронологического старения и процесс гликирования на дерму человека у пациентов с диабетом (молодых и пожилых здоровых людей). Эти исследования продемонстрировали, что спектроскопия Рамановского рассеяния света при длине волны возбуждения 785 нм является многообещающим инструментом для исследования биофизиологических механизмов кожи. Для группы пожилых женщин с диабетом были обнаружены два маркера конечных продуктов гликирования при 1511 см^{-1} и 1700 см^{-1} , что соответствует таким конечным продуктам гликирования, как глюкозепан и пентозидин, соответственно. В то же время большой интерес представляют исследования, посвященные анализу патологических изменений кожи человека с помощью портативной и экономичной Рамановской установки.

Использование портативной Рамановской спектроскопии в анализе рака кожи *in vivo* было описано рядом исследовательских групп [31, 53, 227]. Более того, как и в настоящей работе, было описано использование портативной Рамановской спектроскопии для обнаружения метаболических изменений в коже при наличии функционального заболевания организма. Например, Paolillo с соавторами [176] проанализировали 94 добровольца, сгруппированных в соответствии с возрастным диапазоном (20-80 лет), состоянием здоровья (недиабетическим, с инсулинорезистентностью и/или диабетом) и типом кожи по Фитцпатрику (I-VI) с помощью AGE Reader и портативного Рамановского прибора (система Ocean Optics, Inc., Данидин, Флорида). Paolillo с соавторами использовали

экспериментальную установку Рамановского рассеяния света, состоящую из спектрометра и диодного лазера (с центральной длиной волны возбуждения 785 нм) для стимулирования отдельных спектров в области 400-1800 см^{-1} . Авторы обнаружили значительную межгрупповую разницу между площадью Рамановского диапазона 855 см^{-1} для пожилой группы и группы инсулинорезистентности и / или диабета и взрослой группы. Более того, Raolillo с соавторами продемонстрировали, что пациенты с диабетом показали более низкие значения соотношения пиков Рамановского рассеяния 938 см^{-1} /922 см^{-1} по сравнению с недиабетическими добровольцами, предполагая, что белки становятся гидрофобными и, таким образом, приводят к обезвоживанию кожи у диабетиков.

4.6 Возможность определения патологий почек при проведении «оптической биопсии» тканей кожи предплечья

Таким образом, сравнение полученных результатов с данными рассмотренных выше исследований показывает, что портативная установка Рамановского рассеяния света может обнаруживать патологические изменения кожи пациентов с почечной недостаточностью. Точность, чувствительность и специфичность анализа достаточны для клинических применений, что делает его потенциальной основой для разработки новых методов мониторинга пациентов, находящихся на гемодиализе, и скрининга состояния здоровья пациентов с почечной недостаточностью.

В этой главе была описана возможность использования Рамановской спектроскопии в анализе кожи, чтобы определить наличие почечной недостаточности. Более того, многомерный анализ Рамановского компонента спектра кожи оказался специфичным для выявления спектральных особенностей, связанных с метаболическими изменениями в коже при почечной недостаточности, в то время как возрастной фактор не оказывает значительного влияния на анализ. Дополнением проведенного исследования будет определение метаболических изменений, соответствующих выявленным информативных Рамановских полос. В целом проведенное исследование демонстрирует, что для анализа кожи *in vivo* обычная Рамановская спектроскопия, реализуемая с помощью портативной установки, может обеспечить основу для экономичного скрининга и точного выявления почечной недостаточности. Более того, сочетание Рамановской спектроскопии с другими оптическими методами в одном портативном устройстве позволяет расширить анализ и, в перспективе, позволит идентифицировать различные патологические состояния

человеческого организма. Однако для достижения этой цели необходимо будет провести экспериментальную работу с большей выборкой пациентов с различными патологическими состояниями и расширить выборку здоровых людей.

Выводы по главе

Применение мультимодального подхода к анализу тканей кожи позволяет выявлять наличие патологий почек с точностью выше 97%. При этом стимуляция спектров RS и AF производится единственным источником излучения с центральной длиной волны 785 нм. Высокая точность анализа достигается за счет применения метода проекции на латентные структуры, который позволяет оценить вклад AF и RS компонент в итоговую точность классификации тканей кожи.

5 АНАЛИЗ УЗКОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ

5.1 Выделение беспигментных меланом с применением «оптической биопсии» на основе портативного Рамановского устройства

Алгоритм ABCD – это основной диагностический метод для выявления меланомы на предварительном этапе во всем мире, основанный на следующих характеристиках: асимметрия (A), неравномерность границ (B), изменение цвета (C) и диаметра (D). Однако атипичные морфологические особенности злокачественной меланомы (ММ) затрудняют выявление меланомы на ранних стадиях, что приводит к несвоевременному лечению. Амеланотическая (беспигментная) меланома (amelanotic melanoma – АММ) – один из наиболее опасных типов меланом, на долю которого приходится около 2–8% всех меланом [228, 229]. АММ имеет множество клинических проявлений и частичное или полное отсутствие пигмента, имитирующие немеланоцитарные поражения кожи (базальноклеточная карцинома (ВСС), кератоакантома, себорейный кератоз, болезнь Боуэна и т. д.), которые могут быть не столь опасны для выживания пациента, как ММ. Дерматоскопический анализ неэффективен для диагностики АММ как истинного ММ, поскольку никакие специфические клинические признаки и гистопатологические стандарты [229] не соответствуют АММ. Это значительно усложняет выявление АММ на ранних стадиях даже для самых опытных онкологов.

При использовании длинноволнового спектрального диапазона, а именно лазерного возбуждения 785 нм для анализа биотканей, появляется уникальная возможность одновременно регистрировать как автофлуоресценцию в ближней инфракрасной области (NIR), так и сигнал Рамановской спектроскопии, несущие информацию о биохимическом составе ткани [230]. В этом контексте комбинация Рамановской спектроскопии и автофлуоресценции является возможным (а может быть и наиболее подходящим) методом распознавания беспигментных меланом (amelanotic melanoma – АММ) как истинной ММ на предварительном этапе обследования на основе изучения конкретных спектральных характеристик АММ.

В недавних исследованиях [31, 230] была проведена оптическая биопсия на основе Рамановской спектроскопии и/или автофлуоресцентного анализа для классификации меланомы по сравнению с себорейным кератозом, пигментным невусом и другими типами злокачественных опухолей (ВСС, плоскоклеточная карцинома и т.д.). Цэн с соавторами

[108] сосредоточили внимание на обнаружении спектральных различий между раком и доброкачественными новообразованиями с помощью Рамановской спектроскопии света с возбуждением лазером с центральной длиной волны 785 нм. Борисова с соавт. [192] изучали пигментную меланому и различные типы злокачественных и доброкачественных пигментных опухолей на основе автофлуоресцентной спектроскопии в ультрафиолетовом, видимом и ближнем ИК диапазонах. Puppels с соавторами [231] продемонстрировали возможности Рамановской спектроскопии для дифференциации меланомы от различных типов пигментных невусов. Эти результаты очень ценны для обнаружения истинной пигментированной ММ, однако исследований, включающих оптическую биопсию для обнаружения АММ сегодня недостаточно. Поэтому разработанный метод оптической биопсии тканей кожи с применением комбинации Рамановского рассеяния света и автофлуоресценции был применен для обнаружения АММ среди других злокачественных опухолей кожи человека.

Экспериментальная установка, использованная для регистрации данных «оптической биопсии» беспигментных меланом

Спектры опухолей *in vivo* регистрировали с помощью портативной спектроскопической установки с использованием источника возбуждения NIR (лазерный диод 785 нм, мощность лазера 30 мВт), спектрометра QE 65Pro (Ocean Optics Inc.) и Рамановского оптического зонда InPhotonics (подробно состав экспериментальной установки был описан в предыдущих главах; также описание портативной установки можно найти в опубликованных работах [31]). Спектры регистрировали в области 780-1000 нм со спектральным разрешением 0,2 нм. Время интегрирования каждого спектра составляло 20с с трехкратным накоплением. Силиконовый наконечник оптического зонда позволял достигать расстояния 7-8 мм между зондом и поверхностью кожи.

Пациенты, принявшие участие в исследовании возможности обнаружения беспигментных меланом «оптической биопсией»

Протоколы *in vivo* диагностики тканей кожи были одобрены этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета. Исследование опухолей кожи *in vivo* проводили в Самарском областном клиническом онкологическом диспансере. Все пациенты были не моложе 18 лет. Перед исследованием *in vivo* у всех пациентов было получено информированное согласие.

Всего на спектроскопической системе *in vivo* зарегистрировано 189 спектров новообразований кожи у 189 пациентов (60 пигментных ММ (РММ), 9 АММ и 120 ВСС). Тип каждой опухоли был установлен с помощью гистопатологического анализа.

Анализ спектральных данных беспигментных меланом, полученных с помощью «оптической биопсии»

Спектры *in vivo* регистрировались в диапазоне 800-1000 нм, а для статистического анализа использовалась область 800-914 нм, соответствующая $237-1800\text{ см}^{-1}$. Все спектры были сглажены фильтром Савицкого-Голея (производная 0-го порядка, 15 – ширина окна, полиномиальная аппроксимация 2го порядка), нормированы на стандартное отклонение всего спектра для уменьшения разброса экспериментальных данных и центрированы для дальнейшего анализа.

Анализируемая спектральная область $237-1800\text{ см}^{-1}$ нм содержит как широкополосный сигнал автофлуоресценции, так и слабые пики Рамановского рассеяния. Применение установки QE не позволяет выделить пики Рамановского рассеяния в области от 237 до 1200 см^{-1} из-за низкого уровня отношения сигнал/шум (SNR). Автофлуоресценция перекрывает слабый сигнал Рамановского рассеяния, и в этой спектральной области можно анализировать только флуоресцентные особенности кожи. В диапазоне от 1200 до 1800 см^{-1} наблюдается меньший вклад автофлуоресценции, что позволяет выделить пики Рамановского рассеяния ткани из зарегистрированного сигнала. Таким образом, пики Рамановского рассеяния ткани являются важными характеристиками спектрального диапазона от 1200 до 1800 см^{-1} . При анализе всего спектра кожи в диапазоне $237-1800\text{ см}^{-1}$ учитываются как автофлуоресцентные, так и Рамановские спектральные особенности анализируемых тканей [31].

Регрессионный анализ с использованием дискриминантного анализа частичных наименьших квадратов (PLS-DA) был использован для статистического анализа спектров опухолей. В соответствии с целью данной главы были построены четыре регрессионные модели:

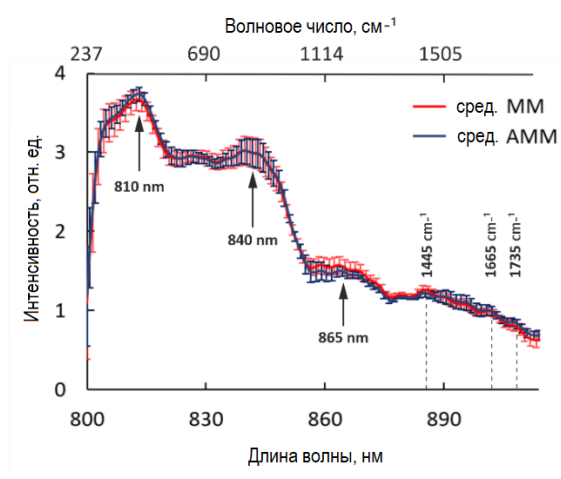
1. Дискриминация РММ по сравнению с ВСС;
2. Дискриминация всех ММ по сравнению с ВСС.
3. Дискриминация РММ по сравнению с АММ;
4. Дискриминация АММ по сравнению с ВСС;

Были выбраны первые 4 латентных переменных (LV) в модели регрессии (1), первые 3 LV в модели (2), первые 2 LV в моделях (3) и (4), соответствующие 95%, 94%, 89% и 86% от общей дисперсии спектральных различий между проанализированными классами опухолей соответственно. Количество LV было выбрано по критерию минимальной RMSE для примененной 10-кратной перекрестной проверке. Для статистического анализа использовалось облачное программное обеспечение (tptcloud.com).

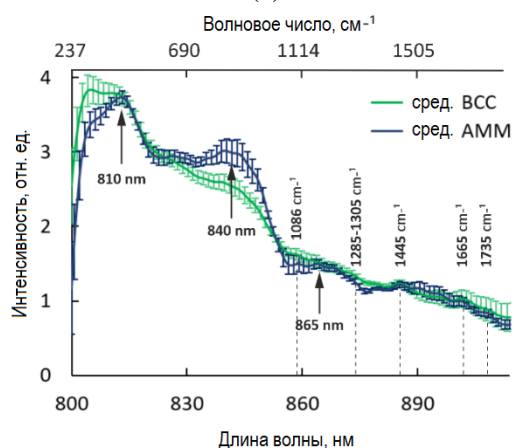
Для выполнения классификации PLS-DA были рассчитаны значения предикторов PLS для всех спектров. Результаты классификации опухолей на основе анализа PLS-DA были представлены в виде диаграмм размаха и кривой ROC. Чтобы количественно оценить эффективность модели, была рассчитана площадь под кривой ROC (ROC AUC).

Результаты возможности выявления беспигментных меланом с применением «оптической биопсии»

На рисунке 5.1 показаны средние спектры ММ, АММ и ВСС, включая сигналы Рамановского рассеяния и автофлуоресценции с дисперсией. Спектр, стимулированный лазером с длиной волны 785 нм, представляет собой нелинейно убывающую кривую автофлуоресценции с широкополосными максимумами (около 870 нм) и узкими пиками Рамановского рассеяния в области 850-900 нм. Максимумы широкополосной автофлуоресценции, которые вносятся эндогенными флуорофорами кожи (в основном, меланином, липидами, липофусцинами и др. [232], перекрывают слабые полосы Рамановского рассеяния света, особенно вблизи 866 нм (1200 см^{-1}), что затрудняет регистрацию Рамановского сигнала в этой спектральной области, особенно при анализе ММ, поэтому полосы комбинационного рассеяния могут быть визуализированы для волновых чисел от 1200 до 1800 см^{-1} .



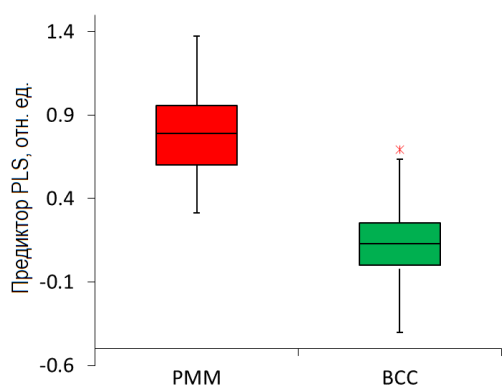
(а)



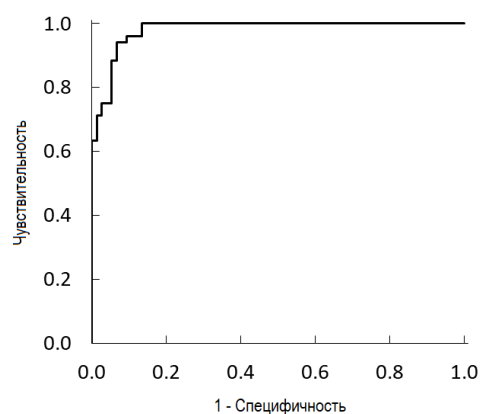
(б)

Рисунок 5.1 – Зарегистрированные спектры новообразований кожи, стимулированных лазером 785 нм: (а) сравнение спектров ММ и АММ, (б) сравнение ВСС и АММ.

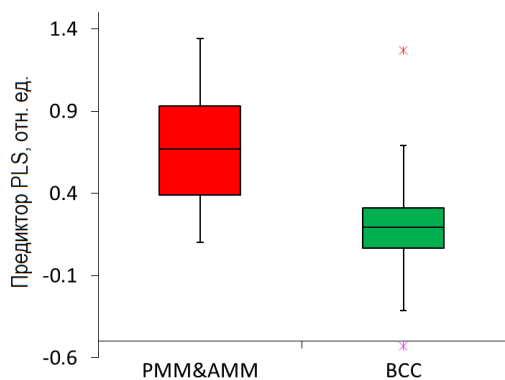
ММ и ВСС – это злокачественные новообразования кожи с различными биохимическими и клиническими особенностями. Согласно рисунку 5.1, спектры ВСС и ММ имеют заметные спектральные различия как в форме автофлуоресценции, так и в интенсивности Рамановского сигнала. Это позволяет провести классификацию РММ (n = 60) и ВСС (n = 120) с точностью 0,95 (чувствительность 0,95 и специфичность 0,96) и 0,98 ROC AUC (смотри рисунок 5.2 а, д). Для ВСС (n = 120) по сравнению с ММ (n = 69; включая АММ и РММ) различительная точность составляет 0,90 (чувствительность 0,86 и специфичность 0,93), а AUC ROC составляет 0,86 (рисунок 5.2 б, е). Таким образом, добавление АММ к анализу ММ и ВСС приводит к снижению точности модели классификации. Этот факт можно объяснить низким содержанием меланина как в тканях АММ, так и в тканях ВСС.



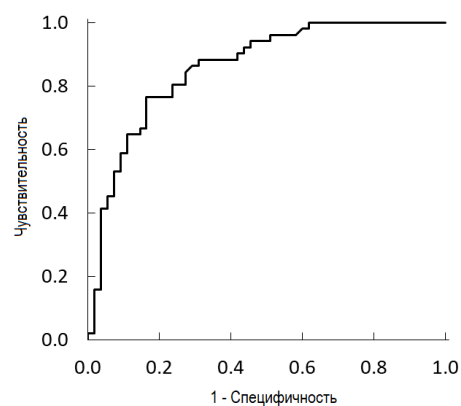
(а)



(д)



(б)



(е)

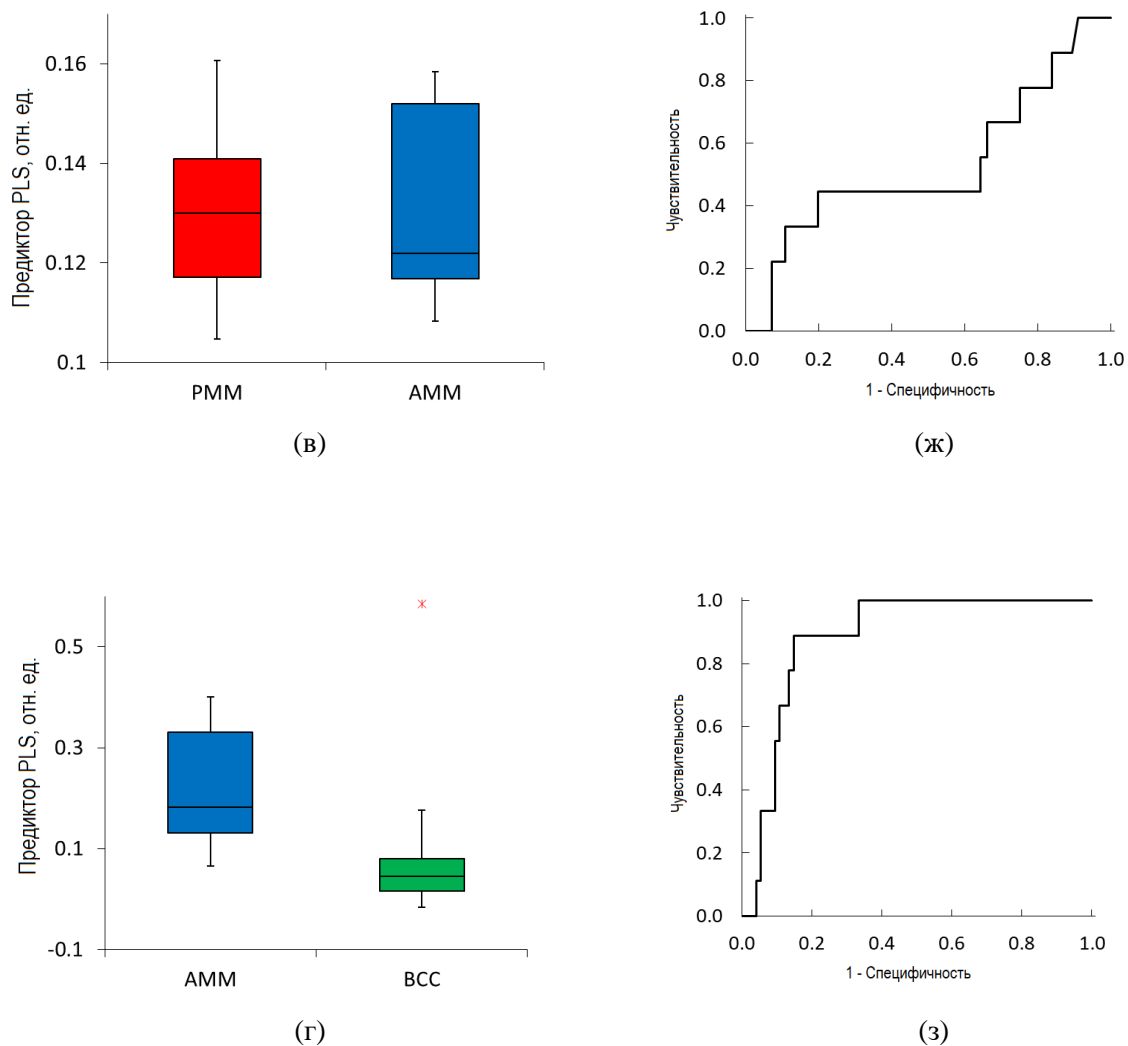


Рисунок 5.2 – Классификация новообразований с помощью Рамановской спектроскопии и AF на основе анализа PLS-DA: а-г диаграммы размаха PLS-предикторов для различения кожных поражений: (а), PMM по сравнению с BCC; (б), PMM и AMM против BCC; (в) AMM против PMM; (г) AMM против BCC; д-з Соответствующие кривые ROC получены из распределения предикторов PLS.

Как видно из рисунка 5.1а, средние спектры AMM и MM имеют сходные особенности формы кривой автофлуоресценции. Широкополосные максимумы наблюдаются вблизи 810, 840 и 865 нм. Спектральные различия в области 800–870 нм не превышают 5,9%. Оба средних спектра AMM и MM имеют спектральные максимумы при 840 и 865 нм по сравнению с нормальной кожей и другими опухолями кожи, такими как BCC [192]. В предыдущих главах упоминалось, что локальные максимумы при 840 и 865 нм наблюдаются в спектрах опухолей с высокой концентрацией меланина [192]. Эти пики смещены в область более длинных волновых чисел, что вызывает перекрытие пиков Рамановского рассеяния вблизи полос 1086 ($\nu_s(\text{P}02-)$) в фосфолипидах), 1285-1305 cm^{-1} (ν_{as}

(P02-) в фосфолипидах и $\tau(\text{CH}_2)$ в коллагене/фосфолипидах), как в спектрах РММ, так и в АММ.

Сходную автофлуоресценцию РММ и АММ с разным уровнем пигментации можно объяснить вкладом нескольких компонентов кожи. В то же время высокие максимумы автофлуоресценции и широкополосного излучения как в спектрах РММ, так и в невусах обусловлены высокой концентрацией меланина в этих новообразованиях кожи [192]. Таким образом, неясно, какие компоненты кожи, кроме меланина, вызывают высокую автофлуоресценцию при лазерной стимуляции тканей кожи с длиной волны 785 нм. Дарвин с соавт. [233] исследовали изменения автофлуоресценции NIR и спектров Рамановского рассеяния для различных фракций меланина на разных глубинах в коже человека, используя систему конфокальной микроскопии с разрешением по глубине. Они обнаружили, что спектральные характеристики автофлуоресценции NIR изменяются незначительно, в то время как фракция меланина в различных слоях кожи существенно изменяется. Основным достижением их исследования является то, что автофлуоресценция NIR в коже вызывается меланином, кератином и возможным воздействием продуктов окисления белков и липидов. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования для определения конкретных компонентов кожи, которые в наибольшей степени способствуют появлению автофлуоресценции в образцах тканей АММ.

Спектры АММ и ВСС существенно различаются с разницей до 54%. По сравнению с АММ, спектр ВСС имеет убывающую кривую с максимальными значениями на 800–810 нм без широкополосных максимумов на 840 и 865 нм. Средний спектр ВСС более сглажен в области около 866 нм и позволяет регистрировать пики Рамановского рассеяния при 1285–1305 cm^{-1} (ν_{as} (P02-) в фосфолипидах и τ (CH₂)) в коллагене/фосфолипидах, 1445 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$ в липидах), 1665 cm^{-1} (ν (C = C) в ненасыщенных липидах, амид I). Также такая низкая автофлуоресценция позволяет регистрировать пик Рамановского рассеяния около 1086 cm^{-1} для некоторых исследованных ВСС.

Рассмотрим регрессионные модели, основанные на спектральных различиях и сходстве, чтобы провести дискриминацию АММ от РММ и ВСС. Рисунок 5.2 (в-г, ж-з) демонстрирует результаты для построенных регрессионных моделей. На рисунке 5.2 (в, ж) показаны диаграммы размаха и кривая ROC для классификации РММ (n = 60) по сравнению с АММ (n = 9). На рисунке 5.2 (г, з) показаны диаграммы размаха и кривая ROC для классификации АММ (n = 120) и ВСС (n = 9).

