

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Самара - 2022

Работа выполнена на кафедре лазерных и биотехнических систем федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» (Самарский университет).

Научный консультант: **Захаров Валерий Павлович**, доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Дунаев Андрей Валерьевич**, доктор технических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева»,  
**Кистенев Юрий Владимирович**, доктор физико-математических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»,  
**Дмитрий Александрович Горин**, доктор химических наук, профессор центра фотоники и квантовых материалов АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий».

Ведущая организация: ФГБУН Физический институт им.П.Н. Лебедева Российской академии наук.

Защита состоится «17» ноября 2022 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.06 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук при Саратовском национальном исследовательском государственном университете имени Н.Г.Чернышевского по адресу 410012, г.Саратов, ул. Астраханская, 83, X корпус СГУ, ауд.511

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. В.А. Артисевич СГУ и на сайте <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-06/doktorskaya-dissertaciya-bratchenko-ivana>

Автореферат разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
24.2.392.06, д.ф.-м.н.



Генина Элина Алексеевна

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования.**

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 онкологические заболевания. Изучение процессов старения и механизмов развития заболеваний, связанных с возрастом продемонстрировало накопление модифицированных белков и липидов в тканях организма человека. 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.

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 (Raman spectroscopy – RS), 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» (берущих свое начало с работ R. Alfano), 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 (Е.

Борисова, В. Захаров). После интенсивного внедрения RS в биомедицинские исследования (Z. Huang, H. Zeng, J. Popp и многие другие), автофлуоресцентная (autofluorescence – AF) компонента регистрируемого спектра часто не использовалась как малоинформативная (H. Zeng). При этом для более корректной интерпретации данных исследования и повышения точности диагностики заболеваний хорошо зарекомендовало себя совместное применение AF и RS. Несмотря на все последние успехи «оптической биопсии» (A. Mahadevan-Jansen, A. Дунаев, J. Spigulis и многие другие), существует проблема относительно низкой достоверности и прогностической значимости предлагаемых оптических методик для клинической диагностики различных заболеваний. Поэтому 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 – биохимическим и гистологическим исследованиям тканей.

**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 в норме, при развитии злокачественных и доброкачественных новообразований, а также при почечной недостаточности

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 (проекции 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  $1000-1800\text{ см}^{-1}$  установить композицию протеинов и липидов, и содержание пигментов, таких как меланин, за счет анализа изменений спектральной плотности интенсивности автофлуоресценции в области  $400-1000\text{ см}^{-1}$ .

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  $12\text{ см}^{-1}$ ), 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 онкологических 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.

#### **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.

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

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

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 проведенных 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.

Проведенные 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 650 цитат на март 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 – #КП06-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\_a, 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 опубликованы в российских и международных научных журналах.

#### **Апробация работы**

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**

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 и объём работы**

Диссертация состоит из списка сокращений, введения, шести глав, заключения, списка использованных источников (340 наименований) и двух приложений. Общий объём, включая 187 страниц основного текста с 34 рисунками и 17 таблицами, список использованных источников на 33 страницах и приложения на 4 страницах, составляет 224 страниц.

#### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована её цель и основные задачи, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены основные положения и результаты, выносимые на защиту, апробация работы и личный вклад автора, описаны структура и объём диссертации.

В **Главе 1** приведен аналитический обзор литературы, посвящённый методам проведения «оптической биопсии» в современной медицинской практике. Представлены данные по использованию методов AF и RS для диагностики различных типов тканей и различных заболеваний. В главе представлены физико-химические основы методов AF и Рамановского

анализа. Особый упор сделан на описание различных модификаций RS при проведении исследований биотканей. Рассмотрены наиболее популярные методы машинного обучения при анализе данных «оптической биопсии» биотканей, включая ткани кожи человека.

**Глава 2** описывает основные подходы к реализации мультимодального метода оптической диагностики биотканей. В главе представлены результаты *ex vivo* исследования тканей кожи человека, находящихся в норме, а также при развитии доброкачественных и злокачественных новообразований.

Лабораторная установка, использованная для регистрации спектральных характеристик представлена на рисунке 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 ближней инфракрасной (ИК) области спектра 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. Ближнее ИК (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 ближнего ИК 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, 0,22). NA). Далее излучение поступает на многоканальный спектрограф Shamrock SR-500i-D1-R с цифровой CCD-камерой Andor iDus DU416A-LDC-DD, охлаждаемой до  $-65^{\circ}\text{C}$ . 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.

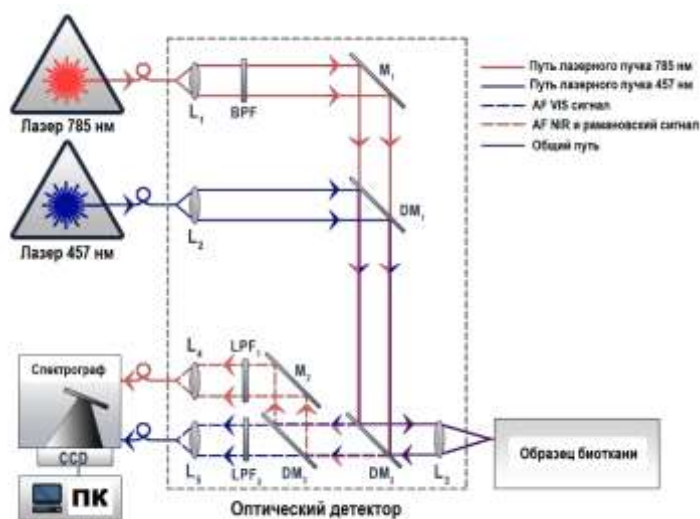


Рисунок 1 –  
 Экспериментальная установка, сочетающая принципы RS и AF: L1, L2, L4, L5 – согласующие линзы; L3 – фокусирующая линза; BPF: узкополосные фильтры; M1, M2 – зеркала; DM1, DM2, DM3 – дихроичные зеркала; LPF1, LPF2 – широкополосные фильтры

Лазерное излучение с длиной волны 785 нм одновременно стимулирует Рамановское рассеяние и AF 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 злокачественными 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. 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 (principal components – PC), вдоль которых изменение данных является максимальным. Изолируя

несколько компонентов, каждый образец может быть представлен сравнительно небольшим числом РС вместо нескольких переменных.

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. Основными поглотителями оптического излучения здоровой кожи являются гемоглобин, вода, липиды и меланин [1]. 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. 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.

