

***In vivo* исследование комбинационного рассеяния и флуоресценции пигментных новообразований кожи**

**Ю.А. Христофорова¹, И.А. Братченко¹, Л.А. Шамина¹, С.Г. Коновалов¹,
А.А. Андреева², А.А. Морятов², Д.А. Кассиров², А.Е. Орлов², С.В. Козлов²,
В.П. Захаров¹**

¹Самарский национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева, Московское шоссе 34, Самара, Россия, 443086

²Самарский государственный медицинский университет, Чапаевская 89, Самара, Россия, 443099

Аннотация. В работе была проведена классификация пигментных новообразований кожи на основании спектральных признаков комбинационного рассеяния и автофлуоресценции. Регистрация спектров осуществлялась в клинических условиях с использованием портативного спектроскопического оборудования. Исследование спектров новообразований кожи осуществлялось с использованием мультивариативного анализа данных PLS-DA. Эффективность предложенного подхода определена с помощью 84% чувствительности и 76% специфичности

1. Введение

Злокачественная меланома кожи – это самая агрессивная опухоль кожи, которая является причиной более 76% смертей от всех случаев рака кожи. Ежегодно частота заболеваемости меланомой стремительно увеличивается во всех странах мира. Важную роль в этиологии меланомы играют предшествующие невусы и пигментные образования. С увеличением числа пигментных невусов риск меланомы возрастает. Так, развитие меланомы из невусов и пигментных образований наблюдается в более 60% случаев [1], поскольку именно скопление меланиноцитов являются областью, на которой возникает меланома.

Эффективность выздоровления пациента после хирургического иссечения меланомы определяется стадией развития опухоли. Так, 5-летняя выживаемость после удаления опухоли на I стадии составляет 98%. На последней стадии заболевания только 5-15% больных, несмотря на самое современное противоопухолевое лечение, переживают первое пятилетие. Поэтому одним из важнейших факторов благоприятного выздоровления больных является постановка верного предварительного диагноза на ранней стадии развития опухоли. Среди успешно развивающихся методов в области неинвазивной диагностики рака кожи можно выделить метод комбинационного рассеяния (КР) [2].

Метод спектроскопии КР, основанный на изменении длины волны зондирующего излучения после взаимодействия с молекулами исследуемого объекта, позволяет с высокой точностью определять наличие химических соединений в исследуемом образце. Принцип КР для исследования рака основан на том, что развитие опухоли сопровождается химическим и структурным изменениями тканей кожи на молекулярном уровне. Эти изменения отражаются в спектрах КР, которые уникальны для каждого молекулярного соединения. Сравнение спектров

КР различных патологий кожи обеспечивает возможность их дифференциальной диагностики. Сигнал КР регистрируется совместно с флуоресцентным откликом при возбуждении биоткани лазерным источником в ближней инфракрасной области. Поэтому анализ всего зарегистрированного спектра, который включает сигналы КР и флуоресценции, позволяет одновременно учитывать как биохимические, так и структурные особенности различных типов новообразований кожи [3].

К настоящему времени до конца не изучено, как происходит перерождение пигментных новообразований в меланому [4]. Даже незначительные изменения внешних морфологических особенностей могут стать признаком развития злокачественной опухоли. Применение спектроскопических методов для исследования новообразований кожи оправдано их чувствительностью к изменениям биохимического состава. Поэтому в данной работе было предложено исследовать возможность дифференциальной оптической диагностики меланоцитарных образований. Целью данной работы является применение спектроскопии комбинационного рассеяния и флуоресценции для получения спектральной информации исследуемых образований, которая может быть полезна и информативна для дифференциации пигментных новообразований кожи.

2. Материалы и методы

2.1. Экспериментальная установка и исследуемые новообразования

In vivo исследование новообразований кожи проводилось с использованием экспериментального оборудования, которое включает в себя термостабилизированный полупроводниковый лазерный модуль LML-785.0RB-04 (центральная длина волны $785 \pm 0,1$ нм, 150 мВт), портативный спектрометр QE6500, включающий матричный ПЗС-детектор с термоэлектрическим охлаждением до -15°C , оптический пробник inPhotonics. Подробное описание установки представлено в работе [5].