Модель дискриминации АММ vs РММ показывает очень плохой результат. Предикторы PLS одинаково сконцентрированы в узком диапазоне 0,10-0,16 относительных единиц для спектров РММ и АММ, и этот факт значительно усложняет выделение АММ и РММ. Небольшая дисперсия предикторов PLS для спектров РММ и АММ вызвана небольшими спектральными различиями. ROC AUC этой модели составляет всего 0,53. Эквивалентные предикторы PLS для РММ и АММ вызваны схожим биохимическим составом, потому что любой клинический подтип меланомы кожи может быть амеланотическим [234]. В случае АММ vs ВСС наблюдаются лучшие результаты. Разброс предикторов PLS находится в широком диапазоне от 0,01 до 0,6 относительных единиц. Полученная модель позволила нам достичь точности дискриминации 0,90 (чувствительность 0,89 и специфичность 0,90) на основе совместного анализа комбинационного рассеяния света и автофлуоресценции. Предлагаемый метод оптической биопсии демонстрирует 0,88 ROC AUC для разделения АММ и ВСС.

Низкая точность анализа для дифференциации АММ и РММ обусловлена сходством формы автофлуоресценции в широкополосных максимумах, которые маскируют низкоинтенсивные полосы Рамановского рассеяния. В случае типичного ММ высокая автофлуоресценция вызвана высокой концентрацией меланина. Что касается высокой автофлуоресценции АММ, отсутствует точная биохимическая интерпретация исследуемых тканей, и, следовательно, можно только предполагать, что это связано с вкладом меланина и влиянием других компонентов ткани, таких как продукты окисления белков и липидов [233]. Это предположение частично может быть подтверждено результатами работы Meehan с соавторами [229]. Данная научная группа выполнила подробный морфологический анализ с клинико-патологической корреляцией 75 случаев АММ и обнаружила, что меланин может не присутствовать в АММ при визуальном осмотре, но он был обнаружен при гистопатологическом исследовании. Однако АММ с полным отсутствием пигмента меланина – чрезвычайно редкий случай. Meehan с соавторами предположили, что АММ может представлять подтип меланомы с измененным биологическим поведением по сравнению с обычной меланомой [229].

В исследованиях рака кожи методами Рамановской спектроскопии и автофлуоресцентной спектроскопии несколько работ продемонстрировали многообещающие результаты для классификации ММ по сравнению с другими опухолями кожи. В таких исследованиях все случаи меланомы рассматриваются как объединенный класс без подтипов. Несмотря на важность обнаружения АММ среди всех случаев ММ, наблюдается отсутствие работ по изучению АММ оптическими методами. Только в

нескольких медицинских исследованиях отдельные случаи АММ были детально изучены, чтобы продемонстрировать сложность диагностики АММ на основании только клинических или дерматоскопических признаков [234-236]. В различных исследованиях частота ошибочного диагноза АММ достигает 89% [236]. Cheung с соавторами исследовали 75 случаев АММ, и только 2 случая продемонстрировали отличительные клинические признаки АММ [229]. В исследовании Gualandri с соавторами только 2 случая АММ (из 36 изученных случаев АММ в целом) были заподозрены как истинные ММ [228]. В исследовании Detrixhe с соавторами [237] было показано, что все 7 изученных случаев АММ были неправильно диагностированы врачами.

Полученные результаты показывают, что спектральный анализ в ближней ИК-области позволяет определить АММ как истинное ММ. Этот вывод основан на схожести спектральных свойств АММ и РММ. В то же время представляется невозможным дифференциация АММ и ММ на основе предложенного оптического подхода. С другой стороны, настоящая проблема клинической диагностики – отличить АММ от других злокачественных опухолей. В этом исследовании мы достигли точности 0,90 и 0,88 ROC AUC при разделении АММ и ВСС. Такие значения диагностической эффективности очень многообещающие, и предлагаемый метод оптической биопсии может быть полезен при клинической оценке АММ среди немеланомных опухолей. Однако для подтверждения этого предположения требуются дальнейшие широкие клинические исследования с большим количеством исследованных АММ.

Возможность использования «оптической биопсии» для обнаружения и классификации беспигментных меланом

АММ является наиболее опасным типом ММ, потому что он либо часто ошибочно диагностируется как ВСС и другие немеланотические доброкачественные образования, либо не привлекает внимания из-за отсутствия клинических признаков меланомы. В результате АММ прогрессируют и обнаруживаются на поздних стадиях, что вредно для выживания пациента. В данной работе была проведена классификация случаев АММ по сравнению с РММ и ВСС. Спектральный анализ на основе характеристик Рамановского рассеяния света в ближней инфракрасной области и автофлуоресценции позволил различить АММ и ВСС с точностью до 0,90, в то время как АММ и ММ показали почти одинаковые спектральные свойства. Достигнутая ROC AUC дифференцировки АММ и ВСС составила 0,88, что доказывает, что предложенная методика оптической биопсии

кожных опухолей может быть полезной в клинической практике. Полученные результаты показывают, что спектральный анализ позволяет правильно определить АММ как ММ и избежать лечения АММ как других немеланомных опухолей.

5.2 Клинические случаи, демонстрирующие необходимость использования оптической биопсии в диагностике заболеваний

Диагностика дерматофибросаркома протуберанс с применением «оптической биопсии»

Дерматофибросаркома протуберанс (Dermatofibrosarcoma protuberans – DFSP) – редкое заболевание (около 1% всех зарегистрированных сарком мягких тканей, не более 0,01% среди других злокачественных опухолей), входящее в большую и разнообразную группу опухолей мезенхимального происхождения [238, 239]. Группа сарком мягких тканей очень неоднородна, поскольку источником опухоли может быть подкожная ткань, различные типы сосудов, фасции и сухожилия, поперечно-полосатая мышечная ткань, оболочки нервов и соединительная ткань. Нет никаких специфических факторов риска, связанных с DFSP; он может возникнуть на здоровой коже или на хронически поврежденных участках. DFSP обычно протекает безболезненно с высокой частотой местных рецидивов из-за его инфильтративного поведения, имеющего довольно низкий метастатический потенциал [238]. Хотя некоторые саркомы демонстрируют агрессивное течение и склонность к сильным гематогенным метастазам, 5-летняя относительная выживаемость около 95-99% типична для DFSP [238, 240]. Редкость данной патологии и отсутствие четких клинических признаков вызывают недостаточную онкологическую настороженность клиницистов (онкологов, хирургов, дерматологов) и даже морфологов. Неправильно установленный диагноз способствует недостаточному количеству лечения и развитию прогрессирования заболевания в виде местного рецидива или образования отдаленных метастазов.

DFSP обычно диагностируется с помощью биопсии кожи, предпочтительно послеоперационной или эксцизионной биопсии. Требуется полный анамнез и физикальное обследование, включая исследование лимфатических узлов. Некоторые литературные источники предлагают проводить томографию грудной клетки для оценки любого метастатического заболевания перед лечением, хотя в настоящее время это не общая рекомендация. Предоперационная МРТ, хотя и не обязательна, иногда выполняется для определения распространения опухоли перед операцией [239, 241, 242]. Возможным

способом повышения точности ранней диагностики редких новообразований кожи, в противоположность таким методам анализа как МРТ, является «оптическая биопсия» [3] с использованием Рамановской спектроскопии ткани [108]. Рассматриваемый клинический случай демонстрирует, как «оптическая биопсия» на основе RS может обеспечить быструю и надежную диагностику DFSP.

Больная 32-х лет обратилась в клинику с жалобами на рост кожных новообразований в правой надключичной области. Новообразование появилось в виде небольшого рубца 13 лет назад на месте пункции надключичной вены; за последние несколько месяцев наблюдалось увеличение новообразования. В анамнезе пациента не было других новообразований или инфекционных заболеваний. Солнечные ожоги и другие повреждения кожи также отсутствовали. Во время родов пациенту была сделана пункция вены. Пункция вены осложнилась кровотечением. Непигментированное новообразование распространилось по эллипсу до 1,5 см в наибольшем измерении. Кожа над опухолью не изменилась, но приобрела перламутровый оттенок и наблюдались небольшие включения пигмента (до 4-5 мм). Новообразование не было связано с окружающими тканями и было безболезненным. Рисунок 5.3 (а) демонстрирует дерматоскопическое изображение проанализированного образца DFSP.

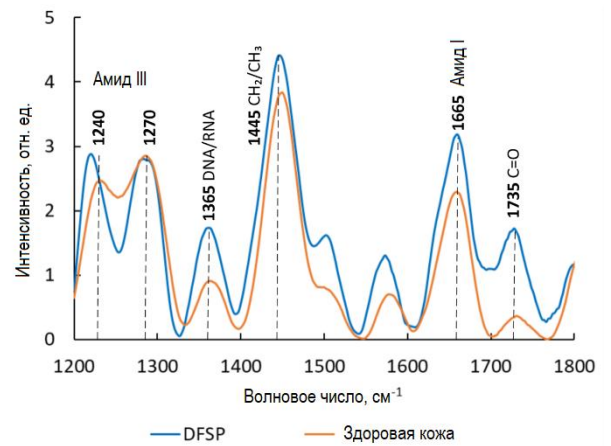
На основании визуального осмотра и анализа дерматоскопических изображений врач-онколог поставил предварительный диагноз (келоидный рубец, с пигментным пятном) исследуемого новообразования кожи. Затем рассмотренная в предыдущих главах портативная спектроскопическая система использовалась для записи спектров кожной ткани. Ограниченное время обследования пациента позволило зарегистрировать один спектр опухоли и один спектр окружающей нормальной кожи. Участки тканей для спектрального анализа выбирал онколог, проводивший обследование пациента. После осмотра дерматологом была проведена тотальная биопсия новообразования с последующей лазерной обработкой места биопсии. После тотальной биопсии эпителизация раны в течение 12-14 дней наблюдалась без каких-либо осложнений. Диагноз DFSP был установлен с помощью гистопатологического анализа; на участке резекции признаков роста опухоли не было обнаружено. Пациентка наблюдалась периодически (период наблюдения 39 месяцев с момента биопсии) без прогрессирования заболевания в виде локального разрастания или метастазов.

Несмотря на низкую метастатическую активность DFSP, их предварительная диагностика специалистами первого звена может быть затруднена из-за редкости. «Оптическая биопсия» на основе RS может обеспечить диагностику DFSP в реальном

времени. На рисунке 1 (б) показаны спектры Рамановского рассеяния DFSP и окружающей нормальной кожи. Белки преимущественно способствуют появлению полос в спектральном диапазоне 1220-1280, 1365, 1445 и 1665 cm^{-1} ; основные спектральные особенности липидов наблюдаются в полосах 1271-1301, 1445, 1650-1660 cm^{-1} . Одним из существенных различий между нормальной кожей и опухолью является процесс метаболизма и разрушения коллагена, который приводит к изменению полос Рамановского рассеяния около 1240, 1445 и 1665 cm^{-1} [31].

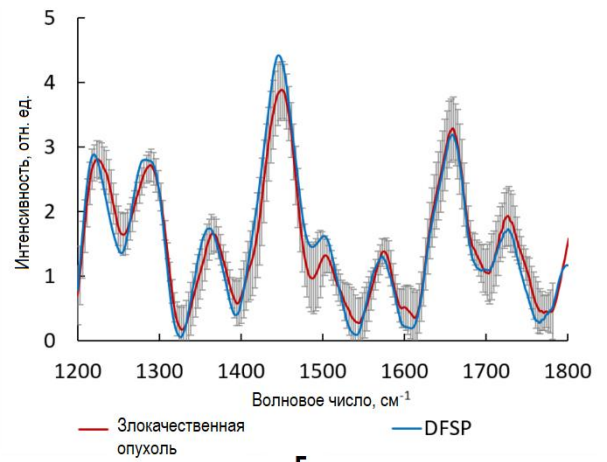
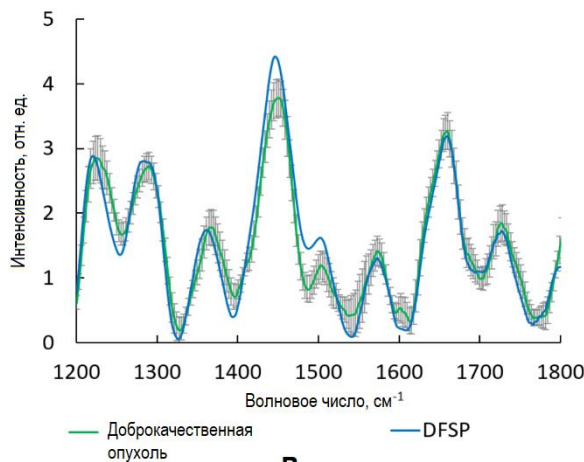
Рисунки 5.3 (б) и 5.3 (в) демонстрируют средние спектры Рамановского рассеяния с доверительными интервалами для злокачественных и доброкачественных опухолей кожи (спектры были собраны на основе оптического анализа более 600 кожных опухолей) [243] и записанные спектры Рамановского рассеяния DFSP. Анализ спектральных данных показал, что возможно отличить DFSP от других опухолей кожи, анализируя спектральные полосы Рамановского рассеяния в районе полосы 1450 cm^{-1} , поскольку эта спектральная область DFSP демонстрирует значительно более высокую интенсивность по сравнению со злокачественными и доброкачественными опухолями кожи. Полоса Рамановского рассеяния около 1450 cm^{-1} может быть отнесена к изгибным колебаниям CH_2/CH_3 , к изгибным и деформационным колебаниям в белках и липидах [168]. Этот результат коррелирует с данными об онкогенезе DFSP. Онкогенез DFSP связан с транслокацией хромосом 17 и 22, что приводит к слиянию генов коллагена типа 1 альфа 1 (COL1A1) и субъединицы b фактора роста тромбоцитов (PDGFB). Этот гибридный белок вызывает непрерывную активацию рецептора (PDGF рецептор b, PDGFRB) тирозинкиназы, которая способствует росту клеток DFSP [238].

Этот случай спектрального анализа DFSP демонстрирует, что «оптическая биопсия» может стать многообещающим инструментом в диагностике редких опухолей кожи, таких как DFSP. «Оптическая биопсия» на основе RS может помочь немедленно диагностировать точный тип опухоли, не требуя затрат времени на гистопатологический анализ или другие химические тесты. Однако необходимы дальнейшие крупномасштабные исследования, чтобы доказать, что «оптическая биопсия» на основе RS может стать полезным инструментом для быстрой и точной диагностики редких опухолей кожи.



а

б



в

г

Рисунок 5.3 – (а) Дерматоскопическое изображение дерматофибросаркомы протуберанс (DFSP) (размер шкалы – 1 см); (б) спектры Рамановского рассеяния DFSP и окружающей нормальной кожи; (в) доброкачественные опухоли кожи: средние спектры Рамановского рассеяния с доверительным интервалом и спектры Рамановского рассеяния DFSP; (г) злокачественные опухоли кожи: средние спектры Рамановского рассеяния света с доверительным интервалом и спектры Рамановского рассеяния света DFSP; среднее (в) и (г) данные взяты из работы [243]

5.3 Пример уменьшения нагрузки на поликлиники при *in vivo* анализе подозрительных участков кожи с применением «оптической биопсии»

Определение наличия или отсутствия злокачественного новообразования - важная задача для онколога, ведь правильно поставленный предварительный диагноз - основа дальнейшего эффективного лечения опухоли. Традиционно обследование кожных новообразований основывается на визуальном осмотре, который может быть дополнен

дерматоскопическим анализом [12], что повышает качество диагностики. При дерматоскопическом обследовании врач оценивает изменения формы и пигментации опухоли, которые трудно обнаружить невооруженным глазом [13]. Дерматоскопический анализ может включать мониторинг более специфических связанных с опухолью признаков, таких как атипичная пигментация и сосудистые сети, а также так называемая бело-голубая вуаль, которая представляет собой серо-белый узор с хорошо различимым синим оттенком [15]. Однако применение комплексных критериев для нетренированного врача-онколога довольно сложно. Поэтому разработка методов ранней и уточняющей диагностики новообразований кожи остается актуальной и по сей день.

В данном разделе демонстрируется возможность использования портативного Рамановского спектроанализатора (подробно описанного в предыдущих частях диссертации) для быстрой и надежной диагностики подозрительных новообразований кожи человека. Такая возможность была продемонстрирована при *in vivo* анализе двух новообразований (подозреваемых на злокачественность) у одного пациента. Результаты оптической биопсии были сравнены с анализами разных медицинских специалистов, обследовавших пациента. Чтобы доказать необходимость использования портативных Рамановских устройств для ранней диагностики новообразований кожи, а также возможности использования «оптической биопсии» для ускорения постановки верного диагноза новообразования, здесь приводится описание клинического пути пациента, который был обследован с применением «оптической биопсии», а также прошел путь от постановки диагноза в местной клинике, до удаления и гистологического анализа новообразования в специализированном онкологическом диспансере.

Пациент и исследуемые ткани новообразований кожи

Протоколы *in vivo* диагностики тканей одобрены этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета (Самарская область, Самара, Россия, протокол № 132, 29 мая 2013 г., клинические исследования подпадают под Кодекс этики врача России, утверждены на 4-й конференции Российской медицинской ассоциации и в рамках Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации). *In vivo* исследование новообразований кожи проводили в Самарском областном клиническом онкологическом диспансере. У пациента (мужчина, 35 лет, европеоид) были выполнены спектральные измерения двух кожных новообразований (папиллома – PP и себорейный кератоз – SK), оба на правой стопе. SK – диаметром 11 мм, PP – диаметром 4 мм. Всего

было зарегистрировано 7 спектров SK и 3 спектра PP. Тип каждого новообразования устанавливали на основании гистопатологического анализа после тотальной биопсии новообразований.

Предварительная обработка спектров и анализ спектральных данных «оптической биопсии»

Спектры *in vivo* регистрировались в области 800-914 нм, что соответствует 237-1800 см⁻¹. Экспериментальные данные обрабатывались с помощью реализации сверточных нейронных сетей (CNN). Каждая модель CNN была организована как комбинация остаточной одномерной сверточной базы, повторяющегося слоя и полносвязного уровня классификации. Сверточная база – это линейный стек из двух комбинаций сверточного слоя и объединяющего слоя. Сверточные слои анализируют карты фильтров для различных типов шаблонов во входных данных. Слои объединения выделяют наиболее заметные структуры в анализируемых спектрах. Остаточная связь реализуется с использованием свертки входного тензора с окном свертки, равным 1, для линейного уменьшения размерности и добавления результирующего остаточного тензора к выходным признакам сверточной базы. Подробности относительно реализации одномерной CNN для анализа полученного набора спектральных данных (включая данные о стабильности моделей классификации CNN) можно найти в следующей главе настоящей диссертации [243]. CNN-анализ проводился с использованием пакета KERAS в программе Rstudio [244]. Ранее проанализированные *in vivo* образцы были использованы для создания классификационных моделей, а 10 спектров *in vivo* зарегистрированных от описанных подозрительных новообразований, были использованы для тестирования построенных моделей. Анализовались три модели: (I) классификация злокачественных (злокачественные меланомы (MM), базально-клеточные карциномы, плоскоклеточные карциномы; n = 204) и доброкачественных (дерматофиброма, PP, гемангиома, SK, невусы, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка, n = 413) новообразований, (II) классификация MM (n = 70) и доброкачественных пигментных образований (невусы и SK; n = 283) и (III) классификация MM (n = 70) и SK (n = 113).

Клинический путь пациента

Первоначально пациент обратился с жалобами на изменение цвета пигментного новообразования на правой стопе. После солнечных ванн (в июле и августе 2020 года) непигментированное новообразование потемнело и превратилось в пигментное новообразование. Для исключения злокачественного характера новообразования пациент обратился к терапевту в поликлинику. Терапевт (август 2020 г.) направил пациента (без предварительного диагноза) к хирургу в той же местной клинике. Хирург (сентябрь 2020 г.) рекомендовал удалить новообразование хирургическим путем с предварительным диагнозом «возможное злокачественное новообразование». После осмотра хирургом пациент был направлен к онкологу в эту же местную поликлинику. Онколог местной поликлиники (октябрь - ноябрь 2020 г.) поставил предварительный диагноз «опухоль неясного происхождения» и направил пациента в специализированный онкологический центр (Самарский областной клинический онкологический диспансер) для уточнения диагноза.

Врач-онколог онкологического диспансера (январь 2021 г.) поставил диагноз «доброкачественная опухоль» и рекомендовал хирургическое удаление новообразования, чтобы исключить повреждение тканей при движениях ноги. Таким образом, пациент был перенаправлен к хирургу. Хирург онкологического диспансера обследовал новообразование (январь 2021 г.), поставил диагноз «доброкачественная опухоль» и подтвердил рекомендацию о хирургическом удалении новообразования. При осмотре пациента хирург дополнительно рекомендовал удалить еще одно новообразование на правой стопе пациента, так как это новообразование имело признаки злокачественности (предварительный диагноз – «пигментное новообразование неясного происхождения»).

Хирургическое удаление двух новообразований (февраль 2021 г.) было выполнено методом тотальной биопсии [245]. После биопсии ткани подверглись гистопатологическому исследованию. На основании гистопатологического анализа первому новообразованию (изначально изменившему цвет) был поставлен окончательный диагноз SK, а второму новообразованию (диагностированному как «пигментное новообразование неясного происхождения») – окончательный диагноз RP. Результаты гистологического анализа, подтверждающие установленный диагноз обследованных новообразований, представлены в Приложении А. В целом пациенту потребовалось почти полгода, чтобы поставить окончательный диагноз и исключить подозрение на злокачественность исследуемого новообразования.

«Оптическая биопсия» двух новообразований ноги

Перед биопсией новообразований их исследовали с помощью портативного Рамановского спектроанализатора [243]. Для классификации новообразований была реализована методика «оптической биопсии», основанная на анализе оптических свойств тканей кожи в ближней инфракрасной области [243]. После регистрации спектров полученный оптический профиль сравнивается с параметрами уже созданной классификационной модели, построенной на основе 617 Рамановских спектров, зарегистрированных *in vivo* от пациентов с различными новообразованиями кожи. Все 10 зарегистрированных спектров (7 SK и 3 PP) от двух исследованных подозрительных новообразований были правильно классифицированы как доброкачественные в модели (I), как пигментные доброкачественные образования в модели (II) и как SK в модели (III) (для модели (III) проанализировано только 7 спектров SK).

Анализ возможности внедрения «оптической биопсии» в клиническую практику для ускорения постановки диагноза

В настоящее время переход пациента от обнаружения новообразования к диагностике – это пошаговый процесс, который может занять значительное время [246, 247]. Использование дополнительных неинвазивных методов диагностики может сократить это время и улучшить статистику врачебных ошибок при диагностике рака кожи. На рисунке 5.4 показан пример текущей схемы обследования и возможный алгоритм приема пациента с новообразованием кожи. Традиционное обследование (А) состоит из анамнеза, визуального осмотра (a1) и исследования новообразования с использованием техники дерматоскопии (a2). При этом во время обследования возможно применение методики оптической биопсии (Б). Сначала необходимо записать спектральные характеристики новообразования (б1). Регистрация одного спектра полностью неинвазивна и требует всего около 1 минуты. Затем полученный спектр Рамановского рассеяния новообразования (б2) подвергается анализу CNN-классификатора на основе ранее обученных моделей. Спектральный анализ выполняется на основе реализации CNN, подробно описанной в следующей главе [243] (б3). Результатом анализа является классификация полученного Рамановского спектра и решение о вероятной принадлежности новообразования к определенной группе новообразований кожи (б4). Таким образом, «оптическая биопсия» может повысить информативность исследования новообразования у пациента и ускорить процесс постановки диагноза.