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 [2]. Типичные нормализованные спектры флуоресценции от кожных тканей представлены на рисунке 2. На этих спектрах можно наблюдать три основных локальных максимума в областях 555-575 нм, 595-615 нм и 635-556 нм.

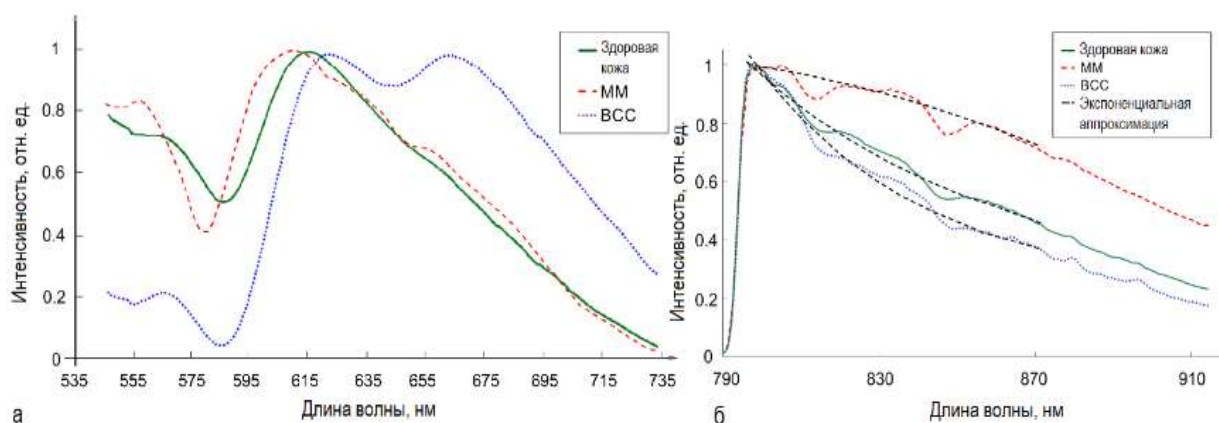


Рисунок 2 – Нормализованные *ex vivo* спектры АФ нормальной ткани кожи, меланомы (ММ) и базальноклеточного рака (ВСС), стимулированные лазером 457 нм (а) и лазером 785 нм (б)

Основными флуорофорами, излучающими в оранжевой и красной областях видимого спектра, являются липопигменты, флавины и порфирины [3]. 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 [4]. 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. [3, 5]. 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. С другой стороны, флавины контролируют фотостимулированное образование меланина в специализированных клетках 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*) [6, 7]. 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 [8]. 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. 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:

$$F\lambda_{VIS} = \frac{|\lambda_{norm} - \lambda_{tumor}|}{\lambda_{norm} + \lambda_{tumor}}, \quad (1)$$

где  $\lambda_{\text{tumor}}$  и  $\lambda_{\text{norm}}$  являются положением максимума спектров АФ для опухоли и нормальной кожи вблизи новообразования для одного и того же образца ткани кожи. Сдвиг спектра  $F\lambda_{\text{VIS}}$  в видимом диапазоне помогает оценить изменения концентрации порфиринов в верхних слоях кожи, поскольку опухоли содержат больше бактерий на своей поверхности, чем нормальная кожа [6]. Применение критерия приводит к общей точности 53,6%, а площадь под ROC кривой составляет 0,47. 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 учета обоих критериев.

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

На рисунке 2 показаны типичные спектры АФ в ближней ИК области для нормальной кожи и опухолей, стимулированные лазером с длиной волны 785 нм. Пунктирная кривая показывает экспоненциальное приближение спектров АФ спектров в ближней ИК области. В спектральном диапазоне 870 - 920 нм интенсивность АФ, стимулированной в ближней ИК области спектра, уменьшается с ростом длины волны, и наиболее значительные качественные изменения спектра АФ для различных опухолей наблюдались в диапазоне от 810 до 870 нм. Для сравнительного анализа экспериментальных данных аппроксимируем спектр АФ экспоненциальной функцией вида:

$$I_{ap}(\lambda) = FI_{NIR} * \exp^{F\lambda_{NIR} \left( \frac{\lambda}{\lambda_{max}} \right)} + c, \quad (2)$$

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 [2], поскольку кривизна (абсолютное значение и его знак) и функция наклона аппроксимации зависят от содержания меланина в тканях кожи.

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 АФ в ближней ИК области спектра 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).

Типичные регистрируемые спектры Рамановского рассеяния ММ, ВСС и здоровой кожи представлены на рисунке 3. Каждый спектр был нормирован на максимальную интенсивность во всем спектральном диапазоне от 1200 до 1800  $\text{см}^{-1}$ , чтобы избежать влияния изменчивости тканей кожи. Для всех исследованных образцов наиболее интенсивная полоса RS расположена около 1450  $\text{см}^{-1}$  и связана с колебаниями  $\text{CH}_2$  в белках и липидах [9]. Другие хорошо наблюдаемые полосы: от 1240 до 1280  $\text{см}^{-1}$  (растяжение  $\text{C}=\text{N}$ ), от 1300 до 1340  $\text{см}^{-1}$  (скручивающие и изгибные колебания  $\text{CH}_2$ ), от 1540 до 1580  $\text{см}^{-1}$  (деформационные колебания  $\text{C}=\text{C}$  и триптофан) и от 1640 до 1680  $\text{см}^{-1}$  (растяжение связи  $\text{C}=\text{O}$  в амидах I).

Анализ Рамановских спектров проводился с помощью двухэтапного метода фазово-пространственного анализа [9, 10], который основан на оценке изменения соотношения между спектральными пиками  $I_k$  RS в области опухоли и здоровой ткани вблизи опухоли. Дифференцирование типов рака среди отобранных новообразований проводилось на втором этапе с помощью введенных коэффициентов:

$$RS_k = \frac{|I_k^{(m)} - I_k^{(h)}|}{I_k^{(m)} + I_k^{(h)}}, \quad (3)$$

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  $1660 \text{ см}^{-1}$  для дифференциации тканей кожи на фазовой плоскости с применением дискриминантного анализа (DA).