В данной системе используется компактный спектрометр QE65000 Pro, Ocean Optics Inc. Охлаждаемый до -15°C детектор обеспечивает низкий уровень шума и темнового сигнала. Регистрация сигнала проводилась в диапазоне 780-1000 нм, спектральное разрешение 0,2 нм.

В данной работе были исследованы 32 злокачественные меланомы, 11 меланоцитарных дисплазий, 20 пигментных невусов. Проводимые экспериментальные исследования были одобрены этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ).

2.2. Методы анализа спектральных данных

Зарегистрированные спектры новообразований представляют собой сочетание сигналов комбинационного рассеяния и флуоресценции. Анализ спектральных данных проводился в диапазоне 803-950 нм. Предварительная обработка зарегистрированных спектров биоткани включает в себя полиномиальную аппроксимацию, сглаживание спектра с помощью фильтра Савицкого Голея, стандартной нормировки и центрирования данных.

В данной работе для классификации различных типов новообразований применялся статистический метод проекций на латентные структуры с линейным дискриминантным анализом PLS-DA [6]. PLS-DA анализ позволяет создать проекционную модель, которая определяет принадлежность спектров к той или иной группе новообразований на основании выделенных спектральных различий. Наиболее информативные спектральные области, на основании которых осуществляется классификация спектров различных типов новообразований, выделяются с помощью анализа важности независимых переменных в проекции (VIP) [7].

Результаты дифференциации меланомы и остальных новообразований кожи были представлены с помощью диаграммы размаха, по оси ординат которой откладывалось значение PLS предсказателя, и кривой ошибок (receiving operating curve, ROC). Для количественного анализа ROC кривых используется значение площади под кривой (area under ROC curve, ROC AUC).

Многомерный анализ спектральных данных осуществлялся в облачном программном обеспечении TPTcloudbeta (<https://tptcloud.com>).

3. Результаты и обсуждения

В данной работе была проведена дифференциация спектров меланомы ($n=32$) и меланоцитарных новообразований, в которую были включены пигментные невусы ($n=20$) и меланоцитарные дисплазии ($n=11$). Типичный спектр меланомы, включающий флуоресцентный и КР сигналы, представлен на рисунке 1. На рисунке 2 представлен анализ важности независимых переменных VIP, согласно которому были выделены области с максимальными спектральными различиями между рассматриваемыми классами образований кожи. Учитывая, что зарегистрированный спектр одновременно включает в себя сигналы флуоресценции и КР, то для удобства по оси абсциссы на VIP спектре представлены значения длин волн и волновых чисел, поскольку для описания флуоресцентного сигнала используются нанометры (нм), а для сигнала КР – обратные сантиметры (см^{-1}).

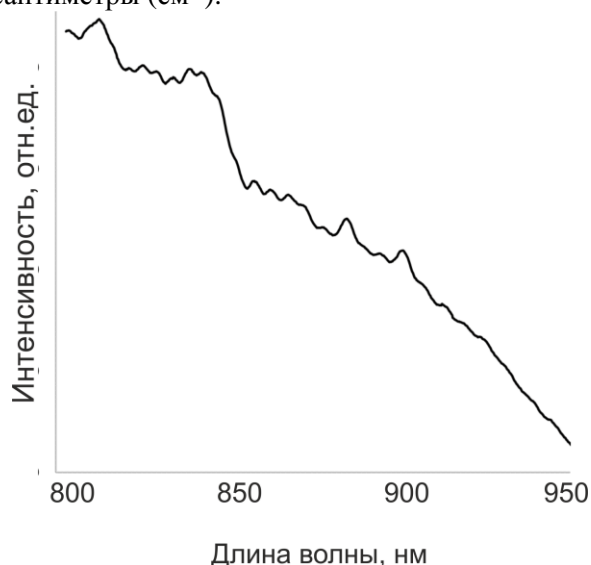


Рисунок 1. Зарегистрированный спектр меланомы.