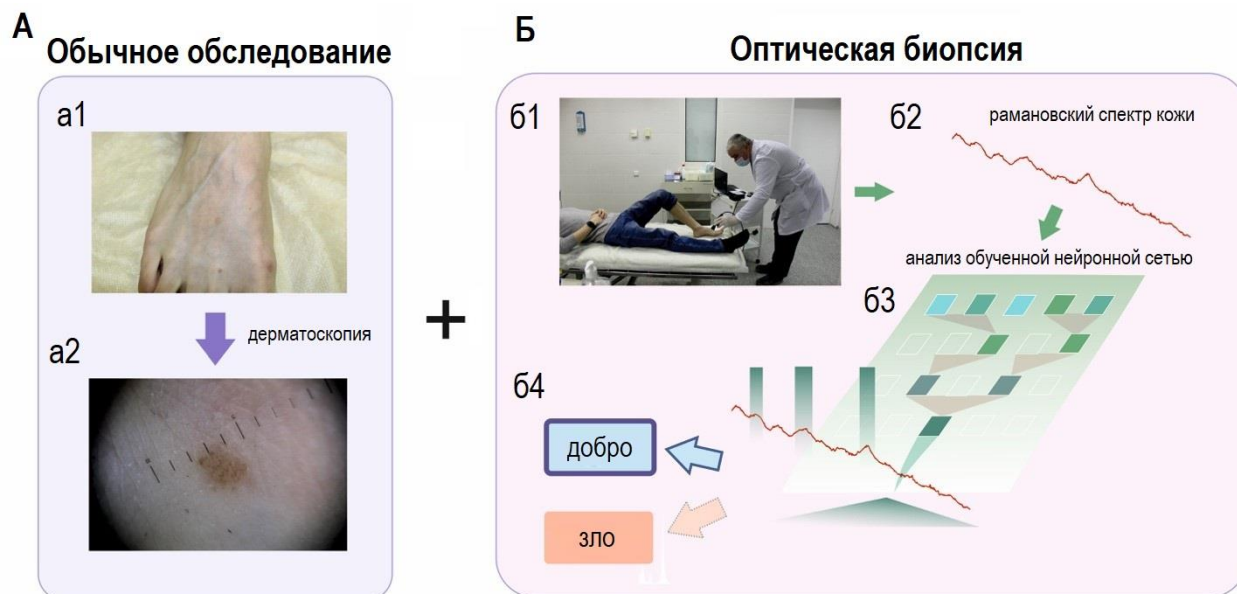


Рисунок 5.4 – Прием пациента с новообразованием кожи: (А) Традиционное обследование требует сбора анамнеза, визуального осмотра (a1) и исследования новообразования с использованием техники дерматоскопии (a2); (Б) метод «Оптической биопсии» требует сбора спектральных характеристик в течение 1 минуты (б1); полученный спектр Рамановского рассеяния новообразования (б2) подвергается обработке модели классификации CNN (б3); CNN была предварительно обучена на 617 спектрах зарегистрированных ранее доброкачественных и злокачественных новообразований [243]; Результатом анализа является решение о вероятной принадлежности новообразования к определенной группе (б4)

Предложенная методика «оптической биопсии» с оценкой спектров Рамановского рассеяния тканей кожи на примере клинического анализа подозрительных новообразований демонстрирует применимость для неинвазивного определения злокачественности новообразований. В отличие от осмотра невооруженным глазом специалистов-медиков, «оптическая биопсия» на основе анализа спектров Рамановского рассеяния дает возможность значительно сократить время постановки диагноза. Несмотря на то, что клинический путь пациента был проделан и измерен во время глобальной пандемии, общее время от исследования новообразования в местной клинике до гистопатологического диагноза в специализированном онкологическом центре занимает в общей сложности несколько месяцев (как показано на текущем примере в условиях российских клиник). В случае агрессивных злокачественных новообразований такие

временные задержки могут иметь решающее значение для пациента, поскольку опухоль может начать распространять метастазы в случае отсутствия адекватного лечения. Напротив, оптическая биопсия, основанная на оценке спектральных характеристик тканей, может обеспечить надежный диагноз за пару минут.

В качестве альтернативы анализу невооруженным глазом (при проведении первичного осмотра врачами общей практики) в настоящее время в клиниках широко используются методы компьютерной диагностики (CAD), основанные на дерматоскопии и спектроскопии [188], а также визуальный осмотр с дерматоскопическим анализом [22]. Такие исследования демонстрируют, что дерматоскопия и системы CAD могут повысить точность классификации новообразований. Однако точность визуального осмотра и дерматоскопического анализа сильно зависит от опыта специалиста [22], в то время как доказательная база в настоящее время слишком скудна, чтобы понять, влияют ли результаты CAD-системы на принятие различных клинических решений на практике [188]. Напротив, предлагаемый подход к проведению «оптической биопсии» кожных новообразований полностью автоматизирован, и его применимость была продемонстрирована на довольно большом исследовании с когортой из 617 кожных новообразований.

В целом, требуется провести одновременный анализ дерматоскопии, анализа невооруженным глазом и Рамановскую «оптическую биопсию» кожных новообразований в будущих исследованиях, чтобы полностью оценить возможности предлагаемой техники «оптической биопсии» по сравнению с визуальным осмотром и дерматоскопическим анализом. В частности, в исследовании Menzies et al. (изученные новообразования $n = 2430$, ММ $n = 382$), чувствительность и специфичность 90%, 81%, 85% и 62%; и 59%, 60%, 36%, 63% были получены для экспертов, дерматологов, стажеров и врачей общей практики, соответственно [189]. Предлагаемый подход для фиксированной чувствительности 90%, 81%, 85%, 62% обеспечивал специфичность 84%, 90%, 91%, 97% (при разделении злокачественных и доброкачественных новообразований) и обеспечивал 79%, 89%, 86%, 95% специфичность (при разделении ММ и SK). Таким образом, предлагаемая портативная спектроскопическая система дает возможность классифицировать новообразования кожи со средней точностью, превышающей точность врачей общей практики и стажеров, и с сопоставимой или даже большей точностью квалифицированных дерматологов и экспертов. Тем не менее, довольно сложно сделать некоторые точные выводы, поскольку обсуждаемые исследования основаны на разных популяциях, разных устройствах и разных данных и моделях. Это также верно и для сравнения результатов с другими системами CAD.

Даже авторы Кокрановского обзора заявляют: «... доказательная база для отдельных CAD-систем слишком ограничена, чтобы делать выводы, которые могут быть предпочтительны для практики». На данный момент довольно сложно сравнивать производительность предлагаемой портативной спектроскопической системы и существующих CAD-систем из-за ограниченной доказательной базы для отдельных CAD-систем [188].

Однако предлагаемая система может быть более выгодной в клинических применениях, поскольку демонстрирует очень многообещающие значения требуемых значений коэффициентов биопсии [243]. Наилучшие значения коэффициентов биопсии для дифференциации злокачественных новообразований от доброкачественных и дифференциации меланомы от СК составляют всего 0,25: 1 и 0,30: 1 соответственно (при установленной чувствительности 90%). Коэффициенты биопсии при 99% чувствительности имеют значения всего 0,74: 1 и 1,46: 1 для злокачественных новообразований и доброкачественных новообразований, и меланом против разделения СК соответственно. Данные представленные в предыдущих главах [243] показывают, что полученные значения коэффициентов биопсии гораздо ниже по сравнению со значениями коэффициентов биопсии, диагностирующими меланому путем визуального осмотра опытных пользователей дерматоскопии (соотношение биопсии около 8: 1) и других медицинских работников (более 30: 1) [182-185]. Мультиспектральная визуализация рака кожи с помощью устройства MelaFind продемонстрировала значение коэффициента биопсии 10,8: 1 при оценке пигментных поражений в большом многоцентровом проспективном исследовании [186]. Важной особенностью предлагаемой системы является низкая стоимость, особенно по сравнению с Рамановскими системами с глубоким охлаждением. Кроме того, предлагаемую Рамановскую систему можно использовать в клинических условиях почти без обучения пользователей и без опыта внедрения систем CAD.

Хотя время получения спектра составляет 60 секунд для предлагаемого метода «оптической биопсии», предлагаемый анализ выполняется намного быстрее, чем исследование новообразования различными медицинскими специалистами, дерматоскопический анализ и гистопатологический анализ тканей. Кроме того, биопсия кожи с гистопатологическим исследованием – сложный процесс. Особенностью этого процесса является количество переменных, задействованных для достижения его цели, то есть постановки правильного и точного диагноза. С того момента, как дерматолог решает провести биопсию кожи до получения отчета о микроскопическом анализе, многие факторы могут помешать успешному лечению пациента [248]. Таким образом, оценка типа

новообразования на основе Рамановской спектроскопии может значительно сократить время, необходимое для диагностики подозрительных новообразований.

В итоге, согласно полученным результатам, такие портативные Рамановские системы могут быть использованы в приложениях массового скрининга для сокращения необходимого времени диагностики новообразований специалистами первого звена и врачами общей практики. Оценку типа новообразования можно произвести при минимальном обучении персонала работе со спектроскопическими приборами, так как анализ спектроскопических данных выполняется автоматически на основе баз данных, включающих ранее измеренные оптические свойства тканей кожи. Быстрая и точная оценка типа новообразования с помощью техники «оптической биопсии» может значительно сэкономить время пациента и уменьшить ненужное беспокойство пациента по поводу неопределенного диагноза. Однако необходимы дальнейшие многоцентровые исследования для оптимизации применения систем «оптической биопсии» в клинических условиях.

Выводы по главе

Использование предложенного мультимодального метода «оптической биопсии» кожи и многомерных классификаторов позволяет выявлять наличие онкологических патологий кожи (включая редкие заболевания как беспигментные меланомы и дермотафибросаркомы) и определять их тип с точностью более 80%. Точность классификации злокачественных и доброкачественных образований при этом достигает 89%.

6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАКОВЫХ ПАТОЛОГИЙ КОЖИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕЙРОСЕТЕВОГО АНАЛИЗА СПЕКТРАЛЬНЫХ ДАННЫХ «ОПТИЧЕСКОЙ БИОПСИИ»

6.1 Возможность использования нейронных сетей для анализа данных «оптической биопсии» кожи человека

В предыдущих главах была представлена система RS с портативным детектором, способным регистрировать слабый Рамановский сигнал от тканей кожи. Отношение сигнал/шум (SNR) для выделения Рамановских полос с помощью предлагаемой портативной системы имело среднее значение около 3, и его можно было рассматривать как достаточно среднее значение по сравнению с системами с глубоко охлаждаемыми детекторами, обеспечивающими высокий сигнал Рамановского рассеяния (и высокий уровень сигнал-шум) [31]. В предыдущих главах было продемонстрировано *in vivo* применение разработанной портативной системы в клинических исследованиях на когорте из 617 случаев новообразований кожи (615 пациентов, 70 меланом, 122 базальноклеточных карциномы, 12 плоскоклеточных карцином и 413 доброкачественных опухолей). В исследованиях участвовали пациенты, обследованные врачами общей практики в местных клиниках и направленные в специализированный онкологический диспансер с подозрением на рак кожи. Спектры классифицированы с помощью проекции на скрытые структуры и дискриминантного анализа (PLS-DA). Были достигнуты ROC AUC 0,75 (0,71-0,79; 95% CI), 0,69 (0,63-0,76; 95% CI) и 0,81 (0,74-0,87; 95% CI) для классификации: а) злокачественных и доброкачественных опухолей, б) меланомы и пигментных опухолей и в) меланомы и себорейного кератоза соответственно. Положительные и отрицательные прогностические значения варьировались в диапазоне от 20% до 52% и от 73% до 99% соответственно. Значение коэффициента биопсии варьировалось в диапазоне от 0,92: 1 до 4,08: 1 (при уровне чувствительности от 90% до 99%). Таким образом, точность автоматического анализа с помощью предлагаемой системы была выше, чем точность врачей общей практики и медицинских стажеров, и была сопоставима или ниже по сравнению с точностью обученных дерматологов [243].

Достигнутая точность дифференциации рака кожи была ниже (или сопоставима), с точность квалифицированных дерматологов, и ниже, чем точность анализа рака кожи с помощью глубоко охлаждаемых установок RS [108, 243]. Чтобы улучшить качество «оптической биопсии» на основе RS, можно использовать классификацию, основанную на применении нейронных сетей. Нейронные сети продемонстрировали большой потенциал в анализе спектральных данных, включая классификацию спектров комбинационного

рассеяния и AF [249, 250]. В то же время существует потребность в дальнейших исследованиях нейронных сетей, которые могут быть полезны при анализе зашумленных наборов спектральных данных комбинационного рассеяния. Несколько исследований продемонстрировали применение сверточных нейронных сетей (convolutional neural networks – CNN) для анализа зашумленных спектральных данных [251, 252], тогда как зашумленные наборы данных, содержащие спектральную информацию о раковых тканях, никогда не анализировались. В главе приводятся результаты и описывается производительность классификатора CNN для анализа данных «оптической биопсии» меланомы и других новообразований кожи. Анализ полученных спектроскопических данных проводился для совместной реализации RS и AF и различных диагностических задач. Также приводится сравнение точности классификатора на основе CNN с точностью стандартного анализа PLS-DA данных «оптической биопсии», а также с точностью медицинского персонала.

6.2 Известные подходы к реализации нейросетевых классификаторов в анализе новообразований

Представленная в данном разделе информация базируется на данных обзоров [253, 254]. Первым этапом диагностики злокачественного образования дерматологом является визуальный осмотр подозрительного участка кожи. Правильный диагноз важен из-за сходства некоторых типов поражений; кроме того, точность диагностики сильно коррелирует с профессиональным опытом врача [255]. Без дополнительной технической поддержки точность диагностики меланомы у дерматологов составляет 65-80% [256]. В подозрительных случаях визуальный осмотр дополняется дерматоскопическими изображениями, сделанными с помощью специальной увеличивающей камеры высокого разрешения. Во время записи регулируется освещение и используется фильтр для уменьшения отражений на коже, тем самым делая видимыми более глубокие слои кожи (часто за счет использования поляризационных фильтров). Благодаря этой технической поддержке точность диагностики кожных новообразований может быть увеличена еще на 4-9% [257]. Комбинация визуального осмотра и дерматоскопических изображений в конечном итоге приводит к абсолютной точности обнаружения меланомы дерматологами 75-84% [258, 259].

В течение некоторого времени проблема классификации кожных новообразований также оказалась в центре внимания сообщества машинного обучения. Автоматическая

классификация новообразований может как помочь врачам в их повседневной клинической практике, так и обеспечить быстрый и дешевый доступ к жизненно важным диагнозам даже за пределами больницы путем установки приложений на мобильные устройства [260, 261]. До 2016 года исследования в основном следовали классическому рабочему процессу машинного обучения: предварительная обработка, сегментация, извлечение признаков и классификация [261-263]. Однако требуется высокий уровень специальных знаний, особенно для извлечения функций, а выбор подходящих функций требует очень много машинного времени. Кроме того, ошибки и потеря информации на первых этапах обработки оптических данных очень сильно влияют на качество итоговой классификации. Например, плохой результат сегментации часто приводит к плохим результатам при извлечении признаков и, как следствие, к низкой точности классификации.

В 2016 году произошли значимые изменения в исследованиях методов классификации новообразований. Указание на это изменение можно найти в методах, представленных на Международном симпозиуме по биомедицинской визуализации (ISBI) в 2016 г. [264]. 25 команд-участниц не применяли традиционные стандартные методы машинного обучения; вместо этого все они использовали технику глубокого обучения: сверточные нейронные сети (CNN) [265].

CNN – это нейронные сети с определенной архитектурой, которые оказались очень мощными в таких областях, как, например, распознавание и классификация изображений [254]. Было продемонстрировано, что CNN распознают лица, объекты и дорожные знаки лучше, чем люди, и поэтому их можно найти в роботах и беспилотных автомобилях.

CNN – это контролируемый метод обучения, поэтому они обучаются с использованием данных, помеченных соответствующими классами. По сути, CNN изучают взаимосвязь между входными объектами и метками классов и состоят из двух компонентов: скрытых слоев, в которых извлекаются функции, и в конце обработки полностью связанных слоев, которые используются для фактической задачи классификации. В отличие от обычных нейронных сетей, скрытые слои CNN имеют определенную архитектуру. В обычных нейронных сетях каждый слой образован набором нейронов, и один нейрон слоя связан с каждым нейроном предыдущего слоя. Архитектура скрытых слоев в CNN немного отличается. Нейроны в слое не связаны со всеми нейронами предыдущего слоя; скорее, они связаны только с небольшим количеством нейронов. Это ограничение на локальные соединения и дополнительные уровни объединения, суммирующие выходы локальных нейронов в одно значение, приводят к инвариантным к трансляции функциям. Это

приводит к более простой процедуре обучения и меньшей сложности итоговой модели классификации.

С самых первых дней распознавания образов целью исследователей было заменить созданные вручную функции обучаемыми многослойными сетями, но, несмотря на его простоту, решение не было широко изучено до середины 1980-х годов [266, 267]. Как оказалось, многослойные архитектуры можно обучить простым стохастическим градиентным спуском. Пока модули являются относительно гладкими функциями своих входов и своих внутренних весов, можно вычислять градиенты, используя процедуру обратного распространения ошибки. Идея о том, что это можно сделать и что это работает, была независимо открыта несколькими разными группами в 1970-х и 1980-х годах [268-271].

Процедура обратного распространения ошибки для вычисления градиента целевой функции по отношению к весам многослойного стека модулей является не чем иным, как практическим применением правила цепочки для производных. Ключевым моментом является то, что производная (или градиент) цели по отношению к входу модуля может быть вычислена, работая в обратном направлении от градиента по отношению к выходу этого модуля (или входу последующего модуля) (рисунок 6.1). Уравнение обратного распространения может применяться многократно для распространения градиентов по всем модулям, начиная с выхода наверху (где сеть производит прогноз) до самого низа (где подается внешний вход). После того, как эти градиенты были вычислены, легко вычислить градиенты относительно весов каждого модуля.

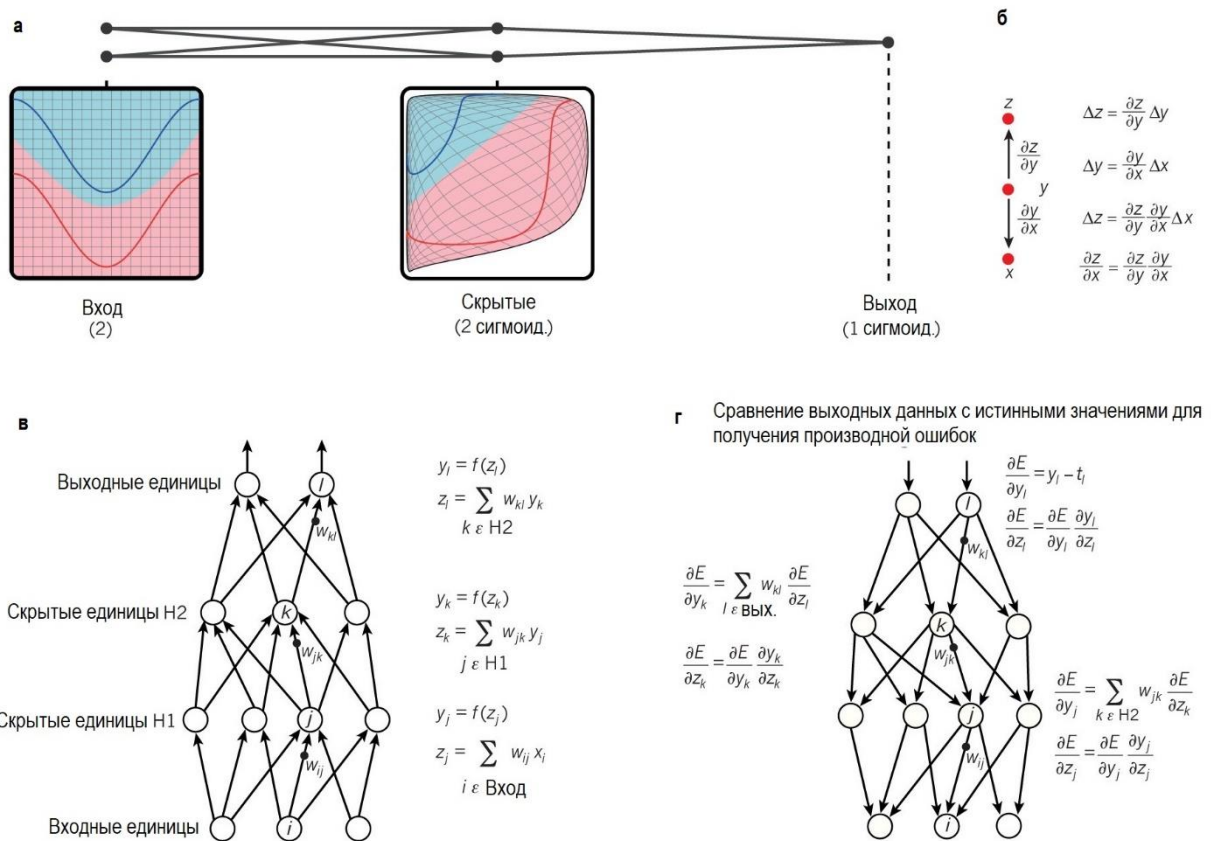


Рисунок 6.1 – а, Многослойная нейронная сеть (показанная соединенными точками) может исказить входное пространство, чтобы сделать классы данных (примеры которых находятся на красной и синей линиях) линейно разделяемыми. Обратите внимание, как обычная сетка (показанная слева) во входном пространстве также трансформируется (показывается на средней панели) скрытыми единицами. Это иллюстративный пример только с двумя модулями ввода, двумя скрытыми модулями и одним модулем вывода, но сети, используемые для распознавания объектов, содержат десятки или сотни тысяч единиц. б, Цепное правило производных говорит нам, как складываются два небольших эффекта (небольшое изменение x на y и y на z). Небольшое изменение Δx в x сначала преобразуется в небольшое изменение Δy в y путем умножения на $\frac{\partial y}{\partial x}$ (то есть определение частной производной). Точно так же изменение Δy создает изменение Δz в z . Подстановка одного уравнения в другое дает цепное правило производных - как Δx превращается в Δz посредством умножения на произведение $\frac{\partial y}{\partial x}$ и $\frac{\partial z}{\partial y}$. Это также работает, когда x , y и z - векторы (а производные - матрицы Якоби). с. Уравнения, используемые для вычисления прямого прохода в нейронной сети с двумя скрытыми слоями и одним выходным слоем, каждый из которых составляет модуль, через который можно распространять градиенты в обратном направлении. На каждом уровне сначала вычисляется общий вход z для каждой единицы, который является взвешенной суммой выходных данных единиц в слое ниже. Затем к z применяется нелинейная функция $f(\cdot)$,

чтобы получить выходной сигнал устройства. Для простоты были опущены условия смещения. Нелинейные функции, используемые в нейронных сетях, включают выпрямленную линейную единицу (ReLU) $f(z) = \max(0, z)$, обычно используемую в последние годы, а также более традиционные сигмоиды, такие как гиперболический тангенс, $f(z) = (\exp(z) - \exp(-z)) / (\exp(z) + \exp(-z))$ и логистическая функция logistic , $f(z) = 1 / (1 + \exp(-z))$. d, уравнения, используемые для вычисления обратного прохода. На каждом скрытом слое мы вычисляем производную ошибок по отношению к выходным данным каждого блока, которая представляет собой взвешенную сумму производных ошибок по отношению к общим входам для блоков в слое выше. Затем мы преобразуем производную ошибки по отношению к выходу в производную ошибки по отношению к входу, умножая ее на градиент $f'(z)$. На выходном уровне производная ошибки по отношению к выходу единицы вычисляется путем дифференцирования функции стоимости. Это дает $y_l - t_l$, если функция затрат для единицы l равна $0,5 (y_l - t_l)^2$, где t_l - целевое значение. Как только $\partial E / \partial z_k$ известно, производная по ошибке для веса w_{jk} на соединении от блока j в слое ниже будет просто $y_j \partial E / \partial z_k$ [254]

Первым крупным применением этого подхода к предварительному обучению было распознавание речи, что стало возможным благодаря появлению быстрых графических процессоров (GPU), которые были удобны для программирования [272] и позволили исследователям обучать сети в 10-20 раз быстрее. В 2009 году этот подход был использован для отображения коротких временных окон коэффициентов, извлеченных из звуковой волны, в набор вероятностей для различных фрагментов речи, которые могут быть представлены рамкой в центре окна. Он достиг рекордных результатов на стандартном тесте распознавания речи, который использовал небольшой словарный запас [273] и был быстро разработан, чтобы дать рекордные результаты в задаче с большим словарным запасом [274]. К 2012 году версии глубокой сети с 2009 года разрабатывались многими основными речевыми группами [275] и уже были развернуты на телефонах Android. Для небольших наборов данных неконтролируемое предварительное обучение помогает предотвратить переоснащение [276], что приводит к значительно лучшему обобщению, когда количество помеченных примеров мало, или в настройке передачи, где у нас есть много примеров для некоторых «исходных» задач, но очень мало для некоторых «целевых» задач. После реабилитации глубокого обучения выяснилось, что этап предварительного обучения нужен только для небольших наборов данных.

Однако был один конкретный тип глубокой сети с прямой связью, которую было намного легче обучить и обобщить гораздо лучше, чем сети с полной связью между соседними уровнями. Это была сверточная нейронная сеть (CNN) [277, 278]. Данный подход позволил достичь многих практических успехов в период, когда нейронные сети были в немилости, и недавно он был широко принят, например, сообществом компьютерного зрения. Кроме того, CNN стали широко использоваться и в других приложениях за счет своей относительной простоты.

CNN предназначены для обработки данных, которые поступают в виде нескольких массивов, например, цветного изображения, состоящего из трех 2D-массивов, содержащих интенсивности пикселей в трех цветовых каналах. Многие модальности данных имеют форму множественных массивов: 1D для сигналов и последовательностей, включая спектральные данные; 2D для изображений или аудио спектрограмм; и 3D для видео или объемных изображений. В основе CNN лежат четыре ключевые идеи, которые используют свойства естественных сигналов: локальные соединения, общие веса, объединение и использование множества уровней.

Архитектура типичной CNN (рисунок 6.2) структурирована в виде серии слоев. Первые несколько частей состоят из двух типов слоев: сверточных слоев и слоев объединения. Единицы сверточного слоя организованы в карты характеристик, в которых каждая единица связана с локальными участками на картах характеристик предыдущего слоя с помощью набора весов, называемого банком фильтров. Результат этой локальной взвешенной суммы затем передается через нелинейность, такую как ReLU. Все объекты на карте объектов имеют один и тот же банк фильтров. Для разных карт объектов в слое используются разные банки фильтров. Причина такой архитектуры двояка. Во-первых, в данных анализируемого массива, таких как изображения, локальные группы значений часто сильно коррелированы, образуя отличительные локальные мотивы, которые легко обнаруживаются. Во-вторых, локальная статистика изображений и других сигналов не зависит от местоположения. Другими словами, если мотив может появиться в одной части изображения, он может появиться где угодно, отсюда идея, что единицы в разных местах имеют одинаковый вес и обнаруживают один и тот же паттерн в разных частях массива. Математически операция фильтрации, выполняемая картой функций, представляет собой дискретную свертку, отсюда и название.