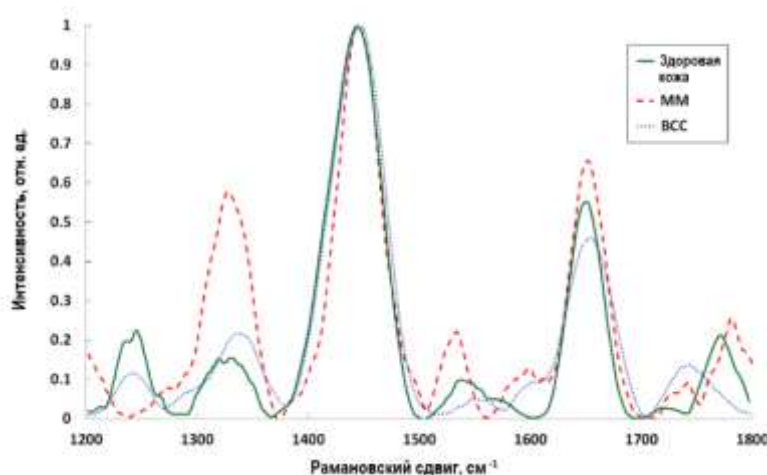


Рисунок 3 –  
Нормализованные *ex vivo*  
спектры Рамановского  
рассеяния нормальной ткани  
кожи, ММ и ВСС



Поскольку каждый предложенный критерий отслеживает изменения различных компонентов новообразования, повышение точности классификации новообразований может быть достигнуто путем сочетания критериев, основанных на различных спектроскопических подходах. На рисунке 4 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 ближней ИК областях обеспечивает более точное на 8-10% разделение MM и ВСС по сравнению с анализом AF в ИК или видимой области спектра.

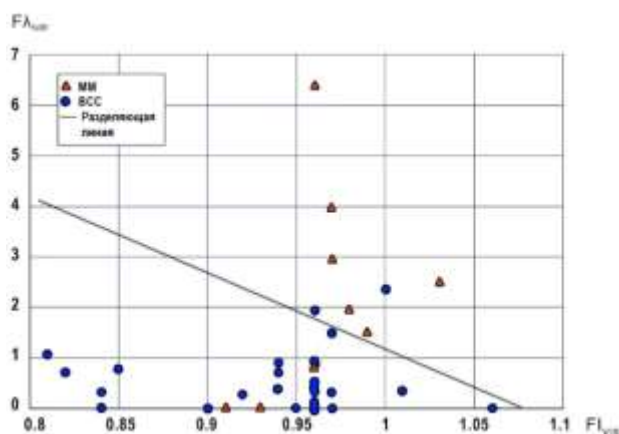


Рисунок 4 – Классификация MM и ВСС на основании относительного содержания порфиринов, липидов и флавинов и оценки уровня меланина ( $FI_{VIS}$  и  $F\lambda_{NIR}$ )

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 ( $FI_{NIR}$  и  $F\lambda_{NIR}$  для AF в ближней ИК области 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 ВСС) и в шестимерном пространстве (дополнительно измерены  $FI_{VIS}$  и  $F\lambda_{VIS}$  для видимой AF) для когорты из 74 образцов.

Рисунок 5 демонстрирует трехмерное представление PCA четырехмерного пространства [11]. При таком подходе сложные оптические методы демонстрируют высокую эффективность разделения MM и ВСС: чувствительность и специфичность классификации злокачественных новообразований составляют 94,9% и 92,5%, соответственно, в пространстве 4-мерных критериев, и 100% и 96,3% для критериев шестимерном пространстве.

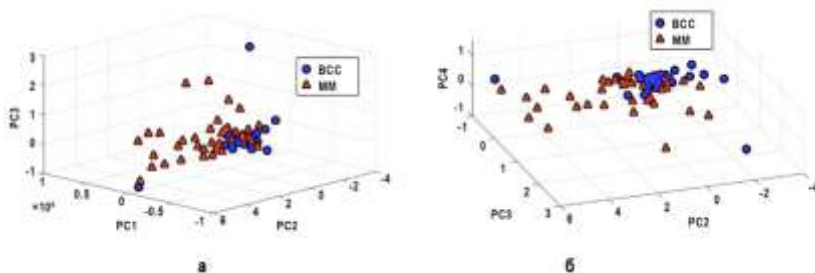


Рисунок 5 – Классификация MM и ВСС с применением PCA в четырехмерном пространстве признаков (или в пространстве PC):



(а) PC1, PC2, и PC3, и (б) PC2, PC3, и PC4

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.

В **Главе 3** 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 [12]. Метод обработки данных на основе PLS-DA (проекция на латентные структуры – projection on latent structures – PLS) 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.

На рисунке 6 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  $1,56 \text{ Вт/см}^2$  на коже. Данная плотность мощности лазерного излучения не превышает максимально допустимый предел воздействия согласно межгосударственному стандарту [13] (аналог ANSI)  $1,63 \text{ Вт/см}^2$ . 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%).

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  $-65 \text{ }^\circ\text{C}$ . 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  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ .

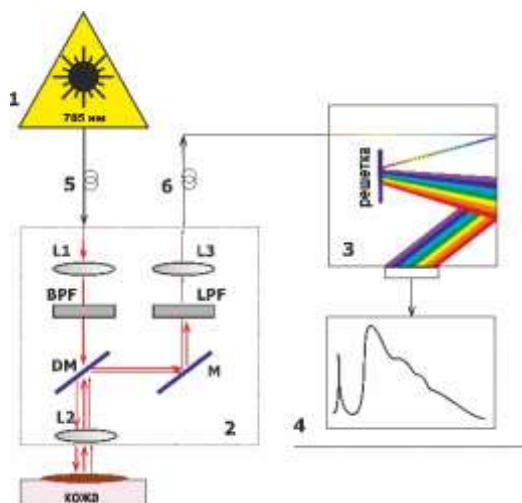
Для определения оптимальных характеристик регистрации спектров тканей кожи с помощью установок Andor и QE была использована следующая функция оценки уровня шумов (SNR):

$$snr = \frac{S_{RS}}{\sqrt{D_{SN}}}, \quad (4)$$

где  $S_{RS}$  – уровень Рамановского сигнала (интенсивность Рамановского пика в полосе 1440-1460  $\text{см}^{-1}$  после его выделения из необработанных зарегистрированных спектров с использованием полиномиального приближения);  $D_{SN}$  – дисперсия шума.



Рисунок 6 – Портативная Рамановская система для *in vivo* исследований кожи человека: 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 отсеивания возбуждающего лазерного излучения, согласующая линза L3 и собирающее волокон 6, передают отфильтрованное излучение к многоканальному спектрометру

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 °C и -65 °C для установок QE и Andor соответственно) и варьировалось время регистрации сигнала (10-90с). 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 °C. При температуре детектора выше -30 °C регистрировался только шумовой сигнал. Для установки QE регистрация спектров проводилась при температурах -7 °C, -10 °C, -15 °C.

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. 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. 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 (benign - BN) (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 BN).