Самоед (16); Папильон (5,7); Померанский шпиц (2,7); Арктическая лиса (1,0); Эскимосская собака (0,6); Полярный волк (0,4); Сибирский хаски (0,4)

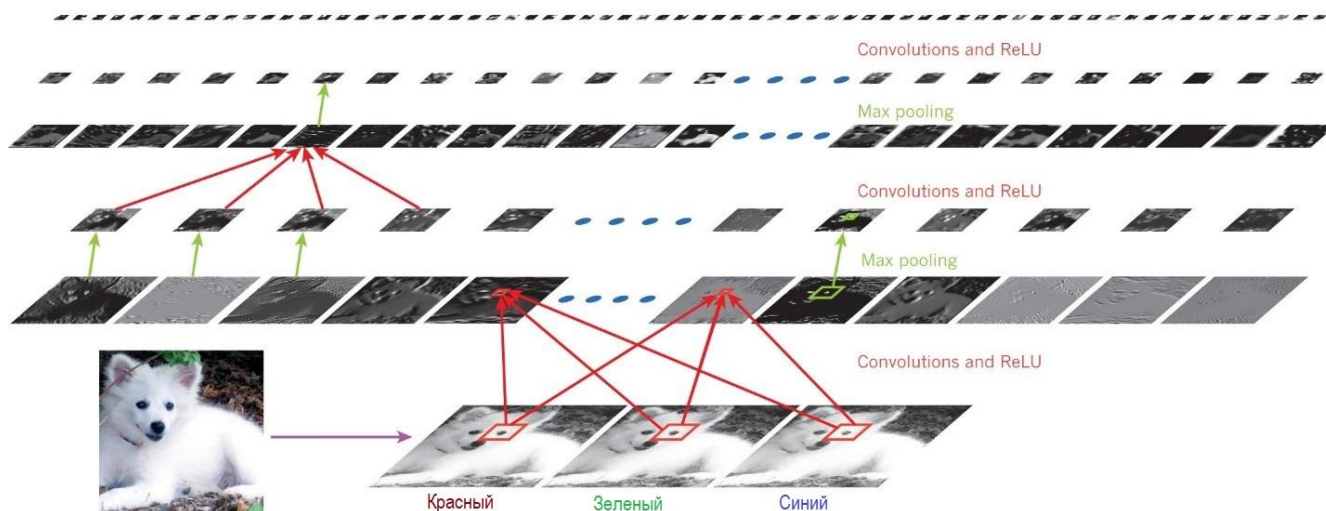


Рисунок 6.2 – Выходные данные (не фильтры) каждого слоя (по горизонтали) типичной архитектуры сверточной сети, примененные к изображению собаки-самоеда (внизу слева; и входы RGB (красный, зеленый, синий), внизу справа). Каждое прямоугольное изображение – это карта характеристик, соответствующая выходным данным для одной из изученных функций, обнаруженных в каждой из позиций изображения. Информация течет снизу вверх, при этом функции нижнего уровня действуют как ориентированные детекторы границ, и оценка вычисляется для каждого класса изображений на выходе.

ReLU, выпрямленный линейный блок [254]

Хотя роль сверточного слоя заключается в обнаружении локальных конъюнкций признаков из предыдущего слоя, роль объединяющего слоя состоит в том, чтобы объединить семантически похожие признаки в один. Поскольку относительные положения элементов, образующих паттерн, могут несколько отличаться, надежное обнаружение паттерна может быть выполнено путем грубого определения положения каждого элемента. Типичная единица объединения вычисляет максимум локального участка единиц на одной карте признаков (или в нескольких картах признаков). Соседние блоки объединения принимают входные данные из патчей, сдвинутых более чем на одну строку или столбец, тем самым уменьшая размерность представления и создавая инвариантность к небольшим сдвигам и искажениям. Два или три этапа свертки, нелинейности и объединения накладываются друг на друга, за которыми следуют более сверточные и полносвязные слои. Обратное распространение градиентов через CNN так же просто, как и через обычную глубокую сеть, что позволяет обучать все веса во всех банках фильтров.

Сверточные и объединяющие слои в CNN напрямую вдохновлены классическими представлениями о простых и сложных клетках в зрительной нейробиологии [279], а общая архитектура напоминает иерархию LGN – V1 – V2 – V4 – IT в вентральном пути зрительной коры [280]. Когда моделям CNN и обезьянам показываются одни и те же изображения, активация высокоуровневых единиц в CNN объясняет половину дисперсии случайных наборов из 160 нейронов в нижневисочной коре головного мозга обезьяны [281]. CNN берут свое начало в неокогнитроне [282], архитектура которого была в чем-то схожа, но не имела алгоритма сквозного обучения с учителем, такого как обратное распространение. Прimitивная 1D CNN, называемая нейронной сетью с временной задержкой, использовалась для распознавания фонем и простых слов [283, 284].

С начала 1990-х годов было множество применений сверточных сетей, начиная с нейронных сетей с временной задержкой для распознавания речи [283] и чтения документов [278]. Система чтения документов использовала CNN, обученную совместно с вероятностной моделью, которая реализовывала языковые ограничения. К концу 1990-х годов эта система считывала более 10% всех чеков в Соединенных Штатах. Позже Microsoft [285] развернула ряд систем оптического распознавания символов и рукописного ввода на основе CNN. С CNN также экспериментировали в начале 1990-х годов для обнаружения объектов на естественных изображениях, включая лица и руки [286, 287], а также для распознавания лиц людей [288].

В этом разделе представлены отдельные методы CNN, используемые для классификации новообразований кожи. CNN могут использоваться для классификации новообразований кожи двумя принципиально разными способами. С одной стороны, CNN, предварительно обученная на другом большом наборе данных, таком как ImageNet [289], может применяться как средство извлечения признаков. В этом случае классификация выполняется другим классификатором, например k-ближайшими соседями, машинами опорных векторов или искусственными нейронными сетями. С другой стороны, CNN может напрямую изучить взаимосвязь между необработанными данными и метками классов посредством сквозного обучения. В отличие от классического рабочего процесса, обычно применяемого в машинном обучении, извлечение признаков становится неотъемлемой частью классификации и больше не рассматривается как отдельный, независимый этап обработки. Если CNN обучается путем сквозного обучения, исследование можно дополнительно разделить на два разных подхода: изучение модели с нуля или перенос обучения. Обзор представленных методов CNN показан на рисунке 6.3.



Рисунок 6.3 – Обзор представленных методов сверточных нейронных сетей (CNN) и соответствующей категоризации [253]

Основным требованием для успешного обучения глубоких моделей CNN является наличие достаточного количества обучающих данных, помеченных классами. В противном случае существует риск переобучения нейронной сети и, как следствие, неадекватное свойство обобщения сети для неизвестных входных данных. Существует очень ограниченное количество общедоступных данных для классификации новообразований кожи. Почти все опубликованные методы используют наборы данных, которые содержат гораздо меньше 1000 объектов данных для обучения на класс обучения. Для сравнения, хорошо известные модели CNN для классификации изображений, такие как AlexNet [289], VGG [290], GoogLeNet [291] или ResNet [292], обучаются через большую базу данных изображений ImageNet и имеют более 1000 обучающих изображений для каждого класса.

Однако благодаря использованию специальной процедуры обучения, называемой трансферным обучением, для классификации также могут использоваться мощные модели CNN с несколькими миллионами свободных параметров, даже если для обучения доступен лишь небольшой объем данных. В этом случае CNN предварительно обучается с использованием очень большого набора данных, такого как ImageNet; затем он используется в качестве инициализации CNN для соответствующей задачи. В частности, последний полностью связанный уровень предварительно обученной модели CNN модифицируется в соответствии с количеством обучающих классов в реальной задаче классификации. Затем есть два варианта выбора весов предварительно обученной CNN: для

точной настройки всех слоев CNN или для замораживания некоторых передних слоев из-за проблем с переобучением и для точной настройки только некоторых задних слоев сети. Идея, лежащая в основе этого метода, заключается в том, что передние слои CNN содержат более общие функции (например, детекторы краев или цветных пятен), которые полезны для многих задач, но задние слои CNN становятся все более специфичными для классов, содержащихся в исходном наборе данных.

Поскольку общедоступные наборы данных ограничены, общий метод классификации новообразований кожи включает в себя трансферное обучение. Следовательно, все такие работы предварительно обучают CNN через набор данных ImageNet; затем весовые параметры CNN настраиваются на реальную задачу классификации.

Esteva с соавт. [293] представили значимую для CNN выделения новообразований кожи работу. Впервые модель CNN была обучена с большим объемом данных, а именно с 129 450 изображениями, из которых 3374 были получены с дерматоскопических устройств и представляли 2032 различных новообразования кожи. Были рассмотрены две проблемы бинарной классификации: карциномы кератиноцитов по сравнению с доброкачественным себорейным кератозом и злокачественные меланомы по сравнению с доброкачественными невусами. Последняя классификационная дифференциация проводилась как для клинических, так и для дерматоскопических изображений. Для классификации авторы использовали модель GoogLeNet Inception v3, которая была предварительно обучена с помощью большой базы данных изображений ImageNet. Затем модель CNN была настроена для классификации новообразований кожи с использованием трансферного обучения. Особым свойством этого подхода является использование новой древовидной систематики болезней, в которой отдельные болезни образуют листья дерева. Внутренние узлы группируют вместе отдельные заболевания, которые визуальны и клинически похожи. CNN не имеет двумерного вектора на выходе; вместо этого он сообщает о распределении вероятностей с более чем 757 обучающими классами. Чтобы определить вероятности более грубого класса поражения (так называемого внутреннего узла на более высоком уровне в дереве), вероятности дочерних узлов этого более грубого класса новообразования суммируются. Авторы показывают в рамках оценки, что CNN, обученная для более тонких классов, имеет лучшую производительность, чем CNN, которая была обучена для отдельных классов, представляющих интерес для проблемы. Обученная модель CNN классификации была протестирована с тестовыми данными, которые были полностью подтверждены биопсией и достигли ROC AUC 0,96 для карцином, ROC AUC 0,96 для

меланом и ROC AUC 0,94 для меланом, классифицированных исключительно с помощью дерматоскопических изображений.

Haenssle с соавт. [3] представили подход, очень похожий на Esteva с соавт. [26]. Модель GoogLeNet Inception v3 была адаптирована для классификации новообразований кожи с трансферным обучением, в результате чего веса были точно настроены на всех слоях. Анализ ограничивался дерматоскопическими изображениями меланомы в сравнении с доброкачественными невусами, и AUC ROC, достигнутый для этой задачи, составлял 0,86. Точное количество обучающих данных не было описано, и не все данные были подтверждены биопсией. Однако публикация включала наибольшее количество дерматологов на сегодняшний день ($n = 58$) и была первой, указавшей, что дополнительная клиническая информация улучшает чувствительность и специфичность анализа дерматологов.

Проблемой при сравнении методов классификации новообразований кожи является то, что рассматриваемые постановки задач в отдельных работах различаются, иногда незначительно. Это происходит не только для рассматриваемых обучающих классов и используемых данных, но и для представленных статистических величин. Кроме того, в некоторых работах используются закрытые архивы кожных клиник в дополнение к общедоступным архивам данных [255, 293]. Это еще больше затрудняет воспроизведение результатов. Другой важной задачей в этой области исследований является создание больших архивов публичных данных с биомедицинскими данными (включая изображения), максимально репрезентативными для населения мира [294]. Существующие архивы изображений в основном содержат поражения кожи светлокожих людей. Например, изображения в базе данных ISIC поступают в основном из США, Европы и Австралии. Улучшение качества классификации может быть достигнуто путем добавления клинических данных (например, возраста, пола, расы, типа кожи и анатомического расположения) в качестве входных данных для классификаторов. Эта дополнительная информация полезна для принятия решений дерматологами, как показывают Haenssle с соавт. [255].

CNN демонстрируют высокую эффективность как современные классификаторы кожных новообразований. К сожалению, сложно сравнивать различные методы классификации, потому что некоторые подходы используют закрытые наборы данных для обучения и / или тестирования, что затрудняет воспроизводимость достигнутых результатов.

6.3 Реализация CNN для анализа зашумленных данных "оптической биопсии" рака кожи человека

Детали исследованной когорты пациентов, а также детали состава портативной Рамановской системы были описаны в предыдущих главах. Исследования применения CNN анализа на спектральных данных «оптической биопсии» были выполнены на тех же данных, что были представлены в предыдущих разделах.

Как и в предыдущих главах, в данном разделе работы были проанализировали полные спектральные данные (содержащие данные RS и AF), поскольку ранее [243] не наблюдалось статистической разницы между анализом данных Рамановского рассеяния и объединенными данными Рамановского рассеяния и AF для тканей кожи человека. Диагностические задачи, использованные в тестах CNN классификатора, включали три дихотомических случая:

1. Дискриминация злокачественных (MM, BCC, SCC) и доброкачественных (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка) новообразований;
2. Дискриминация MM и доброкачественных пигментных новообразований кожи (NE + SK);
3. Дискриминация MM и SK.

В следующих разделах настоящей главы сравнивается производительность методов CNN и PLS-DA применительно к вышеуказанным задачам.

Архитектура нейросетевого классификатора данных «оптической биопсии» рака кожи

Каждый набор спектральных данных был разделен на обучающий набор (на котором обучается построенная модель – 80% спектрального набора данных) и тестовый набор (для оценки модели и ее дополнительного обучения – 20% спектрального набора данных). Для анализа каждой модели классификации в обучающем наборе была проведена повторная k-кратная перекрестная проверка. Эта перекрестная проверка проводилась для $k = 10$ по следующему алгоритму: 10% объектов в обучающей выборке исключаются из обучающей выборки, модель строится на основе оставшейся части данных. Затем возвращается исключенная часть объектов, спектры в обучающем наборе случайным образом

перемешиваются; цикл повторяется 10 раз, исключая оставшиеся части образца. К-кратная кросс-валидация при $k = 10$ выполняется по следующему алгоритму: 10 % выборок выбираются из анализируемого множества в качестве тестового блока, 90 % — в качестве обучающего блока. Модель строится на обучающем блоке и прогнозирует тестовый блок. Затем тестовый блок возвращается в анализируемый набор. Из анализируемого набора случайным образом выбираются остальные 10% образцов в качестве тестового блока. Образцы, выбранные в качестве тестового блока в одной итерации, не выбирались повторно в тестовый блок в последующих итерациях. Таким образом, цикл повторяется 10 раз. Итоговая характеристика модели рассчитывается как средняя по 10 блокам. Перекрестная проверка позволяет определить оптимальные параметры модели разделения классов, чтобы избежать переобучения.

Важно отметить, что корректная кросс-валидация результатов позволяет получить точные данные о возможностях успешного применения модели. Неправильная кросс-валидация часто приводит к переобучению, и как следствию невозможности использования предлагаемых моделей классификации в реальной медицинской практике. В опубликованных работах было показано несколько примеров некорректного обучения и переобучения как моделей PLS-DA так и моделей, использующих нейросетевые классификаторы. Пример корректного проведения кросс-валидации представлен в Приложении Б.

Решение поставленных классификационных задач с помощью глубокого обучения реализуется отдельными моделями CNN, каждая из которых соответствует отдельной задаче. Выбор архитектуры CNN для распознавания текущего набора Рамановских данных новообразований кожи состоял из последовательных этапов. На первом этапе были проанализированы проверенные конфигурации CNN и передовая практика глубокого обучения на основе CNN. Анализ опубликованных результатов показал, что перспективами распознавания спектров КР характеризуются следующие конфигурации CNN: простые последовательные CNN [295], CNN, содержащие модуль Inception [296], CNN с остаточными связями [252], ансамблевые CNN [297], CNN на основе комбинации сверточных слоев с рекуррентными слоями [298]. Следует отметить, что для распознавания спектров КР рекуррентные нейронные сети могут использоваться не только в сочетании с CNN, но и как самостоятельная модель. Например, Ю с соавт. [299] продемонстрировали применение рекуррентной сети на основе LSTM для анализа набора данных комбинационного рассеяния в задаче классификации морских патогенов. Использование рекуррентных сетей на основе LSTM также было продемонстрировано для распознавания

и классификации спектров SERS девяти клинически важных видов *Staphylococcus* [295] и для распознавания создания синтетических данных комбинационного рассеяния в задаче классификации раковой ткани [300]. Одной из особенностей использования искусственных нейронных сетей является необходимость эмпирического выбора топологии сети и оптимизации гиперпараметров под решаемую задачу. Поэтому затем была выполнена эмпирическая оптимизация топологии и гиперпараметров. В качестве меры успешности и критериев оценки тестируемых конфигураций CNN выступали: устойчивость модели, величина ошибки, точность классификации, наглядность распределения важности переменных. В качестве протокола оценки использовалась 10-кратная перекрестная проверка. Таким образом, в настоящей работе топология сети выбрана как сочетание остаточной одномерной сверточной базы, рекуррентного слоя и полносвязного уровня классификации. Остаточная одномерная сверточная база представляет собой ориентированный ациклический граф с двумя ветвями, одна из которых реализует остаточное соединение, другая представляет собой последовательное сочетание сверточных слоев, слоев объединения, сверточных слоев и слоев объединения. Каждая модель CNN организована как комбинация остаточной одномерной сверточной части (слоев), рекуррентного слоя и полносвязного слоя классификации. Сверточная часть представляет собой линейный стек из двух комбинаций сверточного слоя и объединяющего слоя. Сверточные слои изучают карты фильтров для различных типов шаблонов во входных данных. Слои объединения выделяют наиболее заметные (важные) структуры в анализируемых данных. Остаточная связь реализуется с использованием свертки входного тензора с окном свертки, равным 1, для линейного уменьшения размерности и добавления результирующего остаточного тензора к выходным признакам сверточной части. За сверточной частью следует рекуррентный слой, характеризующийся 64-мерностью выходного пространства, доля единиц, отбрасываемых при линейном преобразовании, равна 0,1. Функция потерь `binary_crossentropy` используется в качестве сигнала обратной связи для обучения тензоров весов слоев нейросети. CNN обучается с использованием алгоритма `adamax`. Количество эпох обучения определялось локальным минимумом функции потерь во время перекрестной проверки. Были использованы 110 эпох обучения в модели Malignant vs Benign, 70 эпох в модели MM vs NE + SK и 75 эпох в модели MM vs SK. CNN-анализ проводился с помощью пакета KERAS в программе R studio [295]. Информативность отдельных предикторов визуализируется с помощью пакета «vip» в составе программного обеспечения R studio [296]. Во избежание классификации по принципу «черного ящика» требуется объяснение модели и оценка вклада переменных в построенную модель. В настоящей работе использовался алгоритм вычисления важности

переменных на основе перестановок. Метод оценки важности переменных в построенной модели на основе перестановок используется в традиционном машинном обучении; перспективы его применения и его адаптация для анализа моделей глубокого обучения описаны в работах [301-303]. На рисунке 6.4 показана схематическая диаграмма предлагаемого подхода к анализу набора спектральных данных Рамановского рассеяния и соответствующих структурных особенностей с использованием предложенной архитектуры CNN.

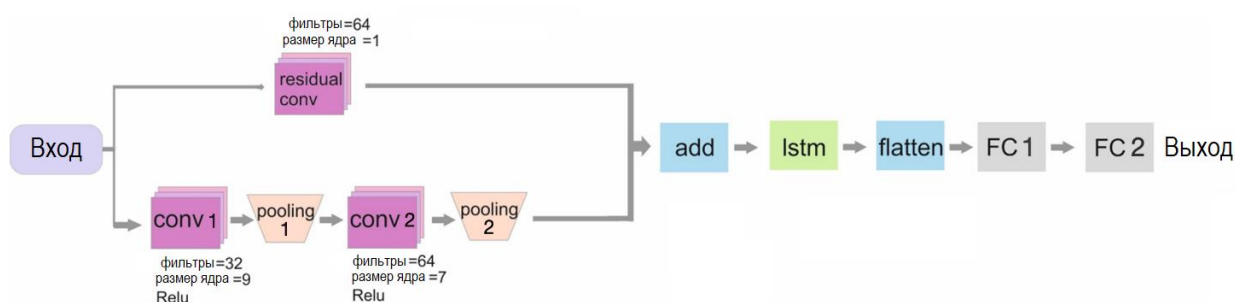


Рисунок 6.4 – Принципиальная схема архитектуры одномерной CNN для распознавания спектров Рамановского рассеяния и классификации тканей кожи, где: input – входной слой с выходной формой (912, 1); conv1 – одномерный сверточный слой с padding = "same" и формой вывода (912, 32); pooling1 – средний уровень объединения с pool_size = 2, strides = 2 и формой вывода (456, 32); conv2 – одномерный сверточный слой с padding = "same" и формой вывода (456, 64); pooling2 – средний уровень объединения с pool_size = 2, strides = 2 и формой вывода (228, 64); residual conv – одномерный сверточный слой с шагами = 4 и выходной формой (228, 64); add – это слой, который добавляет остаточный тензор и основание свертки в выходную форму (228,64); lstm – рекуррентный слой; flatten – это сжимающий слой; FC1 – это полностью связанный слой с единицами измерения = 16 и функцией активации Relu; FC2 – это полностью связанный слой с единицами измерения = 1 и функцией активации сигмоиды; (в скобках указывается размерность данных на каждом из слоев).

Таблица 6.1 демонстрирует достигнутые характеристики для моделей классификации, основанных на реализации PLS-DA и CNN. Применение CNN приводит к общему увеличению точности классификации злокачественных и доброкачественных опухолей кожи. Достигнутое улучшение ROC AUC для CNN является значительным ($p < 0,01$) по сравнению с реализацией PLS-DA для всех трех рассматриваемых задач. Для различения

злокачественных и доброкачественных новообразований достигнутая ROC AUC с использованием CNN классификатора достигает 0,96 (0,94-0,97; 95% CI). Для двух других задач классификации дихотомических случаев ROC AUC немного ниже. Таблица 6.2 демонстрирует точные значения специфичности, соотношения PPV, NPV и биопсии для фиксированных значений чувствительности в случаях анализа наборов спектральных данных PLS-DA и CNN. И снова CNN показывает лучшие показатели эффективности классификации по сравнению с PLS-DA. Значения соотношений PPV, NPV и биопсии, достигнутые с помощью CNN, превосходят аналогичные значения, полученные с помощью PLS-DA, почти во всех случаях (однако в некоторых случаях они демонстрируют почти одинаковые значения).

Таблица 6.1 – Классификация тканей кожи для трех диагностических задач: 1) злокачественные (MM, BCC, SCC) и доброкачественные (DF, PP, HE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка); 2) MM против NE + SK; 3) и MM vs SK – с классификаторами PLS-DA и CNN.

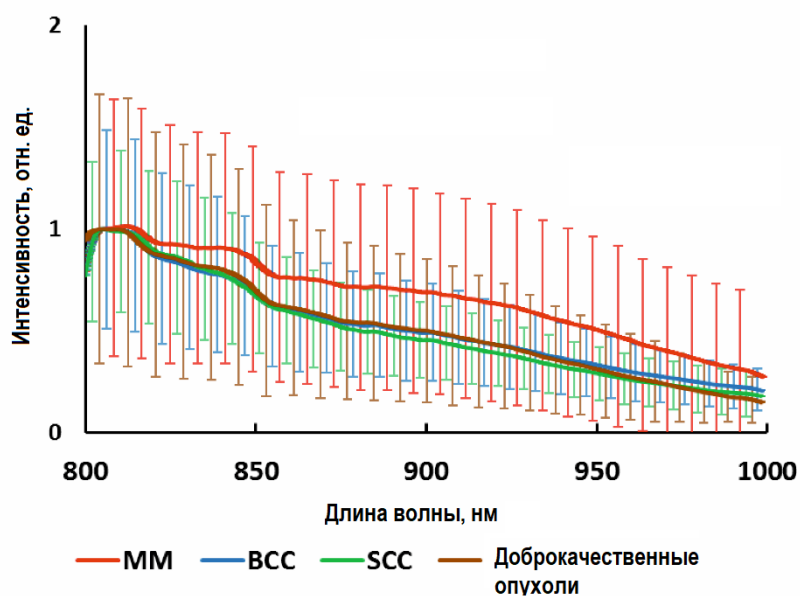
Задача классификации	ROC AUC (95% CI)	
	PLS-DA	CNN
Злокачественные (n = 204) vs доброкачественные новообразования (n = 413)	0.75 (0.71 – 0.79)	0.96 (0.94 – 0.97)
MM (n = 70) vs NE+SK (n = 283)	0.66 (0.59 – 0.74)	0.90 (0.85 – 0.94)
MM (n = 70) vs SK (n = 113)	0.81 (0.74 – 0.87)	0.92 (0.87 – 0.97)

Таблица 6.2 – Сводка диагностических параметров, полученных из ROC в соответствии с различными уровнями чувствительности при распознавании рака кожи (PPV, отношение истинно-положительных результатов к общему количеству истинно-положительных и ложноположительных результатов; NPV, отношение истинно-отрицательных результатов к общему количеству истинно-отрицательных результатов, «коэффициент биопсии» (Biopsy ratio), количество отрицательных биопсий, проводимых для каждой истинно положительной биопсии, показывающей рак кожи).

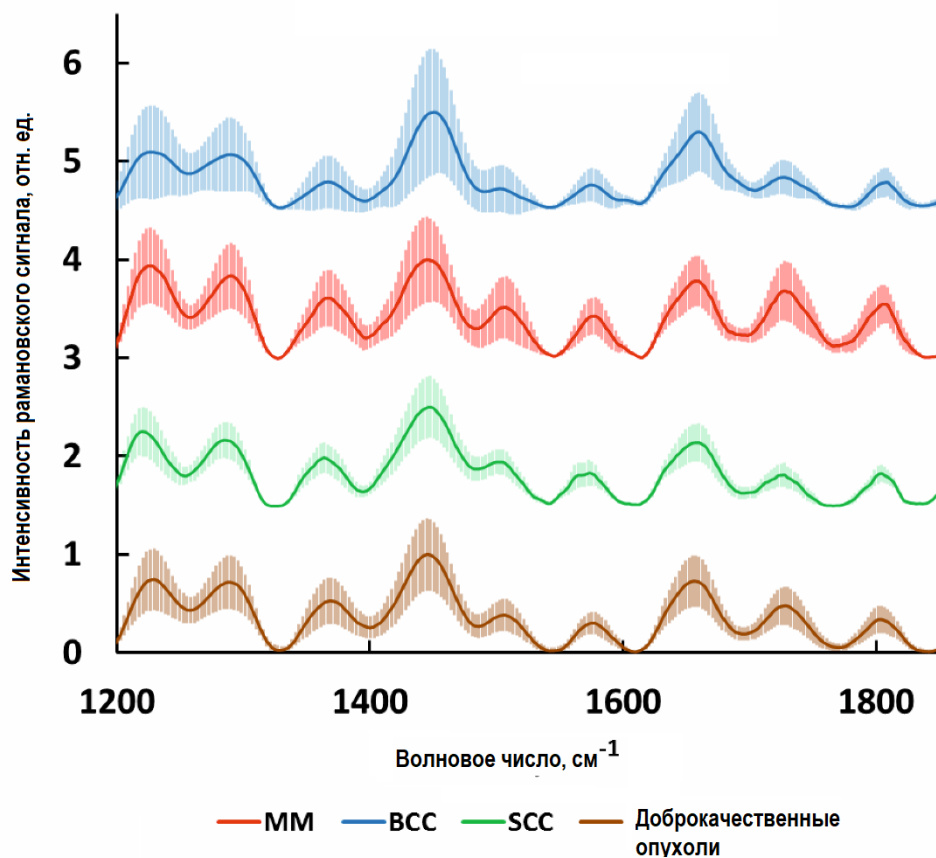
Задача классификации	Чувствительность (95% CI)	Специфичность (95% CI)	PPV	NPV	Biopsy ratio
PLS-DA					
Malignant (n = 204) vs benign neoplasms (n = 413)	0.99 (0.97 – 1.00)	0.03 (0.01 – 0.08)	0.34	0.86	1.98:1
	0.95 (0.91 – 0.98)	0.14 (0.06 – 0.30)	0.35	0.85	1.84:1
	0.90 (0.85 – 0.96)	0.32 (0.15 – 0.45)	0.40	0.85	1.53:1
MM (n = 70) vs NE+SK (n = 283)	0.99 (0.91 – 1.00)	0.06 (0.04 – 0.11)	0.21	0.96	3.84:1
	0.95 (0.89 – 1.00)	0.10 (0.04 – 0.29)	0.21	0.89	3.82:1
	0.90 (0.79 – 0.96)	0.26 (0.10 – 0.41)	0.23	0.89	3.32:1
MM (n = 70) vs SK (n = 113)	0.99 (0.93 – 1.00)	0.13 (0.07 – 0.29)	0.41	0.96	1.41:1
	0.95 (0.87 – 1.00)	0.27 (0.210 – 0.45)	0.45	0.90	1.23:1
	0.90 (0.80 – 0.97)	0.40 (0.25 – 0.66)	0.48	0.87	1.08:1
CNN					
Злокачественные (n = 204) vs доброкачественные новообразования (n = 413)	0.99 (0.97 – 1.00)	0.64 (0.26 – 0.78)	0.58	0.99	0.74:1
	0.95 (0.91 – 0.98)	0.80 (0.73 – 0.88)	0.71	0.97	0.42:1
	0.90 (0.85 – 0.94)	0.89 (0.82 – 0.94)	0.80	0.94	0.25:1
MM (n = 70) vs NE+SK (n = 283)	0.99 (0.91 – 1.00)	0.10 (0.06 – 0.50)	0.21	0.97	3.69:1
	0.95 (0.89 – 1.00)	0.50 (0.26 – 0.68)	0.32	0.97	2.12:1
	0.90 (0.79 – 0.96)	0.65 (0.48 – 0.87)	0.39	0.96	1.59:1
MM (n = 70) vs SK (n = 113)	0.99 (0.93 – 1.00)	0.11 (0.05 – 0.20)	0.41	0.94	1.46:1
	0.95 (0.87 – 1.00)	0.19 (0.07 – 0.89)	0.42	0.86	1.38:1
	0.90 (0.80 – 0.97)	0.83 (0.17 – 0.97)	0.77	0.93	0.30:1

На рисунке 6.5а показаны примеры необработанных зарегистрированных спектров (содержащих как RS-, так и AF-сигналы), а на рисунке 6.5б показан извлеченный сигнал Рамановского рассеяния. Интересно, что AF кожных тканей, стимулированных лазером с длиной волны 785 нм, представляет собой нелинейную убывающую функцию, тогда как сигнал Рамановского рассеяния низкой интенсивности представляет собой набор отдельных небольших полос, объединенных в более широкие пики. Из-за сложного биохимического состава кожных тканей точное определение хромофоров довольно сложно, и для классификации кожных тканей простой анализ отдельных пиков AF или полос Рамановского рассеяния неэффективен [31]. Поэтому для анализа зарегистрированных спектров использовались подходы PLS-DA и CNN. На рисунках 6.5в, 6.5г и 6.5д показаны графики VIP-распределений для всех построенных моделей PLS-DA и CNN. В случае PLS-DA VIP-распределение представляет собой взвешенную сумму нагрузок и просто выделяет все спектральные характеристики из всех нагрузок, полученных в модели классификации. Рисунок 6.5в показывает, что в случае PLS-DA, VIP-распределения используют данные из узких полос в областях 1125-1185, 1437-1470 и 1645-1681 cm^{-1} (связанных со спектрами Рамановского рассеяния), в то время как в низких диапазонах длин волн (300-1000 cm^{-1}), PLS-DA фиксирует только сигнал автофлуоресценции. PLS VIP используют данные, основанные на кривизне широких полос AF в анализируемых спектрах. VIP-распределения смешанных спектров Рамановского рассеяния и автофлуоресценции, проанализированные в данном исследовании, представляют собой комбинацию свойств RS и AF, где узкие низкоинтенсивные рамановские полосы маскируются широкими высокоинтенсивными пиками автофлуоресценции. Для анализа пигментных новообразований (MM по сравнению с пигментными доброкачественными и MM по сравнению с SK) сильная AF доминирует над слабыми полосами рамановского рассеяния, а анализ PLS-DA использует в основном широкие пики AF. Важно отметить, что для всех задач классификации PLS-DA использует от 1 до 4 принципиальных компонент (ПК). Нагрузки полученных ПК для каждой построенной модели выделяют наиболее информативные спектральные полосы, которые могут быть полезны при классификации тканей кожи. VIP-распределения CNN также выделяют наиболее информативные диапазоны, которые обеспечивают лучшую производительность для полученного классификатора. Можно видеть, что CNN использует больше рамановских полос в анализе по сравнению с PLS-DA. Для злокачественных и доброкачественных новообразований дифференциация CNN не только использует информацию из полос в области 1000-1800 cm^{-1} , но также информацию из полос в области

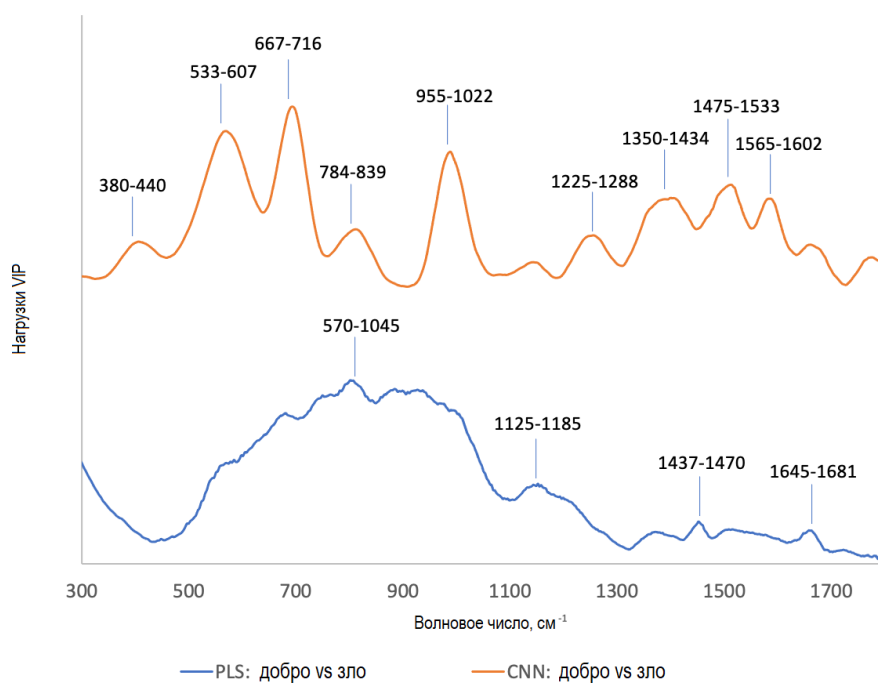
380-1000 cm^{-1} . Чтобы различать ММ и пигментные новообразования, CNN использует точные позиции полос рамановского рассеяния вместо широкой информации AF. PLS VIP выделяют наиболее информативные полосы рамановского рассеяния около 1450 и 1650 cm^{-1} и в основном используют информацию из области, где доминирует AF - около 470-1050 cm^{-1} для различения злокачественных и доброкачественных новообразований. Чтобы различать ММ и пигментные новообразования (NE + SK), PLS-DA использует полосы около 1300 и 1650 cm^{-1} и около 570, 720 и 1000 cm^{-1} для распознавания ММ и SK. Однако в случае дискриминации ММ и SK на упомянутые полосы сильно влияет высокий сигнал AF.



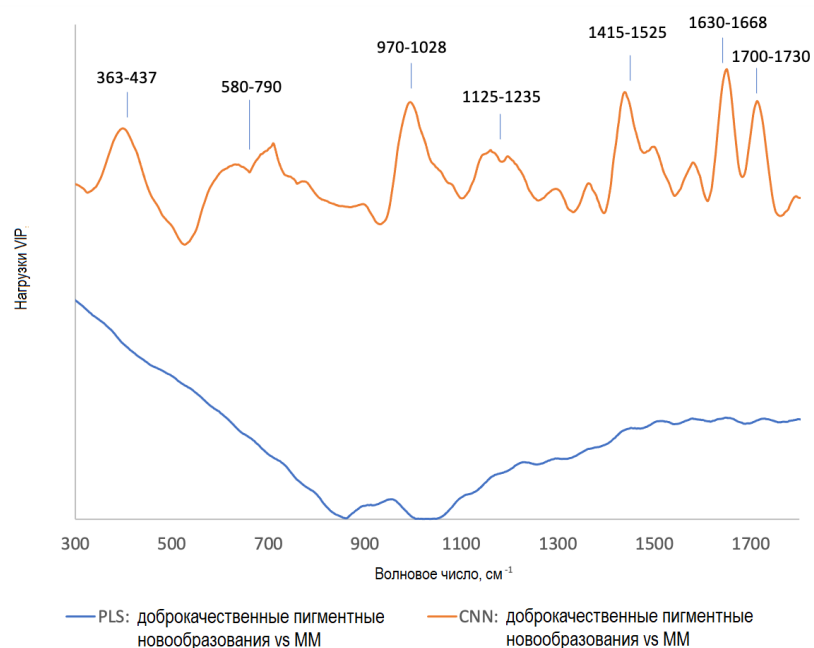
а



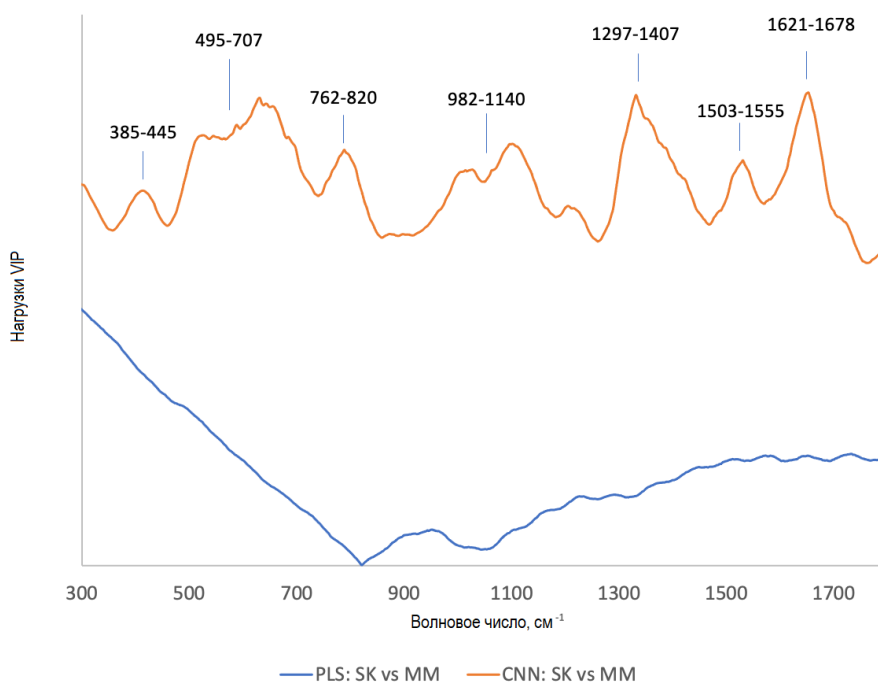
б



в



Г



Д

Рисунок 6.5 – Средние значения и стандартное отклонение для: (а) необработанных зарегистрированных спектров (RS + AF) и (б) выделенного Рамановского сигнала тканей кожи, стимулированных лазером с длиной волны 785 нм; VIP-распределения для моделей классификации: (в) злокачественные vs доброкачественные, (г) MM vs пигментные образования (NE + SK), (д) MM vs SK.

Применение CNN для анализа зашумленных Рамановских спектров приводит к повышению производительности рассматриваемой портативной Рамановской установки. Значения ROC AUC увеличились на 0,11-0,24 при различении ММ по сравнению с СК и ММ по сравнению с пигментными новообразованиями соответственно; значение требуемого количества проводимых биопсий (коэффициента биопсий – biopsy ratio) снизилось с 1,53: 1 до 0,25: 1 в случае классификации злокачественных и доброкачественных новообразований. Таким образом, CNN-анализ демонстрирует более высокую эффективность по сравнению с PLS-DA.

Более того, применение CNN для анализа зашумленных спектров Рамановского рассеяния приводит к более точной оценке экспериментальных данных по сравнению с PLS-DA. Рисунок 6.5 демонстрирует, что полученные VIP-распределения при использовании CNN-классификатора используют информацию из полос Рамановского рассеяния как в области низких волновых чисел (до 1000 см^{-1}), так и в области высоких волновых чисел (более 1000 см^{-1}). Рисунки 6.5г и 6.5д демонстрируют, что анализ PLS-DA использует информацию от широкого сигнала АФ для различения пигментированных новообразований. Только в случае распознавания злокачественных и доброкачественных новообразований PLS-DA может использовать данные Рамановского рассеяния. Напротив, CNN помогает отслеживать и анализировать полосы Рамановского рассеяния по всем спектрам для всех трех обсуждаемых задач классификации. Обычно зашумленные спектры Рамановского рассеяния оказываются очень слабоинтенсивными на фоне сигнала АФ, который маскирует низкоинтенсивные полосы Рамановского рассеяния. Поэтому анализ PLS-DA может использовать в основном только особенности АФ из регистрируемых спектров. В то же время CNN предоставляет возможность анализировать компоненты АФ и Рамановского рассеяния для более точной классификации новообразований кожи. Важно отметить, что Рамановский сигнал принципиально выделяется от фонового АФ-сигнала с помощью различных математических методов [31, 177]. Однако в некоторых случаях сигнал АФ несет важную информацию для классификации тканей кожи, и его устранение влияет на точность классификации [130]. Обсуждаемый алгоритм CNN-анализа спектральных данных кожи не требует очистки записанных спектров сигнала АФ и автоматически использует информацию как из Рамановской, так и из АФ частей спектров. Эта функция делает CNN-анализ спектральных данных Рамановского рассеяния многообещающим инструментом, обеспечивающим более высокую точность анализа данных «оптической биопсии».

Если попытаться сравнить точность CNN-спектрального анализа зашумленных Рамановских спектров с точностью других оптических подходов к классификации новообразований кожи, можно увидеть, что предлагаемый подход выглядит более удачным во многих аспектах. Например, применение Рамановских систем с глубоким охлаждением обеспечивает ROC AUC 0,91 (0,89-0,93; 95% CI) [187] для различения доброкачественных и злокачественных опухолей с помощью PLS-DA, в то время как предлагаемый подход помогает достичь ROC AUC 0,96 (0,94 - 0,97; 95% CI). Полученные значения ROC AUC демонстрируют, что даже портативные Рамановские системы могут конкурировать с рамановскими системами с высоким отношением сигнал/шум (с детекторами с глубоким охлаждением), когда спектральные данные анализируются с помощью CNN. Следует обратить внимание, что Zhao с соавторами [187] продемонстрировали дальнейшее увеличение значений ROC AUC в анализе рака кожи с применением Рамановских систем, добавив в анализ демографические данные пациентов. Такие данные также могут быть добавлены к анализу CNN для повышения эффективности обнаружения рака кожи при применении «оптической биопсии».

Коэффициент биопсии (biopsy ratio) для различения злокачественных и доброкачественных новообразований и между MM и SK, продемонстрированные CNN, составляют всего 0,25: 1 и 0,30: 1 соответственно. Проведенное исследование показало, что коэффициенты биопсии довольно низкие по сравнению с коэффициентами биопсии при диагностике меланомы путем визуального осмотра опытными пользователями дерматоскопии (коэффициент биопсии около 8: 1) и другими медицинскими работниками (коэффициент биопсии более 30: 1) [182-185]. Мультиспектральная визуализация рака кожи с помощью устройства MelaFind продемонстрировала коэффициент биопсии 10,8: 1 при оценке пигментных поражений в большом многоцентровом проспективном исследовании [186]. Представляемые результаты были дополнительно сравнены с методами компьютерной диагностики (CAD) на основе дерматоскопии и спектроскопии. Кокрановский обзор [188] приложений CAD-систем для диагностики рака кожи у взрослых пациентов продемонстрировал среднюю чувствительность 90% (84% - 94%; 95% CI) со средней специфичностью 74% (64% - 83%; 95% CI) для систем CAD на основе дерматоскопии, где значение коэффициента биопсии составляло 1,14: 1. Для систем CAD на основе спектроскопии средняя чувствительность составляла 93% (84% - 97%; 95% CI), а средняя специфичность составляла 44% (25% - 65%; 95% CI) с коэффициентом биопсии 2,42: 1. Значения чувствительности и специфичности, продемонстрированные CAD-системами, немного ниже, чем соответствующие значения в настоящем исследовании,

однако коэффициенты биопсии в случае внедрения CNN значительно лучше, чем коэффициенты биопсии, полученные с помощью существующих САД-систем. Недавние Рамановские исследования пигментных поражений кожи *in vivo* показали соотношение биопсии 4,1:1 со 100% чувствительностью [304], однако в этом обзоре было изучено только 7 меланом.

Дальнейшие исследования могут сравнить полученные результаты с точностью анализа, выполненного специалистами-медиками. Анализ PLS-DA для фиксированной чувствительности 90%, 85%, 81%, 62% обеспечил специфичность 32%, 51%, 58%, 77% при различении злокачественных и доброкачественных новообразований и 40%, 60%, 64%, 82% специфичность в различении ММ и СК. Таким образом, PLS-DA может классифицировать новообразования кожи со средней точностью, превышающей точность, предоставляемую терапевтами и стажерами, и с сопоставимой или более низкой точностью по сравнению с обученными дерматологами и экспертами (на основе данных, опубликованных в Кокрановском обзоре [22]) [243]. CNN обеспечивает значительно ($p < 0,01$) более высокие значения полученных специфичностей для тех же значений чувствительности: 89%, 94%, 97%, 100% в случае дискриминации злокачественных и доброкачественных новообразований и 83%, 89%, 95%, 100% в случае дискриминации ММ и СК. Таким образом, использование CNN для анализа зашумленных спектров Рамановского рассеяния помогает повысить чувствительность и специфичность обнаружения опухолей кожи.

На рисунке 6.6 показаны полученные кривые ROC для использования CNN при классификации злокачественных и доброкачественных опухолей, а также кривые ROC, полученные в различных исследованиях, и точность выявления опухолей кожи медицинскими специалистами. Представленные результаты показывают, что анализ зашумленных Рамановских спектров на основе CNN может поставлять ROC AUC, которые превосходят или, по крайней мере, равны результатам, демонстрируемым медицинскими специалистами. Более того, предложенный CNN-анализ спектральных данных Рамановского рассеяния даже превосходит подходы, основанные на CNN-анализе оптических изображений опухолей кожи. В исследовании Haenssle с соавторами [305] алгоритм CNN классифицировал 60 случаев доброкачественных новообразований (30 NE, 10 SK, 10 солнечных лентиг, 5 ангиом, 5 дерматофибром) по сравнению с 40 случаями злокачественных и предзлокачественных новообразований (15 ММ, 10 ВСС, 5 SCC, 5 актинических кератоз, 5 болезнь Боуэна). Все 100 случаев включали пигментные / непигментированные и меланоцитарные/немеланоцитарные новообразования кожи. Подход CNN для анализа изображений опухолей кожи продемонстрировал

чувствительность, специфичность и ROC AUC 95% (84–99%; 95% CI), 77% (65–86%; 95% CI) и 0,92 (0,87–0,97; 95% CI) соответственно. Кроме того, исследование Haenssle с соавторами представляет результаты классификации опухолей кожи, полученные от 96 обученных дерматологов с разным опытом (новички, опытные, эксперты). Дерматологов попросили указать свой дихотомический диагноз (злокачественный / предраковый или доброкачественный диагноз) на основании дерматоскопического изображения новообразования. Средняя чувствительность дерматологов составила 89% (87-91%; 95% CI), а специфичность - 81% (79-83%; 95% CI). Все указанные точности диагностики представлены в графическом виде на рисунке 3.

Для результатов сертифицированных дерматологов (смотри рисунок 6.6) данные были взяты из исследования Esteva с соавторами [293]. Средняя диагностическая чувствительность и специфичность 21 сертифицированного дерматолога для классификации 71 злокачественной опухоли и 40 доброкачественных опухолей составила 71% (66-76%; 95% CI) и 81% (77-86%; 95% CI) соответственно. Сводный график ROC для оценки визуального осмотра при личном осмотре, основанный на диагностике, проведенной обученными дерматологами из различных клинических исследований, был взят из Кокрановского обзора [306]. Используя данные, представленные на рисунке 3, предлагаемый подход на основе CNN к анализу спектров Рамановского рассеяния новообразований демонстрирует более высокие показатели эффективности, чем у дерматологов в целом. Таким образом, после обширных испытаний такой подход может быть реализован в клинической практике как альтернатива имеющимся методам выявления злокачественных новообразований кожи человека.

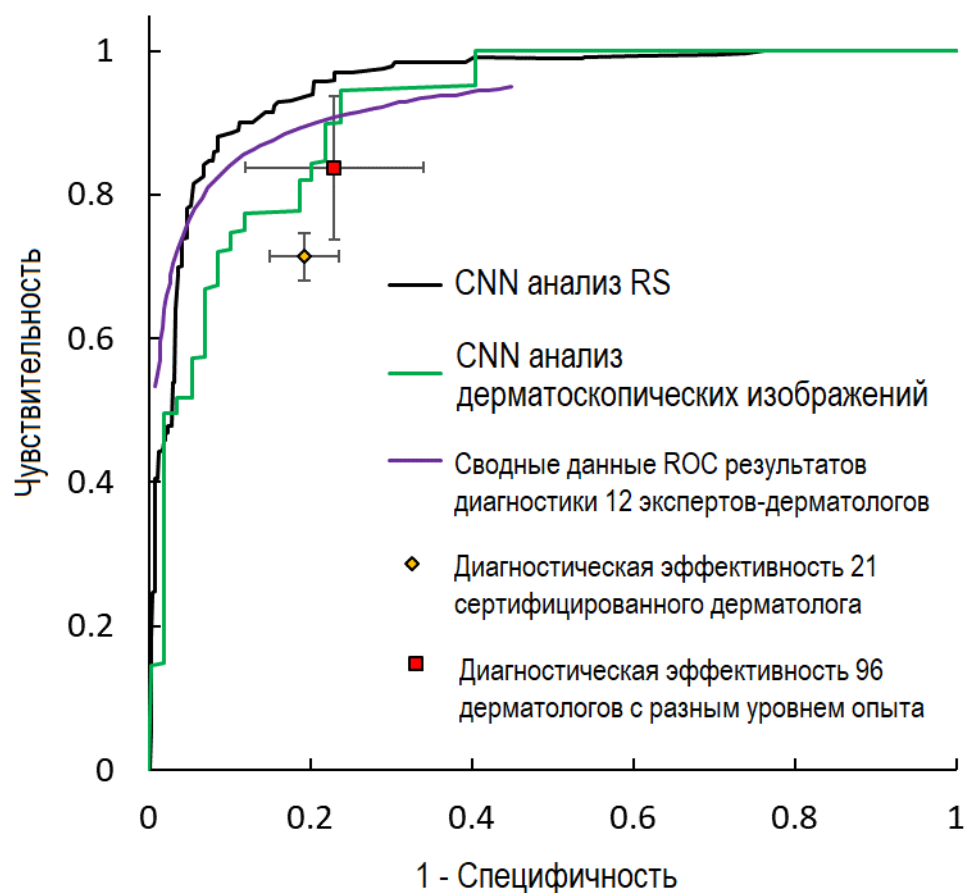


Рисунок 6.6 – Кривые ROC и диагностические характеристики различных медицинских специалистов и предлагаемый CNN-анализ спектров Рамановского рассеяния с ROC AUC 0,96 (0,94 - 0,97; 95% CI); CNN-анализ дерматоскопических изображений, выполненный в работе [305], для классификации 60 случаев доброкачественных новообразований по сравнению с 40 случаями злокачественных и предраковых новообразований с ROC AUC 0,918 (0,866–0,970; 95% CI); сводные данные ROC результатов диагностики 12 экспертов-дерматологов, представленные в Кокрановском обзоре [306]. Диагностическая эффективность 21 сертифицированного дерматолога для классификации 71 злокачественного и 40 доброкачественных новообразований была представлена в работе [293]. Диагностическая эффективность 96 дерматологов с разным уровнем опыта: 17 новичков (<2 лет опыта), 29 квалифицированных (2-5 лет опыта) и 40 экспертов (> 5 лет опыта) представлена в работе [305].