Необработанные спектры новообразований кожи человека представляют собой комбинацию Рамановского сигнала, АF-сигнала и шума. Анализ спектральных данных проводился в диапазоне от 803 до 914 нм, что соответствует Рамановскому смещению  $300-1800 \text{ см}^{-1}$ . Многофакторный анализ спектральных данных проводился с использованием программного обеспечения MdaTools [14]. 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 [15, 16].

Обработка экспериментальных данных проводилась на основе регрессионного анализа с использованием проекции на латентные структуры и дискриминантного анализа (PLS-DA). 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) [17]. Оценка VIP показывает важность переменных для способности прогнозирования построенной модели. Чем выше значение VIP-оценки, тем важнее соответствующая переменная в построенной PLS 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.

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 [18]. 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 (4).

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 [19]. 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. Поэтому все измерения спектров *in vivo* были выполнены с использованием портативного Рамановского спектрометра со временем накопления сигнала 60 секунд и охлаждением детектора до  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Интенсивность AF и форма кривой существенно различаются для разных видов патологии кожи. Характерные особенности формы спектров AF наблюдаются в диапазоне от 300 до  $1200\text{ см}^{-1}$ , в то время как медленное экспоненциальное уменьшение интенсивности AF характерно в диапазоне от 1200 до  $1800\text{ см}^{-1}$ . 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, что объясняет высокую интенсивность АФ от пигментированных образований. В области от 300 до 310 см<sup>-1</sup> 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 было показано, что максимум интенсивности АФ является неоднозначно важным диагностическим критерием, потому что он зависит от слишком многих факторов, таких как мощность возбуждения, расположение оптического зонда; а при непрерывном излучении уменьшение уровня интенсивности объясняется эффектом фотообесцвечивания тканей [20, 21].

Типичные пики Рамановского рассеяния для новообразований кожи описаны в одном из крупных исследований [19]. Рамановские спектры тканей кожи человека показывают вклад молекулярных колебаний, связанных с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами и аминокислотами: от 1250 до 1300 см<sup>-1</sup> (амид III, C – N, N – H), от 1320 до 1360 см<sup>-1</sup> (триптофан). От 1440 до 1460 см<sup>-1</sup> (полосы CH<sub>2</sub> / CH<sub>3</sub> в белках и липидах), от 1550 до 1560 см<sup>-1</sup> (триптофан), от 1640 до 1680 см<sup>-1</sup> (C = O валентные колебания группы амид I).

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 BN с VIP для модели MLG и BN показаны на рисунке 7. Согласно анализу VIP, наиболее информативные различия между спектрами новообразований MLG (n = 37) и BN (n = 19) наблюдаются в полосах 533, 713, 877, 946, 1048, 1281, 1439, 1562 и 1644 см<sup>-1</sup>. Таким образом, построенные модели учитывают как Рамановские, так и АФ особенности новообразований. Спектральные различия между опухолями MLG и BN позволяют достичь 100% точности разделения, а ROC AUC равна 1.

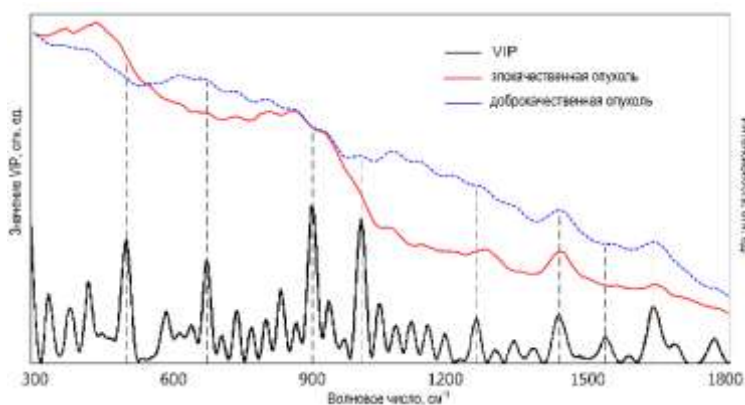


Рисунок 7 – VIP-анализ для классификации злокачественных (MLG) и доброкачественных (BN) опухолей

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  $\text{см}^{-1}$ , спектральные особенности, возникающие из-за вклада липидов, преимущественно триолеина, наблюдаются в спектральном диапазоне 1271-1301  $\text{см}^{-1}$ , 1440  $\text{см}^{-1}$ , 1650-1660  $\text{см}^{-1}$ . 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. Коллагеназа разрушает молекулярные связи коллагеновых волокон, и изменения в спектрах комбинационного рассеяния кожной ткани могут наблюдаться в полосах 1248, 1454 и 1665  $\text{см}^{-1}$ , связанных с пиками коллагена [22].

ВСС обладает гораздо большей подвижностью и инвазивностью опухолевых клеток из-за более высокого уровня актина по сравнению с ММ [23]. Полосы, отвечающие за содержание актина, наблюдаются вблизи 1210, 1342, 1452 и 1613  $\text{см}^{-1}$ . В моделях «ММ против ВСС», «ММ против других опухолей» и «ВСС против других опухолей» анализ VIP идентифицировал области 1207-1217 и 1433-1444  $\text{см}^{-1}$ , представляющие различия в концентрации актина. В спектрах ММ наблюдается уменьшение интенсивности в области амида I с 1644 до 1660  $\text{см}^{-1}$ . Полоса от 1644 до 1660  $\text{см}^{-1}$  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  $\text{см}^{-1}$  характеризуется вкладом воды [22]. Feng с соавторами [23] 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 см<sup>-1</sup>. Следовательно, область с большим волновым числом должна использоваться для изучения вклада воды в дифференциацию кожных образований. Другой информативный биохимический компонент - это меланин, который вносит вклад в основном в форму спектра АF. 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 см<sup>-1</sup>, являются особенностями формы спектров АF, которая зависит от вклада эндогенных флуорофоров, в основном меланина.

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 массового скринингового анализа. На следующем этапе исследований предлагаемая портативная система была протестирована непосредственно в клинических условиях.

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.

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 (ММ), 122 базальноклеточных карцином (ВСС), 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).