Если далее сравнить достигнутые результаты с другими подходами к обнаружению рака на основе нейронных сетей, мы увидим, что большинство усилий в этой области было сосредоточено на анализе изображений опухолей. Было предложено множество подходов, чтобы составить конкуренцию дерматологам, и во многих случаях продемонстрированная

эффективность нейросетевых классификаторов превосходила медицинских специалистов [307, 308]. Некоторые из хорошо известных исследований показали, что ROC AUC для выявления рака кожи достигает значений от 0,91 до 0,96 [293] и 0,918 (0,866–0,970; 95% CI) [305]. В то же время нейросетевой анализ спектральных данных Рамановского рассеяния для классификации опухолей кожи также демонстрирует особенно высокую точность $94,2\% \pm 3,1\%$ (среднее \pm среднеквадратическое отклонение) для классификации тканей злокачественные vs доброкачественные + нормальная кожа [309]. Тем не менее, в отличие от настоящего исследования, Sigurdsson с соавт. использовали спектральные данные в диапазоне от 2000 до 3500 cm^{-1} и протестировали свой подход на наборе данных из 222 образцов (48 ВСС, 21 ММ, 89 образцов нормальной кожи, 23 NE, 23 SK). Возможное повышение диагностической эффективности может быть достигнуто за счет совместного анализа изображений опухоли кожи и спектрального отклика с гиперспектральными установками [310]. Однако эти установки являются дорогостоящими (при условии использования Рамановских модальностей) и требуют дальнейших исследований, чтобы доказать их применимость в классификации рака кожи. Другой возможностью повысить точность анализа классификации спектров Рамановского рассеяния на основе CNN является интерпретация ложных результатов классификации [305]. Поскольку предлагаемый алгоритм выделяет полосы Рамановского рассеяния, используемые в анализе, можно добавить или исключить определенные полосы из анализа и, возможно, достичь большей точности классификации. Этот подход следует проверить в будущих обширных клинических исследованиях.

В последние десятилетия применение CNN для обнаружения и скрининга рака значительно расширилось, поскольку существует необходимость анализа сложных биомедицинских данных. Такие приложения включали анализ изображений рака [311], оценку злокачественности лимфатических узлов [312], предсказание типа рака на основе экспрессии генов [313], предсказание выживания пациентов с раком [314] и многие другие приложения [307, 315-318]. Анализ последних публикаций, посвященных применению CNN для выявления и классификации рака, показал возможность значительно повысить точность проводимого анализа по сравнению со стандартными статистическими методами. Таким образом, неудивительно, что в случае анализа спектров комбинационного рассеяния CNN может превосходить стандартные подходы, такие как PLS-DA. CNN способна улавливать скрытые в сложной информации (в виде смешанных спектров RS и AF) признаки конкретных целевых групп и использовать эти данные для точной классификации различных групп (типов рака в рассматриваемой задаче). При этом особое внимание

следует уделить анализу полученных данных при классификации групп, чтобы избежать переоценки моделей и избежать использования шумов в моделях. В случае применения PLS-DA такую важную информацию можно найти в распределениях VIP, поскольку VIP представляет собой взвешенную сумму РС. В данном исследовании форма VIP полностью зависит от состава полос RS и пиков AF в зарегистрированной базе данных спектров, поэтому мы уверены, что построенные модели классификации не используют случайные шумы. В случае реализации CNN мы используем известный подход, основанный на оценках VIP с использованием подхода, специфичного для модели [296]. Такой подход помог нам добиться лучших результатов по сравнению с PLS-DA, поскольку VIP-анализ в CNN способен выделить очень слабые полосы Рамановского рассеяния, маскируемые мощным сигналом AF. Форма VIP еще раз демонстрирует (рисунок 6.5), что данные, используемые в модели классификации на основе CNN, основаны только на определенных спектральных диапазонах и не содержат случайных шумов. Таким образом, полученные результаты классификации CNN тканей кожи на основе анализа спектров комбинационного рассеяния являются надежными и стабильными и могут быть использованы в будущих клинических приложениях.

В итоге, согласно полученным результатам, обсуждаемые портативные Рамановские системы в сочетании с CNN-анализом могут применяться для обнаружения новообразований кожи с целью повышения точности предварительной и клинической диагностики. Предлагаемый метод демонстрирует лучшие или сопоставимые результаты по сравнению с результатами, полученными обученным медицинским персоналом. Дальнейшие исследования могут включать включение демографических данных пациентов в анализ [187] или применение более сложных нейросетей, включая ансамбли нейросетей [319]. Предлагаемые системы могут использоваться в клинических условиях для оценки тканей кожи, а результаты такого анализа могут быть добавлены к оценке морфологии новообразования, выполняемой во время дерматоскопического анализа или других анализов изображений опухоли. Однако предлагаемую систему следует оценить в крупномасштабных многоцентровых испытаниях, чтобы доказать ее применимость в клинических условиях или продемонстрировать совместную применимость дерматоскопического анализа (желательно дополненного анализом на основе нейронных сетей [307]) и портативных Рамановских систем.

Таким образом, в этом разделе продемонстрировано, что анализ CNN значительно превосходит основанную на PLS-DA классификацию шумных Рамановских сигналов опухолей кожи. Производительность классификации опухолей на основе применения CNN

с помощью предлагаемого портативного Рамановского устройства сравнима с точностью Рамановских устройств с детекторами с глубоким охлаждением. Точность автоматического анализа с помощью предлагаемого подхода на основе CNN выше, чем точность, обеспечиваемая терапевтами и стажерами, и сопоставима или выше, чем точность обученных дерматологов. Повышенная точность реализации CNN является результатом более точного (по сравнению с PLS-DA) учета низкоинтенсивных Рамановских полос на интенсивном фоне сигнала AF. Производительность классификации может быть дополнительно улучшена за счет использования более сложных нейросетевых алгоритмов анализа спектров Рамановского рассеяния (например, с ансамблями нейронных сетей [319]) или путем добавления дополнительной информации к анализу (например, демографические данные пациентов [187]). Другой важной особенностью предлагаемого подхода является то, что его можно легко комбинировать с другими оптическими методами анализа новообразований кожи, такими как системы на основе дерматоскопии. Кроме того, эти портативные Рамановские системы, дополненные CNN, могут быть использованы для анализа других заболеваний (например, контролировать диабет [175, 176] или почечную недостаточность [320]) и выявлять новообразования в других частях тела пациентов, включая легкие и бронхи, ткани печени, почек, мозга и др.

Выводы по главе

Использование классификаторов на основе сверточных нейронных сетей позволяет существенно (по сравнению с методом проекции на латентные структуры) увеличить точность дискриминации новообразований кожи человека. Продемонстрировано увеличение ROC AUC с 0,81 до 0,96, что является статистически значимым результатом ($p < 0,01$) для рассматриваемой выборки кожных новообразований из 617 образца. Предложенная архитектура нейросетевого классификатора состоит из трех типов слоев: рекуррентного, полно связного и сверточного.

Заключение

В результате проведённого диссертационного исследования решена крупная научная проблема, связанная с разработкой универсального подхода к осуществлению неинвазивной «оптической биопсии» кожи человека. В основе проведенных исследований лежит анализ Рамановского рассеяния и автофлуоресценции тканей кожи людей с новообразованиями, патологиями почек и здоровых индивидов. Высокоточная интерпретация и классификация спектральных данных осуществляется за счет применения нейронных сетей с глубоким обучением. Результаты проведенного исследования могут быть внедрены в практическое здравоохранение для неинвазивной и экспрессной диагностики социально значимых заболеваний. Применение предлагаемого подхода возможно в сочетании с другими методами анализа тканей кожи.

Основные результаты работы:

1. Предложен мультимодальный метод оптической диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований кожи человека, использующий комбинацию автофлуоресценции в видимой и ближней ИК области спектра и Рамановского сигнала в ближней ИК области спектра при зондировании тканей кожи излучением с длиной волны возбуждения 457 нм и 785 нм, позволяющий выявлять относительную концентрацию продуктов метаболизма липидов и протеинов, накапливающихся в тканях новообразований с течением жизнедеятельности человека;
2. Предложен метод оптического детектирования наличия патологий почек человека, использующий Рамановскую спектроскопию с длиной волны возбуждающего излучения 785 нм, и позволяющий устанавливать наличие патологий почек только при неинвазивном спектральном анализе тканей кожи предплечья человека.
3. Использование проекции на латентные структуры (projection on latent structures – PLS) при анализе Рамановских спектров биотканей с низким соотношением сигнал-шум, позволяет выявлять узкие спектральные полосы, соответствующие наличию конкретных групп химических соединений. При этом использование значимости переменных в проекции (variable importance in projection – VIP) позволяет установить, какие именно химические компоненты биоткани вносят значительный вклад в модели классификации заболеваний при анализе спектральных характеристик биотканей;
4. Замена интегральных спектральных оценок автофлуоресцентного сигнала для выявления наличия продуктов метаболизма липидов и протеинов в коже человека на

исследование формы Рамановского спектра позволяет увеличить точность выявления тканей кожи с относительно высоким содержанием конечных продуктов метаболизма на 10% и более;

5. Одновременное использование комбинации методов автофлуоресцентного анализа и Рамановской спектроскопии позволяет выявлять различные группы химических соединений в составе биотканей за счет селективного взаимодействия оптического излучения различного спектрального диапазона с компонентами исследуемой ткани. Такой подход позволяет обнаруживать большее количество химических соединений в исследуемой биоткани, и как следствие позволяет производить более точную диагностику рака кожи и болезней почек.

6. Использование мультимодального метода оптической биопсии кожи и нейросетевых классификаторов позволяет выявлять наличие онкологических патологий кожи (включая редкие заболевания как беспигментные меланомы и дермотафибросаркомы) и определять их тип с точностью более 80%. Точность классификации злокачественных и доброкачественных образований при этом достигает 89%;

7. Предложен метод выделения наиболее информативных спектральных полос в зашумленных данных оптической биопсии, полученных с использованием портативных спектрометров, который позволяет добиться значения ROC AUC равного 0.96 при выделении злокачественных и доброкачественных новообразований кожи за счет применения глубокого обучения в сверточных нейросетевых классификаторах, использующих сверточные, рекуррентные и полносвязные слои.

Список литературы

- 1 Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis //Annual review of physical chemistry. – 1996. – Т. 47. – №. 1. – С. 555-606.
- 2 Narayanamurthy V. et al. Skin cancer detection using non-invasive techniques //RSC advances. – 2018. – Т. 8. – №. 49. – С. 28095-28130.
- 3 Alfano R., Pu Y. Optical biopsy for cancer detection //Lasers for Medical Applications. – Woodhead Publishing, 2013. – С. 325-367.
- 4 American cancer society: Cancer facts and figures //Atlanta: American Cancer Society. – 2018. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html>.
- 5 Bray F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries //CA: a cancer journal for clinicians. – 2018. – Т. 68. – №. 6. – С. 394-424.
- 6 Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / под редакцией А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена. – Филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. – 250 с.
- 7 Balch C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification //Journal of clinical oncology. – 2009. – Т. 27. – №. 36. – С. 6199.
- 8 Eikje N. S., Aizawa K., Ozaki Y. Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours //Biotechnology annual review. – 2005. – Т. 11. – С. 191-225.
- 9 Youl P. H. et al. Diagnosing skin cancer in primary care: how do mainstream general practitioners compare with primary care skin cancer clinic doctors? //Medical Journal of Australia. – 2007. – Т. 187. – №. 4. – С. 215-220.
- 10 Ermakov A. V. Early diagnosis and prophylaxis for cutaneous melanoma //Oncosurgery. – 2013. – Т. 5. – №. 3. – С. 52-58.

- 11 White R. R. et al. Long-term survival in 2,505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis //Annals of surgery. – 2002. – T. 235. – №. 6. – C. 879.
- 12 Carli P. et al. Addition of dermoscopy to conventional naked-eye examination in melanoma screening: a randomized study //Journal of the American Academy of Dermatology. – 2004. – T. 50. – №. 5. – C. 683-689.
- 13 Vestergaard M. E. et al. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting //British Journal of Dermatology. – 2008. – T. 159. – №. 3. – C. 669-676.
- 14 U.S. Patent 6587711, 01.07.2003. Spectral polarizing tomographic dermatoscope // U.S. Patent 6587711. 2003. / Alfano R.R., Budansky Y., Luo J. Research Foundation of City University of New York.
- 15 Benvenuto-Andrade C. et al. Differences between polarized light dermoscopy and immersion contact dermoscopy for the evaluation of skin lesions //Archives of dermatology. – 2007. – T. 143. – №. 3. – C. 329-338.
- 16 Abbasi N. R. et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria //Jama. – 2004. – T. 292. – №. 22. – C. 2771-2776.
- 17 Walter F. M. et al. Using the 7-point checklist as a diagnostic aid for pigmented skin lesions in general practice: a diagnostic validation study //British Journal of General Practice. – 2013. – T. 63. – №. 610. – C. e345-e353.
- 18 Argenziano G. et al. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions: comparison of the ABCD rule of dermoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis //Archives of dermatology. – 1998. – T. 134. – №. 12. – C. 1563-1570.
- 19 Chen S. C. et al. A comparison of dermatologists' and primary care physicians' accuracy in diagnosing melanoma: a systematic review //Archives of dermatology. – 2001. – T. 137. – №. 12. – C. 1627-1634.

- 20 Papakonstantinou E. et al. Photodynamic therapy and skin cancer / Papakonstantinou E., Löhr F., Raap U. // *Dermatologic Surgery and Procedures*. – IntechOpen, 2017.
- 21 Fritsch C. et al. Photodynamic diagnosis and therapy in dermatology // *Skin Pharmacology and Physiology*. – 1998. – T. 11. – №. 6. – C. 358-373.
- 22 Dinnes J. et al. High-frequency ultrasound for diagnosing skin cancer in adults // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2018. – №. 12.
- 23 Moqadam S. M. et al. Cancer detection based on electrical impedance spectroscopy: A clinical study // *Journal of Electrical Bioimpedance*. – 2018. – T. 9. – №. 1. – C. 17-23.
- 24 Herman C., Cetingul M. P. Quantitative visualization and detection of skin cancer using dynamic thermal imaging // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. – 2011. – №. 51. – C. e2679.
- 25 Ulrich M., Lange-Asschenfeldt S., González S. In vivo reflectance confocal microscopy for early diagnosis of nonmelanoma skin cancer // *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*. – 2012. – T. 103. – №. 9. – C. 784-789.
- 26 Mogensen M. et al. OCT imaging of skin cancer and other dermatological diseases // *Journal of biophotonics*. – 2009. – T. 2. – №. 6-7. – C. 442-451.
- 27 Seidenari S. et al. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of melanoma: morphologic features and quantitative data for sensitive and specific non-invasive diagnostics // *PLoS One*. – 2013. – T. 8. – №. 7. – C. e70682.
- 28 Seidenari S. et al. Multiphoton laser microscopy and fluorescence lifetime imaging for the evaluation of the skin // *Dermatology Research and Practice*. – 2012. – T. 2012.
- 29 Gao W. et al. Medical images classification for skin cancer using quantitative image features with optical coherence tomography // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2016. – T. 9. – №. 02. – C. 1650003.
- 30 Raupov D. S. et al. Skin cancer texture analysis of OCT images based on Haralick, fractal dimension, Markov random field features, and the complex

- directional field features //Optics in Health Care and Biomedical Optics VII. – SPIE, 2016. – T. 10024. – C. 666-676.
- 31 Khristoforova Y. A. et al. Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by Raman and autofluorescence analysis //Journal of biophotonics. – 2019. – T. 12. – №. 4. – C. e201800400.
- 32 Cicchi R. et al. Combined fluorescence-Raman spectroscopic setup for the diagnosis of melanocytic lesions //Journal of Biophotonics. – 2014. – T. 7. – №. 1-2. – C. 86-95.
- 33 Calin M. A. et al. Optical techniques for the noninvasive diagnosis of skin cancer //Journal of cancer research and clinical oncology. – 2013. – T. 139. – №. 7. – C. 1083-1104.
- 34 John R. Ferraro, Nakamoto K., Chris W. Brown. Introductory Raman Spectroscopy. – Academic press, 1994. – 135 c.
- 35 Vo-Dinh T., Cullum B. Fluorescence spectroscopy for biomedical diagnostics //Biomedical photonics handbook. – CRC Press, 2003. – C. 739-788.
- 36 Wachsmann-Hogiu S., Weeks T., Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy—from single cells to humans //Current opinion in biotechnology. – 2009. – T. 20. – №. 1. – C. 63-73.
- 37 Liu W. et al. Laser-induced fluorescence: Progress and prospective for in vivo cancer diagnosis //Chinese Science Bulletin. – 2013. – T. 58. – №. 17. – C. 2003-2016.
- 38 Bodanese B. et al. Discrimination of basal cell carcinoma and melanoma from normal skin biopsies in vitro through Raman spectroscopy and principal component analysis //Photomedicine and laser surgery. – 2012. – T. 30. – №. 7. – C. 381-387.
- 39 Schleusener J. et al. In vivo study for the discrimination of cancerous and normal skin using fibre probe-based Raman spectroscopy //Experimental dermatology. – 2015. – T. 24. – №. 10. – C. 767-772.

- 40 Lim L. et al. Clinical study of noninvasive in vivo melanoma and nonmelanoma skin cancers using multimodal spectral diagnosis //Journal of biomedical optics. – 2014. – T. 19. – №. 11. – C. 117003.
- 41 Lieber C. A. et al. In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy //Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. – 2008. – T. 40. – №. 7. – C. 461-467.
- 42 Schut T. C. B. et al. Discriminating basal cell carcinoma from its surrounding tissue by Raman spectroscopy //Journal of investigative dermatology. – 2002. – T. 119. – №. 1. – C. 64-69.
- 43 Wang S. et al. In vivo near-infrared autofluorescence imaging of pigmented skin lesions: methods, technical improvements and preliminary clinical results //Skin Research and Technology. – 2013. – T. 19. – №. 1. – C. 20-26.
- 44 Zheng J. et al. Evaluation of surface-enhanced Raman scattering detection using a handheld and a bench-top Raman spectrometer: A comparative study //Talanta. – 2014. – T. 129. – C. 79-85.
- 45 Sahu A. et al. In vivo subsite classification and diagnosis of oral cancers using Raman spectroscopy //Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2016. – T. 9. – №. 05. – C. 1650017.
- 46 Bologna J., Schaffer J., Cerroni L. Dermatology, Section Eighteen: Neoplasms of the Skin. – 2017.
- 47 Jermyn M. et al. A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology //Physics in Medicine & Biology. – 2016. – T. 61. – №. 23. – C. R370.
- 48 Suhalim J. L. et al. The need for speed //Journal of biophotonics. – 2012. – T. 5. – №. 5-6. – C. 387-395.
- 49 Pence I., Mahadevan-Jansen A. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy //Chemical Society Reviews. – 2016. – T. 45. – №. 7. – C. 1958-1979.

- 50 Daniel A. et al. In-vivo study using Raman Spectroscopy to estimate the effect of fairness creams on skin //J. Dermat. Cosmetol. – 2018. – T. 2. – №. 5. – C. 57-59.
- 51 Gonzalez F. J. et al. Use of Raman spectroscopy for the early detection of filaggrin-related atopic dermatitis //Skin Research and Technology. – 2011. – T. 17. – №. 1. – C. 45-50.
- 52 Zhang J. et al. Accuracy of Raman spectroscopy for differentiating skin cancer from normal tissue //Medicine. – 2018. – T. 97. – №. 34.
- 53 Kourkoumelis N. et al. Advances in the in vivo Raman spectroscopy of malignant skin tumors using portable instrumentation //International journal of molecular sciences. – 2015. – T. 16. – №. 7. – C. 14554-14570.
- 54 Feng X. et al. Biophysical basis of skin cancer margin assessment using Raman spectroscopy //Biomedical optics express. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 104-118.
- 55 Silveira F. L. et al. Discrimination of non-melanoma skin lesions from non-tumor human skin tissues in vivo using Raman spectroscopy and multivariate statistics //Lasers in surgery and medicine. – 2015. – T. 47. – №. 1. – C. 6-16.
- 56 Shafer-Peltier K. E. et al. Raman microspectroscopic model of human breast tissue: implications for breast cancer diagnosis in vivo //Journal of Raman Spectroscopy. – 2002. – T. 33. – №. 7. – C. 552-563.
- 57 Wang J. et al. Development of a beveled fiber-optic confocal Raman probe for enhancing in vivo epithelial tissue Raman measurements at endoscopy //Optics letters. – 2013. – T. 38. – №. 13. – C. 2321-2323.
- 58 Wood J. J. et al. Evaluation of a confocal Raman probe for pathological diagnosis during colonoscopy //Colorectal Disease. – 2014. – T. 16. – №. 9. – C. 732-738.
- 59 Pezzotti G. et al. Raman spectroscopy of human skin: looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age //Journal of Biomedical Optics. – 2015. – T. 20. – №. 6. – C. 065008.

- 60 Zhang G. et al. In vivo comparative documentation of skin hydration by confocal Raman microscopy, SkinSensor, Skicon, and NovaMeter //Photonic Therapeutics and Diagnostics VI. – International Society for Optics and Photonics, 2010. – T. 7548. – C. 75480M.
- 61 Sieg A. Raman spectroscopy //Non Invasive Diagnostic Techniques in Clinical Dermatology. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. – C. 217-223.
- 62 Förster M. et al. //Eur J Dermatol. – 2011. – T. 21. – №. 6. – C. 851-63.
- 63 Kong K. et al. Raman spectroscopy for medical diagnostics—From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection //Advanced drug delivery reviews. – 2015. – T. 89. – C. 121-134.
- 64 Alfonso-García A. et al. Biological imaging with coherent Raman scattering microscopy: a tutorial //Journal of biomedical optics. – 2014. – T. 19. – №. 7. – C. 071407.
- 65 Freudiger C. W. et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy //Science. – 2008. – T. 322. – №. 5909. – C. 1857-1861.
- 66 Drutis D. M. et al. Three-dimensional chemical imaging of skin using stimulated Raman scattering microscopy //Journal of Biomedical Optics. – 2014. – T. 19. – №. 11. – C. 111604.
- 67 Wang H. et al. In vivo coherent Raman imaging of the melanomagenesis-associated pigment pheomelanin //Scientific reports. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 1-10.
- 68 Alfano R. et al. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue //IEEE Journal of Quantum Electronics. – 1984. – T. 20. – №. 12. – C. 1507-1511.
- 69 Mayne S. T. et al. Resonance Raman spectroscopic evaluation of skin carotenoids as a biomarker of carotenoid status for human studies //Archives of biochemistry and biophysics. – 2013. – T. 539. – №. 2. – C. 163-170.

- 70 Darvin M. E. et al. Non-invasive in vivo detection of the carotenoid antioxidant substance lycopene in the human skin using the resonance Raman spectroscopy //Laser Physics Letters. – 2006. – T. 3. – №. 9. – C. 460.
- 71 Liu C. et al. A pilot study for distinguishing basal cell carcinoma from normal human skin tissues using visible resonance Raman spectroscopy //Journal of Cancer Metastasis and Treatment. – 2019. – T. 5. – C. 4.
- 72 Schlücker S. Surface-Enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications //Angewandte Chemie International Edition. – 2014. – T. 53. – №. 19. – C. 4756-4795.
- 73 Shanthil M. et al. Ag@ SiO₂ core-shell nanostructures: distance-dependent plasmon coupling and SERS investigation //The journal of physical chemistry letters. – 2012. – T. 3. – №. 11. – C. 1459-1464.
- 74 Xie J. et al. The synthesis of SERS-active gold nanoflower tags for in vivo applications //ACS nano. – 2008. – T. 2. – №. 12. – C. 2473-2480.
- 75 Yuan H. et al. Gold nanostars: surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging //Nanotechnology. – 2012. – T. 23. – №. 7. – C. 075102.
- 76 Kang H. et al. Near-Infrared SERS Nanoprobes with Plasmonic Au/Ag Hollow-Shell Assemblies for In Vivo Multiplex Detection //Advanced Functional Materials. – 2013. – T. 23. – №. 30. – C. 3719-3727.
- 77 Stuart D. A. et al. In vivo glucose measurement by surface-enhanced Raman spectroscopy //Analytical chemistry. – 2006. – T. 78. – №. 20. – C. 7211-7215.
- 78 Qian X. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags //Nature biotechnology. – 2008. – T. 26. – №. 1. – C. 83-90.
- 79 Cinta Pinzaru S., Falamas A., Dehelean C. A. Molecular conformation changes along the malignancy revealed by optical nanosensors //Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2013. – T. 17. – №. 2. – C. 277-286.

- 80 Falamas A., Dehelean C. A., Pinzaru S. C. Monitoring of betulin nanoemulsion treatment and molecular changes in mouse skin cancer using surface enhanced Raman spectroscopy //Vibrational Spectroscopy. – 2018. – T. 95. – C. 44-50.
- 81 MacLeod N. A. et al. Prediction of sublayer depth in turbid media using spatially offset Raman spectroscopy //Analytical chemistry. – 2008. – T. 80. – №. 21. – C. 8146-8152.
- 82 Keller M. D. et al. Development of a spatially offset Raman spectroscopy probe for breast tumor surgical margin evaluation //Journal of biomedical optics. – 2011. – T. 16. – №. 7. – C. 077006.
- 83 Schulmerich M. V. et al. Noninvasive Raman tomographic imaging of canine bone tissue //Journal of biomedical optics. – 2008. – T. 13. – №. 2. – C. 020506.
- 84 Sowoidnich K. et al. Spatially offset Raman spectroscopy for photon migration studies in bones with different mineralization levels //Analyst. – 2017. – T. 142. – №. 17. – C. 3219-3226.
- 85 Matousek P., Stone N. Development of deep subsurface Raman spectroscopy for medical diagnosis and disease monitoring //Chemical Society Reviews. – 2016. – T. 45. – №. 7. – C. 1794-1802.
- 86 Yuen J. M. et al. Transcutaneous glucose sensing by surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy in a rat model //Analytical chemistry. – 2010. – T. 82. – №. 20. – C. 8382-8385.
- 87 Marcu L. Fluorescence lifetime techniques in medical applications //Annals of biomedical engineering. – 2012. – T. 40. – №. 2. – C. 304-331.
- 88 Bergholt M. S. et al. Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer //Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – T. 26. – №. 10. – C. 4104-4110.
- 89 Short M. A. et al. Using laser Raman spectroscopy to reduce false positives of autofluorescence bronchoscopies: a pilot study //Journal of Thoracic Oncology. – 2011. – T. 6. – №. 7. – C. 1206-1214.
- 90 Ashok P. C. et al. Multi-modal approach using Raman spectroscopy and optical coherence tomography for the discrimination of colonic adenocarcinoma from

normal colon //Biomedical optics express. – 2013. – T. 4. – №. 10. – C. 2179-2186.

- 91 Patil C. A. et al. A clinical instrument for combined raman spectroscopy-optical coherence tomography of skin cancers //Lasers in surgery and medicine. – 2011. – T. 43. – №. 2. – C. 143-151.
- 92 Khristoforova Y. A. et al. Optical diagnostics of malignant and benign skin neoplasms //Procedia engineering. – 2017. – T. 201. – C. 141-147.
- 93 Borisova E. G., Angelova L. P., Pavlova E. P. Endogenous and exogenous fluorescence skin cancer diagnostics for clinical applications //IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 2013. – T. 20. – №. 2. – C. 211-222.
- 94 Huang Z. et al. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin //Journal of biomedical optics. – 2004. – T. 9. – №. 6. – C. 1198-1205.
- 95 Li X., Wang D. Spectral analysis of lung cancer serum using fluorescence and Raman spectroscopy //Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues IV. – International Society for Optics and Photonics, 2006. – T. 6088. – C. 608809.
- 96 Li X. et al. Study of method and system for diagnosis of cancer using autofluorescence and Raman spectroscopy //2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference. – IEEE, 2006. – C. 5453-5456.
- 97 Jeong S. et al. Fluorescence-Raman dual modal endoscopic system for multiplexed molecular diagnostics //Scientific reports. – 2015. – T. 5. – №. 1. – C. 1-9.
- 98 Wang C. et al. Near infrared spectroscopy in optical coherence tomography //Journal of near infrared spectroscopy. – 2012. – T. 20. – №. 1. – C. 237-247.
- 99 Zakharov V. P. et al. Multimodal Optical Biopsy and Imaging of Skin Cancer //Neurophotonics and Biomedical Spectroscopy. – Elsevier, 2019. – C. 449-476.

- 100 Geladi P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2003. – T. 58. – №. 5. – C. 767-782.
- 101 Ralbovsky N. M., Lednev I. K. Raman spectroscopy and chemometrics: A potential universal method for diagnosing cancer //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2019. – T. 219. – C. 463-487.
- 102 Daniel A. et al. Raman mapping of oral tissues for cancer diagnosis //Journal of Raman Spectroscopy. – 2014. – T. 45. – №. 7. – C. 541-549.
- 103 Cals F. L. J. et al. Investigation of the potential of Raman spectroscopy for oral cancer detection in surgical margins //Laboratory Investigation. – 2015. – T. 95. – №. 10. – C. 1186-1196.
- 104 González-Solís J. L. et al. Cervical cancer detection based on serum sample Raman spectroscopy //Lasers in medical science. – 2014. – T. 29. – №. 3. – C. 979-985.
- 105 Barroso E. M. et al. Discrimination between oral cancer and healthy tissue based on water content determined by Raman spectroscopy //Analytical chemistry. – 2015. – T. 87. – №. 4. – C. 2419-2426.
- 106 Vanna R. et al. Label-free imaging and identification of typical cells of acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome by Raman microspectroscopy //Analyst. – 2015. – T. 140. – №. 4. – C. 1054-1064.
- 107 Zhao J. et al. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy //Applied spectroscopy. – 2007. – T. 61. – №. 11. – C. 1225-1232.
- 108 Lui H. et al. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis //Cancer research. – 2012. – T. 72. – №. 10. – C. 2491-2500.
- 109 Liu C. H. et al. Resonance Raman and Raman spectroscopy for breast cancer detection //Technology in cancer research & treatment. – 2013. – T. 12. – №. 4. – C. 371-382.
- 110 Zhou Y. et al. Human brain cancer studied by resonance Raman spectroscopy //Journal of biomedical optics. – 2012. – T. 17. – №. 11. – C. 116021.

- 111 Borisova E. et al. Diagnostics of pigmented skin tumors based on laser-induced autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy //Quantum Electronics. – 2008. – T. 38. – №. 6. – C. 597.
- 112 Pu Y. et al. Stokes shift spectroscopic analysis of multifluorophores for human cancer detection in breast and prostate tissues //Journal of biomedical optics. – 2013. – T. 18. – №. 1. – C. 017005.
- 113 Alfano R. R., Yang Y. Stokes shift emission spectroscopy of human tissue and key biomolecules //IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 2003. – T. 9. – №. 2. – C. 148-153.
- 114 Bergholt M. S. et al. Raman endoscopy for objective diagnosis of early cancer in the gastrointestinal system //J. Gastroint. Dig. Syst. S. – 2013. – T. 1. – C. 008.
- 115 Churmakov D. Y. et al. Analysis of skin tissues spatial fluorescence distribution by the Monte Carlo simulation //Journal of Physics D: Applied Physics. – 2003. – T. 36. – №. 14. – C. 1722.
- 116 Darvin M. E., Brandt N. N., Lademann J. Photobleaching as a method of increasing the accuracy in measuring carotenoid concentration in human skin by Raman spectroscopy //Optics and Spectroscopy. – 2010. – T. 109. – №. 2. – C. 205-210.
- 117 Wang H. et al. Improving skin Raman spectral quality by fluorescence photobleaching //Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2012. – T. 9. – №. 4. – C. 299-302.
- 118 Majumder S. K. et al. Comparison of autofluorescence, diffuse reflectance, and Raman spectroscopy for breast tissue discrimination //Journal of biomedical optics. – 2008. – T. 13. – №. 5. – C. 054009.
- 119 Tuchin V. V. Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis, 3rd ed. – SPIE Press, Bellingham, WA, 2015.
- 120 Baletic N. et al. Advantages and limitations of the autofluorescent diagnostics of the laryngeal cancer and precancerosis //European archives of oto-rhino-laryngology. – 2010. – T. 267. – №. 6. – C. 925-931.

- 121 Zakharov V. P. et al. Lung neoplasm diagnostics using Raman spectroscopy and autofluorescence analysis //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2015. – T. 1. – №. 1. – C. 70-76.
- 122 Zhang G., Demos S. G., Alfano R. R. Far-red and NIR spectral wing emission from tissues under 532 and 632 nm photo-excitation //Lasers in the life sciences. – 1999. – T. 9. – №. 1. – C. 1-16.
- 123 Alfano R. et al. Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues //IEEE Journal of Quantum Electronics. – 1987. – T. 23. – №. 10. – C. 1806-1811.
- 124 Sordillo L. A. et al. Optical spectral fingerprints of tissues from patients with different breast cancer histologies using a novel fluorescence spectroscopic device //Technology in cancer research & treatment. – 2013. – T. 12. – №. 5. – C. 455-461.
- 125 Pu Y. et al. Changes of collagen and nicotinamide adenine dinucleotide in human cancerous and normal prostate tissues studied using native fluorescence spectroscopy with selective excitation wavelength //Journal of biomedical optics. – 2010. – T. 15. – №. 4. – C. 047008.
- 126 Palmer S. et al. Optical redox ratio and endogenous porphyrins in the detection of urinary bladder cancer: A patient biopsy analysis //Journal of Biophotonics. – 2017. – T. 10. – №. 8. – C. 1062-1073.
- 127 Geddes C. D. (ed.). Reviews in Fluorescence 2016. – Springer International Publishing, 2017.
- 128 Bratchenko I. A. et al. Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions //Journal of Biomedical Optics. – 2017. – T. 22. – №. 2. – C. 027005.
- 129 Bratchenko I. A. et al. Malignant melanoma and basal cell carcinoma detection with 457 nm laser-induced fluorescence //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2015. – T. 1. – №. 3. – C. 180-185.

- 130 Khristoforova Y. A. et al. Method of autofluorescence diagnostics of skin neoplasms in the near infrared region //Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2015. – T. 1. – №. 3. – C. 186-192.
- 131 Novikov I. A., Grusha Y. O., Kiryshchenkova N. P. Autofluorescence diagnostics of skin and mucosal tumors //Annals of ophthalmology. – 2013. – T. 129. – №. 5. – C. 147-153.
- 132 Litvinova K. S. et al. Chronic hypoxia as a factor of enhanced autofluorescence of endogenous porphyrins in soft biological tissues //Saratov Fall Meeting 2009: International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics, and Biophotonics. – International Society for Optics and Photonics, 2010. – T. 7547. – C. 75470D.
- 133 Mycek M. A., Pogue B. W. (ed.). Handbook of biomedical fluorescence. – CRC Press, 2003.
- 134 König K. et al. The study of endogenous porphyrins in human skin and their potential for photodynamic therapy by laser induced fluorescence spectroscopy //Lasers in medical science. – 1993. – T. 8. – №. 2. – C. 127-132.
- 135 Pappas A. Epidermal surface lipids //Dermato-endocrinology. – 2009. – T. 1. – №. 2. – C. 72-76.
- 136 Fox D. L. Biochromy: natural coloration of living things. – Berkeley: University of California Press, 1979.
- 137 Seo I. et al. Fluorescence spectroscopy for endogenous porphyrins in human facial skin //Photonic Therapeutics and Diagnostics V. – SPIE, 2009. – T. 7161. – C. 10-15.
- 138 Shu M. et al. Porphyrin metabolisms in human skin commensal Propionibacterium acnes bacteria: potential application to monitor human radiation risk //Current medicinal chemistry. – 2013. – T. 20. – №. 4. – C. 562-568.
- 139 El-Sharabasy M. M. H. et al. Porphyrin metabolism in some malignant diseases //British journal of cancer. – 1992. – T. 65. – №. 3. – C. 409-412.

- 140 Feller L. et al. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face //Head & face medicine. – 2016. – T. 12. – №. 1. – C. 1-7.
- 141 Pravdin A. B. et al. Upper epidermis autofluorescence dynamics under laser UV irradiation //Cell and Biotissue Optics: Applications in Laser Diagnostics and Therapy. – International Society for Optics and Photonics, 1994. – T. 2100. – C. 233-236.
- 142 Liu C. et al. Characterization and discrimination of basal cell carcinoma and normal human skin tissues using resonance Raman spectroscopy //Laser Science. – Optical Society of America, 2017. – C. JTU2A. 72.
- 143 Zakharov V. P. et al. Comparative analysis of combined spectral and optical tomography methods for detection of skin and lung cancers //Journal of Biomedical Optics. – 2015. – T. 20. – №. 2. – C. 025003.
- 144 Zakharov V. P. et al. Two-step Raman spectroscopy method for tumor diagnosis //Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care IV. – International Society for Optics and Photonics, 2014. – T. 9129. – C. 91293V.
- 145 Zhao J. et al. Real-time Raman spectroscopy for automatic in vivo skin cancer detection: an independent validation //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2015. – T. 407. – №. 27. – C. 8373-8379.
- 146 Ringnér M. What is principal component analysis? //Nature biotechnology. – 2008. – T. 26. – №. 3. – C. 303-304.
- 147 Borisova E. et al. Light-induced autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy in clinical diagnosis of skin cancer //Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care IV. – International Society for Optics and Photonics, 2014. – T. 9129. – C. 91291O.
- 148 Suslick K. S. et al. The materials chemistry of porphyrins and metalloporphyrins //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2000. – T. 4. – №. 4. – C. 407-413.
- 149 Czamara K. et al. Raman spectroscopy of lipids: a review //Journal of Raman Spectroscopy. – 2015. – T. 46. – №. 1. – C. 4-20.

- 150 Currie E. et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer //Cell metabolism. – 2013. – Т. 18. – №. 2. – С. 153-161.
- 151 Altose M. D. et al. Comparing protein–ligand interactions in solution and single crystals by Raman spectroscopy //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – Т. 98. – №. 6. – С. 3006-3011.
- 152 Gromski P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding //Analytica chimica acta. – 2015. – Т. 879. – С. 10-23.
- 153 Wang J. et al. Development of a hybrid Raman spectroscopy and optical coherence tomography technique for real-time in vivo tissue measurements //Optics Letters. – 2016. – Т. 41. – №. 13. – С. 3045-3048.
- 154 Lu G., Fei B. Medical hyperspectral imaging: a review //Journal of biomedical optics. – 2014. – Т. 19. – №. 1. – С. 010901.
- 155 ГОСТ Р 8.759-2011. Национальный стандарт Российской Федерации. Измерение энергетической освещенности и энергетической экспозиции ультрафиолетового излучения в фотобиологии. – М.: Стандартинформ, 2019. – 10 с.
- 156 ГОСТ ИЕС 60825-1-2013. Межгосударственный стандарт. Безопасность лазерной аппаратуры. – М.: Стандартинформ, 2014. – 83 с.
- 157 Wang S. et al. Monte Carlo simulation of in vivo Raman spectral Measurements of human skin with a multi-layered tissue optical model //Journal of biophotonics. – 2014. – Т. 7. – №. 9. – С. 703-712.
- 158 Kucheryavskiy S. Multivariate Data Analysis for Chemometrics //R Packag. Version 0.9. – 2018. – Т. 1.
- 159 Zeng H. et al. Raman spectroscopy for in vivo tissue analysis and diagnosis, from instrument development to clinical applications //Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2008. – Т. 1. – №. 01. – С. 95-106.
- 160 Zhao J. et al. Real-time Raman spectroscopy for noninvasive in vivo skin analysis and diagnosis //New developments in biomedical engineering. – 2010. – Т. 24. – С. 455-474.

- 161 Haaland D. M., Thomas E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information //Analytical chemistry. – 1988. – T. 60. – №. 11. – C. 1193-1202.
- 162 Chong I. G., Jun C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present //Chemometrics and intelligent laboratory systems. – 2005. – T. 78. – №. 1-2. – C. 103-112.
- 163 Hanley J. A., McNeil B. J. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases //Radiology. – 1983. – T. 148. – №. 3. – C. 839-843.
- 164 Mahadevan-Jansen A., Richards-Kortum R. R. Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers //Journal of biomedical optics. – 1996. – T. 1. – №. 1. – C. 31-70.
- 165 Bergholt M. S. et al. Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer //Biosensors and Bioelectronics. – 2011. – T. 26. – №. 10. – C. 4104-4110.
- 166 del Rosal B., Benayas A. Strategies to overcome autofluorescence in nanoprobe-driven in vivo fluorescence imaging //Small Methods. – 2018. – T. 2. – №. 9. – C. 1800075.
- 167 Zakharov V. P. et al. Combined autofluorescence and Raman spectroscopy method for skin tumor detection in visible and near infrared regions //European Conference on Biomedical Optics. – Optical Society of America, 2015. – C. 95372H.
- 168 Silveira L. et al. Discriminating model for diagnosis of basal cell carcinoma and melanoma in vitro based on the Raman spectra of selected biochemicals //Journal of biomedical optics. – 2012. – T. 17. – №. 7. – C. 077003.
- 169 Feng X. et al. Raman biophysical markers in skin cancer diagnosis //Journal of Biomedical Optics. – 2018. – T. 23. – №. 5. – C. 057002.
- 170 Tfayli A. et al. In vivo analysis of tissue by Raman microprobe: examination of human skin lesions and esophagus Barrett's mucosa on an animal model

- //Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry.
– SPIE, 2006. – T. 6093. – C. 259-268.
- 171 Uzquiano M. C. et al. Metastatic basal cell carcinoma exhibits reduced actin expression //Modern Pathology. – 2008. – T. 21. – №. 5. – C. 540-543.
- 172 Feng X. et al. Raman active components of skin cancer //Biomedical optics express. – 2017. – T. 8. – №. 6. – C. 2835-2850.
- 173 Bratchenko I. A. et al. Fluorescence spectroscopy for neoplasms control //Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care V. – SPIE, 2016. – T. 9887. – C. 46-54.
- 174 Pence I. J. et al. Discrimination of liver malignancies with 1064 nm dispersive Raman spectroscopy //Biomedical optics express. – 2015. – T. 6. – №. 8. – C. 2724-2737.
- 175 Guevara E. et al. Use of Raman spectroscopy to screen diabetes mellitus with machine learning tools //Biomedical Optics Express. – 2018. – T. 9. – №. 10. – C. 4998-5010.
- 176 Paolillo F. R. et al. Noninvasive assessments of skin glycated proteins by fluorescence and Raman techniques in diabetics and nondiabetics //Journal of biophotonics. – 2019. – T. 12. – №. 1. – C. e201800162.
- 177 Zhao J. et al. Wavenumber selection based analysis in Raman spectroscopy improves skin cancer diagnostic specificity //Analyst. – 2016. – T. 141. – №. 3. – C. 1034-1043.
- 178 Chong I. G., Jun C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present //Chemometrics and intelligent laboratory systems. – 2005. – T. 78. – №. 1-2. – C. 103-112.
- 179 Robin X. et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves //BMC bioinformatics. – 2011. – T. 12. – №. 1. – C. 1-8.
- 180 Hanley J. A., McNeil B. J. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases //Radiology. – 1983. – T. 148. – №. 3. – C. 839-843.

- 181 Wang S. et al. In vivo near-infrared autofluorescence imaging of pigmented skin lesions: methods, technical improvements and preliminary clinical results //Skin Research and Technology. – 2013. – T. 19. – №. 1. – C. 20-26.
- 182 Heibel H. D., Hooey L., Cockerell C. J. A review of noninvasive techniques for skin cancer detection in dermatology //American Journal of Clinical Dermatology. – 2020. – T. 21. – №. 4. – C. 513-524.
- 183 Gerami P. et al. Development of a novel noninvasive adhesive patch test for the evaluation of pigmented lesions of the skin //Journal of the American Academy of Dermatology. – 2014. – T. 71. – №. 2. – C. 237-244.
- 184 Ferris L. K. et al. Utility of a noninvasive 2-gene molecular assay for cutaneous melanoma and effect on the decision to biopsy //JAMA dermatology. – 2017. – T. 153. – №. 7. – C. 675-680.
- 185 Gerami P. et al. Development and validation of a noninvasive 2-gene molecular assay for cutaneous melanoma //Journal of the American Academy of Dermatology. – 2017. – T. 76. – №. 1. – C. 114-120. e2.
- 186 Monheit G. et al. The performance of MelaFind: a prospective multicenter study //Archives of dermatology. – 2011. – T. 147. – №. 2. – C. 188-194.
- 187 Zhao J. et al. Incorporating patient demographics into Raman spectroscopy algorithm improves in vivo skin cancer diagnostic specificity //Translational Biophotonics. – 2019. – T. 1. – №. 1-2. – C. e201900016.
- 188 di Ruffano L. F. et al. Computer-assisted diagnosis techniques (dermoscopy and spectroscopy-based) for diagnosing skin cancer in adults //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – №. 12.
- 189 Menzies S. W. et al. The performance of SolarScan: an automated dermoscopy image analysis instrument for the diagnosis of primary melanoma //Archives of dermatology. – 2005. – T. 141. – №. 11. – C. 1388-1396.
- 190 Borisova E. et al. Optical biopsy of human skin-A tool for cutaneous tumours' diagnosis //International Journal Bioautomation. – 2012. – T. 16. – №. 1. – C. 53.

- 191 Lihachev A. et al. Differentiation of seborrheic keratosis from basal cell carcinoma, nevi and melanoma by RGB autofluorescence imaging //Biomedical optics express. – 2018. – Т. 9. – №. 4. – С. 1852-1858.
- 192 Borisova E. G. et al. Near-infrared autofluorescence spectroscopy of pigmented benign and malignant skin lesions //Optical Engineering. – 2020. – Т. 59. – №. 6. – С. 061616.
- 193 Dahlstrand U. et al. Extended-wavelength diffuse reflectance spectroscopy with a machine-learning method for in vivo tissue classification //Plos one. – 2019. – Т. 14. – №. 10. – С. e0223682.
- 194 World Health Organization: Donation and transplantation. Retrieved [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/transplantation/publications/en/>
- 195 Slee A. D. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease //Nutrition & metabolism. – 2012. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-16.
- 196 Turner N. N. et al. (ed.). Oxford textbook of clinical nephrology. – Oxford University Press, 2015.
- 197 Franks A. G. Skin manifestations of internal disease //Medical Clinics. – 2009. – Т. 93. – №. 6. – С. 1265-1282.
- 198 Cal K., Zakowiecki D., Stefanowska J. Advanced tools for in vivo skin analysis //International journal of dermatology. – 2010. – Т. 49. – №. 5. – С. 492-499.
- 199 Caspers P. J. et al. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles //Journal of investigative dermatology. – 2001. – Т. 116. – №. 3. – С. 434-442.
- 200 Caspers P. J., Lucassen G. W., Puppels G. J. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin //Biophysical journal. – 2003. – Т. 85. – №. 1. – С. 572-580.
- 201 Caspers P. J. et al. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin //Biospectroscopy. – 1998. – Т. 4. – №. S5. – С. S31-S39.
- 202 Caspers P. J. et al. Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration

- profiles in human skin //Journal of Raman spectroscopy. – 2000. – T. 31. – №. 8-9. – C. 813-818.
- 203 Franzen L., Anderski J., Windbergs M. Quantitative detection of caffeine in human skin by confocal Raman spectroscopy—A systematic in vitro validation study //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2015. – T. 95. – C. 110-116.
- 204 Jung N., Vukosavljevic B., Windbergs M. Raman spectroscopy in skin research and dermal drug delivery //Confocal Raman Microscopy. – Springer, Cham, 2018. – C. 421-448.
- 205 Zhao J. et al. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy //Applied spectroscopy. – 2007. – T. 61. – №. 11. – C. 1225-1232.
- 206 Augustin M. et al. Diagnosis and treatment of xerosis cutis—a position paper //JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. – 2019. – T. 17. – C. 3-33.
- 207 van Waateringe R. P. et al. The association between various smoking behaviors, cotinine biomarkers and skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation //PLoS One. – 2017. – T. 12. – №. 6. – C. e0179330.
- 208 Chaudhuri J. et al. The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality //Cell metabolism. – 2018. – T. 28. – №. 3. – C. 337-352.
- 209 Hangai M. et al. Association of advanced glycation end products with coronary artery calcification in Japanese subjects with type 2 diabetes as assessed by skin autofluorescence //Journal of atherosclerosis and thrombosis. – 2016. – C. 30155.
- 210 Harvell J. D., Maibach H. I. Percutaneous absorption and inflammation in aged skin: a review //Journal of the American Academy of Dermatology. – 1994. – T. 31. – №. 6. – C. 1015-1021.
- 211 Iliev D., Elsner P. Clinical irritant contact dermatitis syndromes //Immunology and allergy clinics of North America. – 1997. – T. 17. – №. 3. – C. 365-375.