Следуя результатам исследований рака кожи с помощью RS систем *in vivo* [24, 25] 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, NE, SK, NE, кожный рог, доброкачественная опухоль эпидермального придатка) новообразований; 2. Дискриминация MM и доброкачественных пигментных новообразований кожи (NE + SK); 3. Дискриминация MM и SK. Описанные задачи были проанализированы для различных спектроскопических случаев: 1. Был проанализирован весь зарегистрированный набор спектральных данных (содержащий сигналы AF и комбинационного рассеяния в диапазоне 300-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) – модель «Full»; 2. Была проанализирована только AF часть (область от 300 до 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) набора спектральных данных (модель «AF»); 3. Анализировалась только Рамановская часть (область от 1200 до 1800  $\text{cm}^{-1}$ ) набора спектральных данных (модель «Raman»); 4. Был проведен совместный анализ AF и Рамановских частей (результаты были объединены с реализацией логистической регрессии) (модель «Raman + AF»).

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 PC 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. Оценивалась значимость переменных в прогнозе (variable importance in projection – VIP).

Многовариантный анализ проводился с использованием пакета MDAtools в программе R studio для реализации алгоритма SIMPLS для части PLS метода PLS-DA [14]. 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 (confidence interval – CI). Диаграммы размаха и ROC кривые были построены с использованием пакета pROC в программе Rstudio. 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.

На рисунке 8 показаны средние значения и дисперсия сигналов RS (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  $\text{см}^{-1}$  и обусловлены присутствием основных компонентов кожи, таких как липиды, белки и т.д. [12] Однако из-за их сложного биохимического состава точное определение хромофоров довольно сложно, и для классификации тканей кожи простой анализ отдельных полос RS неэффективен [12]. Спектры AF визуальны 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 спектральные диапазоны, которые могут быть полезны для классификации тканей кожи.

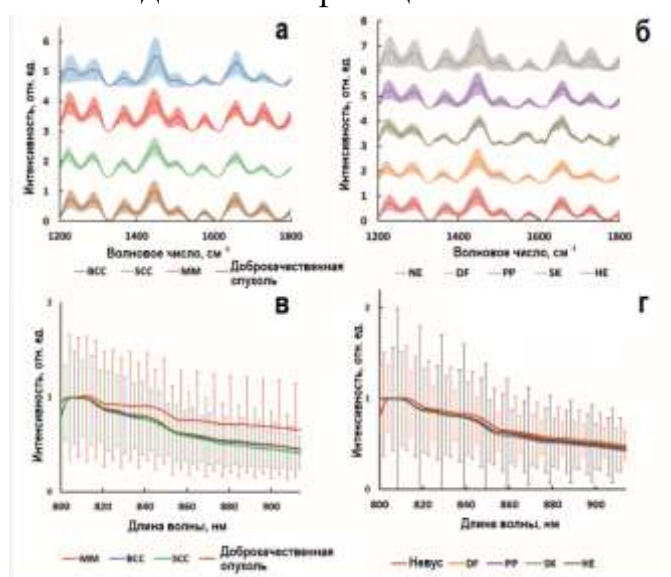


Рисунок 8 – Средние и стандартные отклонения RS (а, б) и AF (в, г) спектров новообразований кожи. Все спектры нормализованы по минимуму и максимуму. MM – злокачественная меланома; BCC – базальноклеточная карцинома; SCC – плоскоклеточный рак; BN – доброкачественные опухоли; DF – дерматофиброма; PP – папиллома; HE – гемангиома; SK – себорейный кератоз

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 ММ (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% ДИ) 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 ММ (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.

Таким образом, в соответствии с полученными результатами, предлагаемая портативная Рамановская система может использоваться в приложениях массового скрининга для повышения точности обнаружения новообразований кожи. 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.

В **Главе 4** рассматривается применение портативной Рамановской системы для диагностики патологий почек при неинвазивном оптическом анализе тканей кожи предплечья. 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 [12]. Поэтому целью проведенной работы являлось проведение оптического анализа кожи *in vivo* у пациентов в терминальной стадии хронической болезни почек, которые находились на гемодиализе, с помощью Рамановской спектроскопии в ближней инфракрасной области с последующим многомерным анализом полученных спектральных данных с применением метода проекции на латентные структуры.

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. Экспериментальная установка и подходы к предобработке и анализу спектральных данных идентичны описанным в предыдущей главе.

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 9 показаны оценки VIP матриц спектров Рамановского рассеяния в построенных моделях.



Рисунок 9 – VIP матрицы Рамановских спектров в построенных регрессионных моделях

Анализ рисунка 9 демонстрирует, что спектральные полосы, характерные для почечной недостаточности, не перекрываются с полосами, которые информативны при различении здоровых кожных тканей по возрасту. Сравнение полученных результатов с данными других научных 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.

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.

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.

В Главе 5 показывается возможность применения предлагаемых методов и подходов к диагностике редких заболеваний. На рисунке 10 показаны средние спектры ММ (или пигментных меланом – РММ), беспигментных меланом (amelanotic melanoma – АММ) и ВСС, включая сигналы RS и AF с дисперсией.

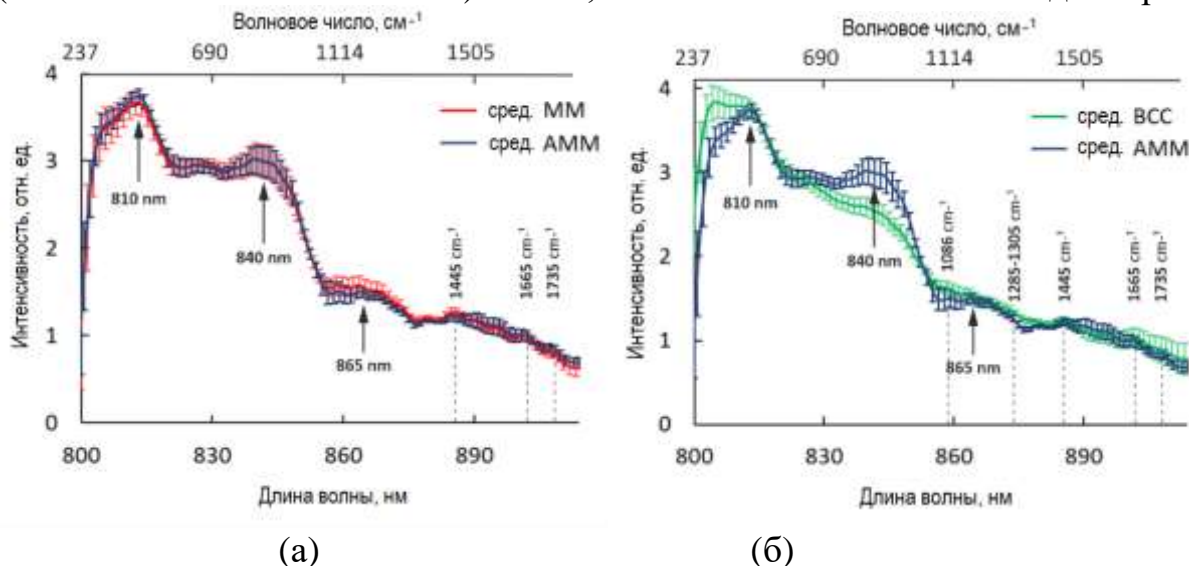


Рисунок 10 - Зарегистрированные спектры новообразований кожи, стимулированных лазером 785 нм: (а) сравнение спектров ММ и АММ, (б) сравнение ВСС и АММ.