- 212 Uitto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis: age-associated alterations in collagen and elastin //Clinics in geriatric medicine. – 1989. – T. 5. – №. 1. – C. 127-148.
- 213 Skoczyńska A. et al. Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging //Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii. – 2017. – T. 34. – №. 2. – C. 97.
- 214 Farage M. A. et al. Characteristics of the aging skin //Advances in wound care. – 2013. – T. 2. – №. 1. – C. 5-10.
- 215 Duncan K. O., Leffell D. J. Preoperative assessment of the elderly patient //Dermatologic clinics. – 1997. – T. 15. – №. 4. – C. 583-593.
- 216 Zhang Y. et al. Classification of skin autofluorescence spectrum using support vector machine in type 2 diabetes screening //Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2013. – T. 6. – №. 04. – C. 1350036.
- 217 Paquin R., Colombari P. Nanomechanics of single keratin fibres: A Raman study of the α -helix \rightarrow β -sheet transition and the effect of water //Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering. – 2007. – T. 38. – №. 5. – C. 504-514.
- 218 Faolain E. O. et al. A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy //Vibrational Spectroscopy. – 2005. – T. 38. – №. 1-2. – C. 121-127.
- 219 Kast R. E. et al. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model //Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 2008. – T. 89. – №. 3. – C. 235-241.
- 220 Barry B. W., Edwards H. G. M., Williams A. C. Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: assignment of spectral bands //Journal of Raman spectroscopy. – 1992. – T. 23. – №. 11. – C. 641-645.

- 221 Wang H. P., Wang H. C., Huang Y. J. Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid //Science of the Total Environment. – 1997. – T. 204. – №. 3. – C. 283-287.
- 222 Noordzij M. J., Lefrandt J. D., Smit A. J. Advanced glycation end products in renal failure: an overview //Journal of renal care. – 2008. – T. 34. – №. 4. – C. 207-212.
- 223 Glenn J. V. et al. Confocal Raman microscopy can quantify advanced glycation end product (AGE) modifications in Bruch's membrane leading to accurate, nondestructive prediction of ocular aging //The FASEB journal. – 2007. – T. 21. – №. 13. – C. 3542-3552.
- 224 Pawlak A. M. et al. Raman spectroscopy of advanced glycation end products (AGEs), possible markers for progressive retinal dysfunction //Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering. – 2008. – T. 39. – №. 11. – C. 1635-1642.
- 225 Pereira L. et al. Confocal Raman spectroscopic analysis of the changes in type I collagen resulting from amide I glycation //Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. – 2017. – T. 1. – №. 3. – C. 629-633.
- 226 Pereira L. et al. Confocal Raman study of aging process in diabetes mellitus human voluntaries //Biophotonics South America. – International Society for Optics and Photonics, 2015. – T. 9531. – C. 95312M.
- 227 Santos I. P. et al. Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics //Analyst. – 2017. – T. 142. – №. 17. – C. 3025-3047.
- 228 Gualandri L., Betti R., Crosti C. Clinical features of 36 cases of amelanotic melanomas and considerations about the relationship between histologic subtypes and diagnostic delay //Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2009. – T. 23. – №. 3. – C. 283-287.

- 229 Cheung W. L. et al. Amelanotic melanoma: a detailed morphologic analysis with clinicopathologic correlation of 75 cases //Journal of cutaneous pathology. – 2012. – T. 39. – №. 1. – C. 33-39.
- 230 Cordero E. et al. In-vivo Raman spectroscopy: from basics to applications //Journal of biomedical optics. – 2018. – T. 23. – №. 7. – C. 071210.
- 231 Santos I.P. et al. Improving clinical diagnosis of early-stage cutaneous melanoma based on Raman spectroscopy //British journal of cancer. – 2018. – T. 119. – №. 11. – C. 1339-1346.
- 232 Giovannacci I. et al. Which are the main fluorophores in skin and oral mucosa? A review with emphasis on clinical applications of tissue autofluorescence //Archives of oral biology. – 2019. – T. 105. – C. 89-98.
- 233 Yakimov B. P. et al. Melanin distribution from the dermal–epidermal junction to the stratum corneum: non-invasive in vivo assessment by fluorescence and Raman microspectroscopy //Scientific reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 1-13.
- 234 Beyeler M., Dummer R. Cutaneous melanoma: uncommon presentations //Clinics in dermatology. – 2005. – T. 23. – №. 6. – C. 587-592.
- 235 Mascolo M. et al. Pitfalls in the dermoscopic diagnosis of amelanotic melanoma //Journal of the American Academy of Dermatology. – 2015. – T. 72. – №. 1. – C. S2-S3.
- 236 Gong H. Z., Zheng H. Y., Li J. Amelanotic melanoma //Melanoma research. – 2019. – T. 29. – №. 3. – C. 221-230.
- 237 Detrixhe A. et al. Melanoma masquerading as nonmelanocytic lesions //Melanoma research. – 2016. – T. 26. – №. 6. – C. 631-634.
- 238 Allen A., Ahn C., Sangüeza O. P. Dermatofibrosarcoma protuberans //Dermatologic Clinics. – 2019. – T. 37. – №. 4. – C. 483-488.
- 239 Llombart B. et al. Sarcomas cutáneos: directrices para el diagnóstico y tratamiento. Dermatofibrosarcoma protuberans //Actas Dermo-Sifiliográficas. – 2018. – T. 109. – №. 10. – C. 868-877.

- 240 Veronese F. et al. Wide local excision vs. Mohs Tübingen technique in the treatment of dermatofibrosarcoma protuberans: a two-centre retrospective study and literature review //Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. – 2017. – T. 31. – №. 12. – C. 2069-2076.
- 241 Brooks J., Ramsey M. L. Dermatofibrosarcoma protuberans. – StatPearls Publishing, 2020.
- 242 Penel N. et al. Dermatofibrosarcoma: Management //Bulletin du Cancer. – 2018. – T. 105. – №. 11. – C. 1094-1101.
- 243 Bratchenko I. A. et al. In vivo diagnosis of skin cancer with a portable Raman spectroscopic device //Experimental Dermatology. – 2021. – T. 30. – №. 5. – C. 652-663.
- 244 Falbel D., Allaire J. J., Chollet F. RStudio, Google, Yuan Tang, Wouter Van Der Bijl, Martin Studer, and Sigrid Keydana //Package 'Keras'. Version 2.3.0.0. – 2020.
- 245 Ho J., Brodell R. T., Helms S. E. Saucerization biopsy of pigmented lesions //Clinics in Dermatology. – 2005. – T. 23. – №. 6. – C. 631-635.
- 246 Elliss-Brookes L. et al. Routes to diagnosis for cancer—determining the patient journey using multiple routine data sets //British journal of cancer. – 2012. – T. 107. – №. 8. – C. 1220-1226.
- 247 Pham T. M. et al. Diagnostic route is associated with care satisfaction independently of tumour stage: Evidence from linked English Cancer Patient Experience Survey and cancer registration data //Cancer Epidemiology. – 2019. – T. 61. – C. 70-78.
- 248 Werner B. Biópsia de pele e seu estudo histológico: Por quê? Para quê? Como? Parte I //Anais Brasileiros de Dermatologia. – 2009. – T. 84. – C. 391-395.
- 249 Yu M. et al. Deep convolutional neural networks for tongue squamous cell carcinoma classification using Raman spectroscopy //Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2019. – T. 26. – C. 430-435.

- 250 Shang L. W. et al. Fluorescence imaging and Raman spectroscopy applied for the accurate diagnosis of breast cancer with deep learning algorithms //Biomedical Optics Express. – 2020. – T. 11. – №. 7. – C. 3673-3683.
- 251 Borodinov N. et al. Deep neural networks for understanding noisy data applied to physical property extraction in scanning probe microscopy //npj Computational Materials. – 2019. – T. 5. – №. 1. – C. 1-8.
- 252 Ho C. S. et al. Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning //Nature communications. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 1-8.
- 253 Brinker T. J. et al. Skin cancer classification using convolutional neural networks: systematic review //Journal of medical Internet research. – 2018. – T. 20. – №. 10. – C. e11936.
- 254 LeCun Y., Bengio Y., Hinton G. Deep learning //nature. – 2015. – T. 521. – №. 7553. – C. 436-444.
- 255 Haenssle H. A. et al. Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists //Annals of oncology. – 2018. – T. 29. – №. 8. – C. 1836-1842.
- 256 Argenziano G., Soyer H. P. Dermoscopy of pigmented skin lesions—a valuable tool for early //The lancet oncology. – 2001. – T. 2. – №. 7. – C. 443-449.
- 257 Kittler H. et al. Diagnostic accuracy of dermoscopy //The lancet oncology. – 2002. – T. 3. – №. 3. – C. 159-165.
- 258 Ali A. R. A., Deserno T. M. A systematic review of automated melanoma detection in dermoscopic images and its ground truth data //Medical Imaging 2012: Image Perception, Observer Performance, and Technology Assessment. – International Society for Optics and Photonics, 2012. – T. 8318. – C. 83181I.
- 259 Fabbrocini G. et al. Teledermatology: from prevention to diagnosis of nonmelanoma and melanoma skin cancer //International journal of telemedicine and applications. – 2011. – T. 2011.

- 260 Foraker R. E. et al. EHR-based visualization tool: adoption rates, satisfaction, and patient outcomes //eGEMs. – 2015. – T. 3. – №. 2.
- 261 Fabbrocini G. et al. Epiluminescence image processing for melanocytic skin lesion diagnosis based on 7-point check-list: a preliminary discussion on three parameters //The open dermatology journal. – 2010. – T. 4. – №. 1.
- 262 Hart P. E., Stork D. G., Duda R. O. Pattern Classification. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons. – 2000.
- 263 Oliveira R. B. et al. Computational methods for pigmented skin lesion classification in images: review and future trends //Neural Computing and Applications. – 2018. – T. 29. – №. 3. – C. 613-636.
- 264 Gutman D. et al. Skin lesion analysis toward melanoma detection: A challenge at the international symposium on biomedical imaging (ISBI) 2016, hosted by the international skin imaging collaboration (ISIC) //arXiv preprint arXiv:1605.01397. – 2016.
- 265 Marchetti M. A. et al. Results of the 2016 International Skin Imaging Collaboration International Symposium on Biomedical Imaging challenge: Comparison of the accuracy of computer algorithms to dermatologists for the diagnosis of melanoma from dermoscopic images //Journal of the American Academy of Dermatology. – 2018. – T. 78. – №. 2. – C. 270-277.
- 266 Selfridge O. G. Pandemonium: a paradigm for learning // Mechanism of Thought Processes: Proceedings of a Symposium. – 1958. – C. 513-526.
- 267 Rosenbaltt F. The perceptron – a perciving and recognizing automation //Cornell Aeronautical Laboratory. – 1957.
- 268 Werbos P. Beyond regression: new tools for prediction and analysis in the behavioral sciences //Ph. D. dissertation, Harvard University. – 1974.
- 269 Parker D. B., Learning Logic T. Report TR-47 //MIT. Center for Computational Research in Economics and Management Science, MIT, Cambridge, MA. Referenced in section. – 1985. – T. 2. – №. 1. – C. 24.

- 270 LeCun Y. Une Procédure d'apprentissage pour réseau à seuil asymétrique cognitive 85: A la Frontière de l'Intelligence Artificielle des Sciences de la Connaissance des Neurosciences //Paris, France. – 1985.
- 271 Rumelhart D. E., Hinton G. E., Williams R. J. Learning representations by back-propagating errors //Nature. – 1986. – T. 323. – №. 6088. – C. 533-536.
- 272 Raina R., Madhavan A., Ng A. Y. Large-scale deep unsupervised learning using graphics processors //Proceedings of the 26th annual international conference on machine learning. – 2009. – C. 873-880.
- 273 Mohamed A., Dahl G. E., Hinton G. Acoustic modeling using deep belief networks //IEEE transactions on audio, speech, and language processing. – 2011. – T. 20. – №. 1. – C. 14-22.
- 274 Dahl G. E. et al. Context-dependent pre-trained deep neural networks for large-vocabulary speech recognition //IEEE Transactions on audio, speech, and language processing. – 2011. – T. 20. – №. 1. – C. 30-42.
- 275 Hinton G. et al. Deep neural networks for acoustic modeling in speech recognition: The shared views of four research groups //IEEE Signal processing magazine. – 2012. – T. 29. – №. 6. – C. 82-97.
- 276 Bengio Y., Courville A., Vincent P. Representation learning: A review and new perspectives //IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence. – 2013. – T. 35. – №. 8. – C. 1798-1828.
- 277 LeCun Y. et al. Handwritten digit recognition with a back-propagation network //Advances in neural information processing systems. – 1989. – T. 2. – C. 396-404.
- 278 LeCun Y. et al. Gradient-based learning applied to document recognition //Proceedings of the IEEE. – 1998. – T. 86. – №. 11. – C. 2278-2324.
- 279 Hubel D. H., Wiesel T. N. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex //The Journal of physiology. – 1962. – T. 160. – №. 1. – C. 106.

- 280 Felleman D. J., Van Essen D. C. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex //Cerebral cortex (New York, NY: 1991). – 1991. – Т. 1. – №. 1. – С. 1-47.
- 281 Cadieu C. F. et al. Deep neural networks rival the representation of primate IT cortex for core visual object recognition //PLoS computational biology. – 2014. – Т. 10. – №. 12. – С. e1003963.
- 282 Fukushima K., Miyake S. Neocognitron: A new algorithm for pattern recognition tolerant of deformations and shifts in position //Pattern recognition. – 1982. – Т. 15. – №. 6. – С. 455-469.
- 283 Waibel A. et al. Phoneme recognition using time-delay neural networks //IEEE transactions on acoustics, speech, and signal processing. – 1989. – Т. 37. – №. 3. – С. 328-339.
- 284 Bottou L. et al. Experiments with time delay networks and dynamic time warping for speaker independent isolated digits recognition //First European Conference on Speech Communication and Technology. – 1989. – С. 537-540.
- 285 Simard P. Y. et al. Best practices for convolutional neural networks // Proc. Document Analysis and Recognition. – 2003. – С. 958-963.
- 286 Vaillant R., Monrocq C., Le Cun Y. Original approach for the localisation of objects in images //IEE Proceedings-Vision, Image and Signal Processing. – 1994. – Т. 141. – №. 4. – С. 245-250.
- 287 Nowlan S. J., Platt J. C. A convolutional neural network hand tracker //Advances in neural information processing systems. – 1995. – С. 901-908.
- 288 Lawrence S. et al. Face recognition: A convolutional neural-network approach //IEEE transactions on neural networks. – 1997. – Т. 8. – №. 1. – С. 98-113.
- 289 Krizhevsky A., Sutskever I., Hinton G. E. Imagenet classification with deep convolutional neural networks //Advances in neural information processing systems. – 2012. – Т. 25. – С. 1-23.
- 290 Simonyan K., Zisserman A. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition //arXiv preprint arXiv:1409.1556. – 2014.

- 291 Szegedy C. et al. Going deeper with convolutions. arXiv 2014 //arXiv preprint arXiv:1409.4842. – T. 1409.
- 292 He K. et al. Deep residual learning for image recognition //Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. – 2016. – C. 770-778.
- 293 Esteva A. et al. Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks //nature. – 2017. – T. 542. – №. 7639. – C. 115-118.
- 294 Navarrete-Dechent C. et al. Automated dermatological diagnosis: hype or reality? //The Journal of investigative dermatology. – 2018. – T. 138. – №. 10. – C. 2277.
- 295 Tang J. W. et al. Comparative Analysis of Machine Learning Algorithms on Surface Enhanced Raman Spectra of Clinical Staphylococcus Species //Frontiers in Microbiology. – 2021. – T. 12.
- 296 Hu J. et al. Raman spectrum classification based on transfer learning by a convolutional neural network: Application to pesticide detection //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2022. – T. 265. – C. 120366.
- 297 Yan H. et al. Diverse region-based CNN for tongue squamous cell carcinoma classification with Raman spectroscopy //IEEE Access. – 2020. – T. 8. – C. 127313-127328.
- 298 Wang P. et al. Discrimination of blood species using Raman spectroscopy combined with a recurrent neural network //OSA Continuum. – 2021. – T. 4. – №. 2. – C. 672-687.
- 299 Yu S. et al. Analysis of Raman Spectra by Using Deep Learning Methods in the Identification of Marine Pathogens //Analytical Chemistry. – 2021. – T. 93. – №. 32. – C. 11089-11098.
- 300 Wu M. et al. Deep learning data augmentation for Raman spectroscopy cancer tissue classification //Scientific reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 1-13.

- 301 Date Y., Kikuchi J. Application of a deep neural network to metabolomics studies and its performance in determining important variables //Analytical chemistry. – 2018. – T. 90. – №. 3. – C. 1805-1810.
- 302 McGovern A. et al. Making the black box more transparent: Understanding the physical implications of machine learning //Bulletin of the American Meteorological Society. – 2019. – T. 100. – №. 11. – C. 2175-2199.
- 303 Yang J. B. et al. Feature selection for MLP neural network: The use of random permutation of probabilistic outputs //IEEE Transactions on Neural Networks. – 2009. – T. 20. – №. 12. – C. 1911-1922.
- 304 Zhang Y. et al. Assessment of Raman spectroscopy for reducing unnecessary biopsies for melanoma screening //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 12. – C. 2852.
- 305 Haenssle H. A. et al. Man against machine reloaded: performance of a market-approved convolutional neural network in classifying a broad spectrum of skin lesions in comparison with 96 dermatologists working under less artificial conditions //Annals of Oncology. – 2020. – T. 31. – №. 1. – C. 137-143.
- 306 Dinnes J. et al. Visual inspection for diagnosing cutaneous melanoma in adults //Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – №. 12.
- 307 Goyal M. et al. Artificial intelligence-based image classification methods for diagnosis of skin cancer: Challenges and opportunities //Computers in Biology and Medicine. – 2020. – T. 127. – C. 104065.
- 308 Zhang N. et al. Skin cancer diagnosis based on optimized convolutional neural network //Artificial intelligence in medicine. – 2020. – T. 102. – C. 101756.
- 309 Sigurdsson S. et al. Detection of skin cancer by classification of Raman spectra //IEEE transactions on biomedical engineering. – 2004. – T. 51. – №. 10. – C. 1784-1793.
- 310 Räsänen J. et al. Hyperspectral imaging reveals spectral differences and can distinguish malignant melanoma from pigmented basal cell carcinomas: A pilot study //Acta dermato-venereologica. – 2021. – T. 101. – №. 2. – C. adv00405-adv00405.

- 311 Hoar D. et al. Combined Transfer Learning and Test-Time Augmentation Improves Convolutional Neural Network-Based Semantic Segmentation of Prostate Cancer from Multi-Parametric MR Images //Computer Methods and Programs in Biomedicine. – 2021. – T. 210. – C. 106375.
- 312 Bonavita I. et al. Integration of convolutional neural networks for pulmonary nodule malignancy assessment in a lung cancer classification pipeline //Computer methods and programs in biomedicine. – 2020. – T. 185. – C. 105172.
- 313 Mostavi M. et al. Convolutional neural network models for cancer type prediction based on gene expression //BMC medical genomics. – 2020. – T. 13. – №. 5. – C. 1-13.
- 314 Lopez-Garcia G. et al. Transfer learning with convolutional neural networks for cancer survival prediction using gene-expression data //PloS one. – 2020. – T. 15. – №. 3. – C. e0230536.
- 315 Ding S. et al. Deep attention branch networks for skin lesion classification //Computer Methods and Programs in Biomedicine. – 2021. – T. 212. – C. 106447.
- 316 Pacheco A. G. C., Krohling R. A. The impact of patient clinical information on automated skin cancer detection //Computers in biology and medicine. – 2020. – T. 116. – C. 103545.
- 317 Alfed N., Khelifi F. Bagged textural and color features for melanoma skin cancer detection in dermoscopic and standard images //Expert Systems with Applications. – 2017. – T. 90. – C. 101-110.
- 318 Kothari R. et al. Raman spectroscopy and artificial intelligence to predict the Bayesian probability of breast cancer //Scientific reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 1-17.
- 319 Arnaout R. et al. An ensemble of neural networks provides expert-level prenatal detection of complex congenital heart disease //Nature medicine. – 2021. – T. 27. – №. 5. – C. 882-891.

320 Bratchenko L. A. et al. Raman spectroscopy of human skin for kidney failure detection //Journal of Biophotonics. – 2021. – T. 14. – №. 2. – C. e202000360.

Приложение А – Результаты гистологического анализа двух новообразований
правой стопы

АИС «ИМПЛИКЛИНИКА», 2023-2021: (ORACLE-192.168.200.22ORASO00) [Версия: 3.12.11 от 25.02.2021 11.08.04] [Польз.: 269058 - SOCOM/Мурман] [Грэйт: 280300] [Выданы: 2/18] [Ресурсы: 0]
ООО Информационно-Медицинский Центр

Пациент [958145] ██████████ д.р. ██████████ 1985
 Документ ██████████ (паспорт РФ)
 Прописка САМАРА, ██████████
 Проживание ██████████
 Полис ОМС [енп] ██████████ (АО СК "АСКОМЕД")
 Полис ДМС ██████████

ЛПУ прикрепл. (5524) ОТДЕЛЕНИЕ ВРАЧЕЙ ОБЩЕЙ ПРАКТИКИ №2 ГБУЗ СО "СГБ № 4"
 Страх. категория (1) застрахованный работающий Соц. статус (4) работающий

Сведения о СПО 25.02.2021 цель обращения по заболеванию

направлен из ЛПУ (630083) ГБУЗ СО "СГБ ; 4"
 направивший врач (П334573) ПОЛЯКОВА ГАЛИНА ГЕННАДЬЕВНА (5602)
 направительный диагноз (Z03.1) НАБЛЮДЕНИЕ ПРИ ПОДОЗРЕНИИ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ОПУХОЛЬ
 доза за год, мЗв ██████████

закрывший врач (1551000) КАСИРОВ ДМИТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ исход без изменения

диагнозы:
 (D22.7) МЕЛАНОФОРМНЫЙ НЕВУС НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ, ВКЛЮЧАЯ ТАЗОБЕДРЕННУЮ ОБЛАСТЬ; основной
 (закл.); (2) впервые в жизни устан. хрон. (+)

Визит 25.02.2021 к врачу (2231000) КАБИНЕТ 3113(ГИСТОЛОГИЯ) (2 БЛОК)
 ВРАЧ-ПАТОЛОГОАНАТОМ
 Медсестра
 поликлиника, , (1) по заболеваниям:
 направление 25.02.2021 (1000000) ПОЛИКЛИНИКА

(161254) 39.18.1.1. Исследование биопсийного и (1) омс
 цена 305.07 кол-во 2 коэфф. 1.00 стоим. 610.14 УЕТ 1.00 (выставл.)
 ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ - *
 ГБУЗ Самарский областной клинический онкологический диспансер

Гистологическое заключение

Пациент: (958145) БРАТЧЕНКО ИВАН АЛЕКСЕЕВИЧ 22.06.1985г.р.
 Диагноз: (D22.7) МЕЛАНОФОРМНЫЙ НЕВУС НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ, ВКЛЮЧАЯ ТАЗОБЕДРЕННУЮ ОБЛАСТЬ
 Описание биоматериала: Невус кожи основания 2пальца правой стопы.
 Рег. номера стекол: 17357-17358
 Объектов: 2
 Макроописание:
 Микроописание:
 Заключение: 1. Папиллома. 2. Себорейный кератоз.
 Дата: 03.03.2021 Врач: Атанов А.В.

Врач КАБИНЕТ 3113(ГИСТОЛОГИЯ) (2 БЛОК) Дата 25.02.2021

Приложение Б – Листинг программы в среде R для проведения кросс-валидации
моделей классификации, обученных на спектральных данных

```
k <- 10
indices <- sample(1:150)
folds <- cut(indices, breaks = k, labels = FALSE)
num_epochs <- 200
all_loss_histories <- NULL

// разбиение исходного сета данных на подгруппы
// данные для каждого конкретного пациента при этом попадают только в одну из анализируемых
групп, что предотвращает некорректное обучение модели, в ходе которого данные из
валидационного сета уже были проанализированы моделью классификации в ходе работы с
обучающим сетом

for (i in 1:k) {
  cat("processing fold #", i, "\n")
  val_indices <- which(folds == i, arr.ind = TRUE)
  t <- dimension(val_indices)
  val_data <- array(dim=c(t, 912))
  val_data [,] <- train_data[val_indices,]
  val_targets <- train_targets[val_indices]
  t2 <- (150 - t)
  partial_train_data <- array(dim=c(t2, 912))
  partial_train_data [,] <- train_data[-val_indices,]
  partial_train_targets <- train_targets[-val_indices]
  model2 <- build_model2()
  history <- model2 %>% keras::fit(
    partial_train_data, partial_train_targets,
    validation_data = list(val_data, val_targets), epochs = num_epochs, batch_size = 100, verbose = 0
  )

  loss_history <- history[["metrics"]][["val_loss"]]
  all_loss_histories <- rbind(all_loss_histories, loss_history)
}
```

```
}  
average_loss_history <- data.frame(  
  epoch = seq(1:ncol(all_loss_histories)),  
  validation_loss = apply(all_loss_histories, 2, mean)  
)  
//реализация k-fold кросс валидации  
  
library(ggplot2)  
ggplot(average_loss_history, aes(x = epoch, y = validation_loss)) + geom_line()  
  
ggplot(average_loss_history, aes(x = epoch, y = validation_loss)) + geom_smooth()  
// вывод и графическое построение результатов работы алгоритма  
// выводятся данные о величине ошибки при обучении модели
```