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. 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. 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.

Средние спектры АММ и ММ 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 АММ и ММ имеют спектральные максимумы при 840 и 865 нм по сравнению с нормальной кожей и другими опухолями кожи, такими как ВСС [26]. В предыдущих главах упоминалось, что локальные максимумы при 840 и 865 нм наблюдаются в спектрах опухолей с высокой концентрацией меланина [26]. 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  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$

(P02-) в фосфолипидах и  $\tau(\text{CH}_2)$  в коллагене/фосфолипидах), как в спектрах ММ, 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 [26]. Таким образом, неясно, какие компоненты кожи, кроме меланина, вызывают высокую автофлуоресценцию при лазерной стимуляции тканей кожи с длиной волны 785 нм. Дарвин с соавт. [27] 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 о образцах тканей АММ.

Полученные результаты показывают, что спектральный анализ в ближней ИК-области позволяет определить АММ как истинную 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.

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. Группа сарком мягких тканей очень неоднородна, поскольку источником опухоли может быть подкожная ткань, различные типы сосудов, фасции и сухожилия, поперечнополосатая 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. Хотя некоторые саркомы демонстрируют агрессивное течение и склонность к сильным



гематогенным метастазам, 5-летняя относительная выживаемость около 95-99% типична для DFSP [28]. Редкость данной патологии и отсутствие четких клинических признаков вызывают недостаточную онкологическую настороженность клиницистов (онкологов, хирургов, дерматологов) и даже морфологов. Неправильно установленный диагноз способствует недостаточному объему 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. Требуются 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. Возможным способом повышения точности ранней диагностики редких новообразований кожи, в противоположность таким методам анализа как МРТ, является «оптическая биопсия» [29] с использованием Рамановской спектроскопии ткани [24]. Рассматриваемый клинический случай демонстрирует, как «оптическая биопсия» на основе РС 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 пациентки не было других новообразований или инфекционных заболеваний. Солнечные ожоги и другие повреждения кожи также отсутствовали. Во время родов пациентке 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 11 (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 пациентки позволило зарегистрировать один спектр опухоли и один спектр окружающей нормальной кожи. Участки тканей для спектрального анализа выбирал онколог, проводивший обследование пациентки. 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 РС может обеспечить диагностику DFSP в реальном времени. На рисунке 12 (б) показаны спектры Рамановского рассеяния DFSP и окружающей нормальной кожи. Белки преимущественно способствуют появлению полос в спектральном диапазоне 1220-1280, 1365, 1445 и 1665  $\text{см}^{-1}$ ; основные спектральные особенности липидов наблюдаются в полосах 1271-1301, 1445, 1650-1660  $\text{см}^{-1}$ . Одним из существенных различий между нормальной кожей и опухолями является процесс метаболизма и разрушения коллагена, который приводит к изменению полос Рамановского рассеяния около 1240, 1445 и 1665  $\text{см}^{-1}$  [12].

Рисунки 12 (б) и 12 (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) [30] 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  $\text{см}^{-1}$ , поскольку эта спектральная область DFSP демонстрирует значительно более высокую интенсивность по сравнению со злокачественными и доброкачественными опухолями кожи. Полоса Рамановского рассеяния около 1450  $\text{см}^{-1}$  может быть отнесена к изгибным колебаниям  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , к изгибным и деформационным колебаниям в белках и липидах. 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.



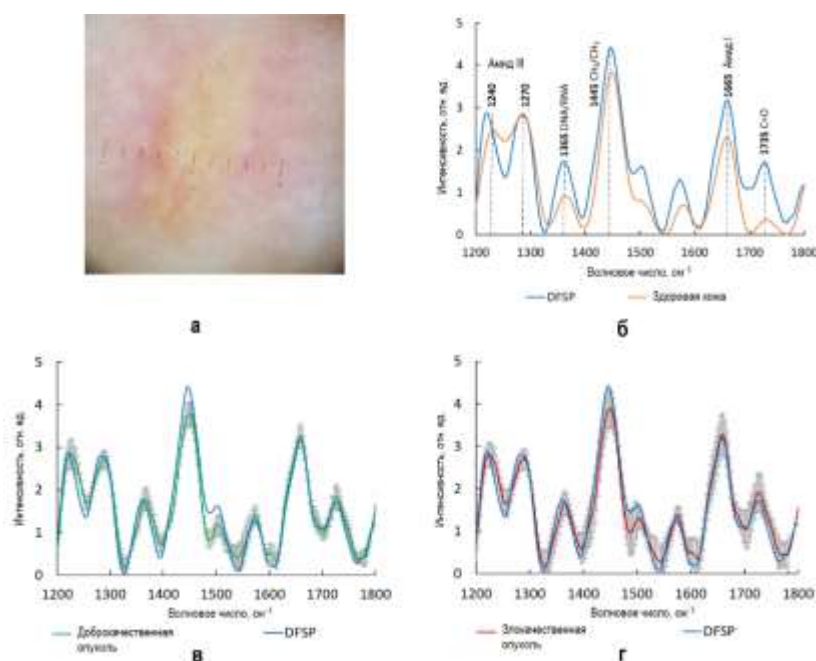


Рисунок 11 – (а) Дермоскопическое изображение DFSP (размер шкалы см<sup>-1</sup>); (б) спектры Рамановского рассеяния DFSP и окружающей нормальной кожи; (в) доброкачественные опухоли кожи; (г) злокачественные опухоли кожи; средние значения (в) и (г) взяты из работы [30]

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.

Также в главе описывает пример клинического анализа подозрительного новообразования участка кожи и то, какой путь вынужден пройти пациент, чтобы получить финальный диагноз. Использование предложенного мультимодального метода «оптической биопсии» кожи и многомерных классификаторов позволяет выявлять наличие онкологических патологий кожи в режиме реального времени, что существенно сокращает время на постановку диагноза. анализ с применением «оптической биопсии» возможен и в том числе для редких заболеваний (как AMM и DFSP), а применением предлагаемого подхода позволяет определять тип новообразований с точностью более 80%.

В Главе 6 демонстрируется применение нейросетевых классификаторов для увеличения точности классификации тканей кожи и как следствие, демонстрируется увеличение точности диагностики заболеваний. Как и в предыдущих главах, в данном разделе работы были проанализировали полные спектральные данные (содержащие данные RS и AF), поскольку ранее [30] не наблюдалось статистической разницы между анализом данных Рамановского рассеяния и объединенными данными RS и AF для тканей кожи человека. Диагностические задачи, использованные в тестах CNN классификатора, включали три дихотомических случая, идентичные описанным выше.

Каждый набор спектральных данных был разделен на обучающий набор (на котором обучается построенная модель – 80% спектрального набора данных) и тестовый набор (для оценки точности модели – 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. Перекрестная проверка позволяет определить оптимальные параметры модели разделения классов, чтобы избежать переобучения.

Решение поставленных классификационных задач с помощью глубокого обучения реализуется отдельными моделями CNN, каждая из которых соответствует отдельной задаче. 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 `Rstudio` [31]. Информативность отдельных предикторов визуализируется с помощью пакета `«vîr»` в составе программного обеспечения `Rstudio` [32]. На рисунке 12 показана схематическая диаграмма предлагаемого подхода к анализу набора спектральных данных Рамановского рассеяния и соответствующих структурных особенностей с использованием предложенной архитектуры CNN.

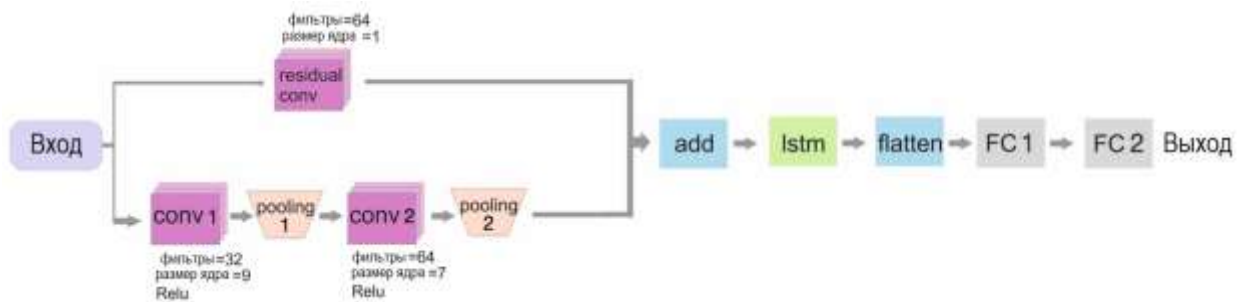


Рисунок 12 – Принципиальная схема архитектуры одномерной CNN для распознавания спектров Рамановского рассеяния и классификации тканей кожи, где: input – входной слой с выходной формой (912, 1); conv1 – одномерный сверточный слой с padding = "same" и формой вывода (912, 32); pooling1 – средний уровень 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)

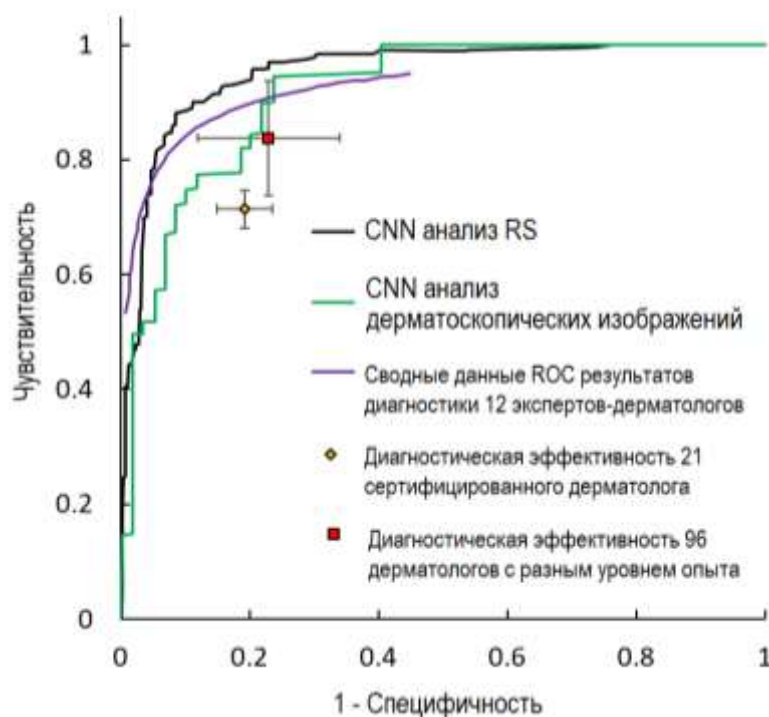
Применение CNN для анализа зашумленных Рамановских спектров приводит к повышению производительности рассматриваемой портативной Рамановской установки. Значения ROC AUC увеличились на 0,11-0,24 при различении ММ по сравнению с SK и ММ по сравнению с пигментными новообразованиями соответственно; значение 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. Полученные VIP-распределения при использовании CNN-классификатора используют информацию из полос Рамановского рассеяния как в области низких волновых чисел (до 1000 см<sup>-1</sup>), так и в области высоких волновых чисел (более 1000 см<sup>-1</sup>). Рисунки 6.5г и 6.5д демонстрируют, что анализ PLS использует информацию от широкого сигнала АФ для различения пигментированных новообразований. Только в случае распознавания злокачественных и доброкачественных новообразований PLS 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 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 [12, 25]. Однако в некоторых случаях сигнал АФ несет важную информацию для классификации тканей кожи, и его устранение влияет на точность классификации. 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».

На рисунке 13 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, демонстрируемыми 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 соавт. [33] алгоритм CNN классифицировал 60 случаев доброкачественных новообразований (30 NE, 10 SK, 10 солнечных лентиго, 5 ангиом, 5 дерматофибром) по сравнению с 40 случаями злокачественных и предзлокачественных новообразований (15 MM, 10 BCC, 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).

Рисунок 13 – 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 [33], 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 [34]. Диагностическая эффективность 21 сертифицированного



дерматолога для классификации 71 злокачественного и 40 доброкачественных новообразований была представлена в работе [35]. 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 [33]

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. 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.

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.

В **Заключении** перечислены следующие основные результаты и выводы 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 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. Исследовано применение проекции на латентные структуры (projection on latent structures – PLS) при анализе Рамановских спектров биотканей с низким соотношением сигнал-шум; данный подход 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. Предложен 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.

5. Предложен 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.

6. Разработан 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.

### **Список литературы, цитируемой в автореферате:**

1 Tuchin V. V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis*, 3rd ed. – SPIE Press, Bellingham, WA, 2015.

2 Novikov I. A., Grusha Y. O., Kiryshchenkova N. P. Autofluorescence diagnostics of skin and mucosal tumors // *Annals of ophthalmology*. – 2013. – Т. 129. – №. 5. – С. 147-153.

3 Mycek M. A., Pogue B. W. (ed.). *Handbook of biomedical fluorescence*. – CRC Press, 2003.

4 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. – Т. 8. – №. 2. – С. 127-132.

5 Pappas A. Epidermal surface lipids // *Dermato-endocrinology*. – 2009. – Т. 1. – №. 2. – С. 72-76.

6 Shu M. et al. Porphyrin metabolisms in human skin commensal *Propionibacterium acnes* bacteria: potential application to monitor human radiation risk // *Current medicinal chemistry*. – 2013. – Т. 20. – №. 4. – С. 562-568.

7 El-Sharabasy M. M. H. et al. Porphyrin metabolism in some malignant diseases // *British journal of cancer*. – 1992. – Т. 65. – №. 3. – С. 409-412.

8 Feller L. et al. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face // *Head & face medicine*. – 2016. – Т. 12. – №. 1. – С. 1-7.

9 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. – Т. 20. – №. 2. – С. 025003.

10 Zhao J. et al. Real-time Raman spectroscopy for automatic in vivo skin cancer detection: an independent validation // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2015. – Т. 407. – №. 27. – С. 8373-8379.

11 Ringnér M. What is principal component analysis? // *Nature biotechnology*. – 2008. – Т. 26. – №. 3. – С. 303-304.



- 12 Khristoforova Y. A. et al. Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by Raman and autofluorescence analysis //Journal of biophotonics. – 2019. – Т. 12. – №. 4. – С. e201800400.
- 13 ГОСТ ИЕС 60825-1-2013. Межгосударственный стандарт. Безопасность лазерной аппаратуры. – М.: Стандартинформ, 2014. – 83 с.
- 14 Kucheryavskiy S. Multivariate Data Analysis for Chemometrics //R Packag. Version 0.9. – 2018. – Т. 1.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 Chong I. G., Jun C. H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present //Chemometrics and intelligent laboratory systems. – 2005. – Т. 78. – №. 1-2. – С. 103-112.
- 18 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. – Т. 129. – С. 79-85.
- 19 Jermyn M. et al. A review of Raman spectroscopy advances with an emphasis on clinical translation challenges in oncology //Physics in Medicine & Biology. – 2016. – Т. 61. – №. 23. – С. R370.
- 20 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. – Т. 109. – №. 2. – С. 205-210.
- 21 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. – С. 95372H.
- 22 Feng X. et al. Raman biophysical markers in skin cancer diagnosis //Journal of Biomedical Optics. – 2018. – Т. 23. – №. 5. – С. 057002.
- 23 Feng X. et al. Raman active components of skin cancer //Biomedical optics express. – 2017. – Т. 8. – №. 6. – С. 2835-2850.
- 24 Lui H. et al. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis //Cancer research. – 2012. – Т. 72. – №. 10. – С. 2491-2500.
- 25 Zhao J. et al. Wavenumber selection based analysis in Raman spectroscopy improves skin cancer diagnostic specificity //Analyst. – 2016. – Т. 141. – №. 3. – С. 1034-1043.
- 26 Borisova E. G. et al. Near-infrared autofluorescence spectroscopy of pigmented benign and malignant skin lesions //Optical Engineering. – 2020. – Т. 59. – №. 6. – С. 061616.
- 27 Beyeler M., Dummer R. Cutaneous melanoma: uncommon presentations //Clinics in dermatology. – 2005. – Т. 23. – №. 6. – С. 587-592.



28 Brooks J., Ramsey M. L. Dermatofibrosarcoma protuberans. – StatPearls Publishing, 2020.

29 Alfano R., Pu Y. Optical biopsy for cancer detection //Lasers for Medical Applications. – Woodhead Publishing, 2013. – С. 325-367.

30 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.

31 Yan H. et al. Diverse region-based CNN for tongue squamous cell carcinoma classification with Raman spectroscopy //IEEE Access. – 2020. – Т. 8. – С. 127313-127328.

32 Wang P. et al. Discrimination of blood species using Raman spectroscopy combined with a recurrent neural network //OSA Continuum. – 2021. – Т. 4. – №. 2. – С. 672-687.

33 Goyal M. et al. Artificial intelligence-based image classification methods for diagnosis of skin cancer: Challenges and opportunities //Computers in Biology and Medicine. – 2020. – Т. 127. – С. 104065.

34 Zhang N. et al. Skin cancer diagnosis based on optimized convolutional neural network //Artificial intelligence in medicine. – 2020. – Т. 102. – С. 101756.

35 Tang J. W. et al. Comparative Analysis of Machine Learning Algorithms on Surface Enhanced Raman Spectra of Clinical Staphylococcus Species //Frontiers in Microbiology. – 2021. – Т. 12.

#### **Список основных работ, опубликованных по теме диссертации (\*):**

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.

*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 CO<sub>2</sub> ablative fractional laser surgery on acne scars" // *Skin Research and Technology*. – 2019. – Т. 26. – №. 1. – С. 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., Kristoforova 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.

19Lykina 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

20Shamina 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

21Bourdine 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.

22Khristorova 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.

23Shamina 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.

24Bourdine 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.

25Lykina 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.

26Shamina 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.

27Bratchenko 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.

28Lykina 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.

29Bourdine 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.

30Lykina 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.

31Khristoforova 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.

32Khristoforova 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.

33Borisova 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.

34Bratchenko 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.

35Zakharov 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.

36Khristoforova 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.

37Khristoforova 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.

38Borisova 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.

39Matveeva 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.

40Bratchenko 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.

41Matveeva 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.

42Artemyev 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.

43Matveeva 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.

44Serzhantov 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.

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

46Khristoforova 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.

47Matveeva 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.

48Mircheva 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.

49Zakharov 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. – C. 70-76.

50Bratchenko 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.

51Khristoforova 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. – C. 186-192.

52Lykina 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. – C. 020309.

53Shamina 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. – C. 020308.

54Bratchenko 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. – C. 5-12.

55Bratchenko 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. – C. 040301.

56Konovalov 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. – C. 040302.

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