Рисунок 2. VIP анализ дифференциации меланомы и доброкачественных пигментных образований.

Как показывает анализ важности независимых переменных наибольший вклад в дифференциацию спектров пигментных новообразований и меланом вносят спектральные различия в области 800-860 нм. Об этом свидетельствует интенсивность полос проведенного VIP анализа. В данной спектральной области сильный флуоресцентный фон подавляет сигнал КР. Помимо того, что сигнал КР по своей природе является слабым сигналом [8], также

спектры меланоцитарных новообразований за счет сильной флуоресценции меланина в ближней ИК области [9] характеризуются очень высоким уровнем АФ интенсивности. Поэтому уровень относительной интенсивности сигнала флуоресценции не является информативным диагностическим критерием пигментных новообразований между собой. Более важным параметром являются особенности формы АФ спектра, которая характеризуется наличием локальных максимумов.

Спектры КР биотканей, как правило, характеризуются наличием полос: 1240-1290 см^{-1} (продольная мода $\text{C} = \text{N}$) (двойной пик), 1330-1360 см^{-1} (крутильные колебания, веерная мода изгибных колебаний CH_2), 1450 см^{-1} (CH_2 связь в протеинах и липидах), 1530-1550 см^{-1} (компоненты крови), 1620-1660 см^{-1} (продольная мода $\text{C} = \text{O}$ Амида I) см^{-1} . При этом информативные спектральные различия сигнала КР наблюдаются в полосах 1176, 1234, 1630, 1820 см^{-1} . Интересно отметить, что одним из ключевых пиков КР является полоса 1440-1460 см^{-1} , однако спектральные различия в данной области не являются информативными при дифференциации пигментных новообразований.

На основании выделенных спектральных различий спектры меланомы и доброкачественных пигментных образований были дифференцированы с чувствительностью и специфичностью 84% и 76%.

В предыдущих наших исследованиях точность разделения меланом и невусов при использовании только критерия уровня интенсивности флуоресценции не превышала 52% [10]. В свою очередь, в работе [11] была достигнута более высокая точность дифференциации меланом и невусов (около 80%) по уровню интенсивности АФ в видимой области спектра за счет использования интенсивных УФ источников возбуждения, а также строгого позиционирования оптического датчика для минимизации погрешности регистрации АФ сигналов. В данной работе нам удалось получить также более высокую точность классификации меланомы и пигментных новообразований кожи (81%) за счет одновременного применения мультивариативного анализа спектральных данных КР и флуоресценции.

4. Выводы

Анализ особенностей комбинационного рассеяния и флуоресценции пигментных новообразований кожи методом PLS учитывает широкий набор изменений структурных компонентов биотканей. Однако, учитывая, что пигментные образования кожи характеризуются высокой концентрацией клеток, продуцирующих меланин, их дифференциация усложняется за счет того, что сильная флуоресценция меланина значительно перекрывает вклад других хромофоров кожи. Таким образом, данный подход позволил нам достичь 81% точность дифференциации меланомы и доброкачественных опухолей.

5. Литература

- [1] Bologna, J.L. *Dermatology* / J.L. Bologna, J.L. Jorizzo, J.V. Schaffer. – Elsevier Saunders, 4rd ed., 2017.
- [2] Lui, H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis / H. Lui, J. Zhao, D. McLean, H. Zeng // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72(10). – P. 2491-2500.
- [3] Cicchi, R. Combined fluorescence-Raman spectroscopic setup for the diagnosis of melanocytic lesions / R. Cicchi, A. Cosci, S. Rossari, D. Kapsokalyvas, E. Baria, V. Maio, D. Massi, V. De Giorgi, N. Pimpinelli, F. S. Pavone // *Journal of Biophotonics.* – 2013. – Vol. 7(1-2). – P. 86-95.
- [4] Borgenvik, T. Blue nevus-like and blue nevus-associated melanoma: a comprehensive review of the literature / T.L. Borgenvik, T.M. Karlsvik, S. Ray, M. Fawzy, N. James // *ANZ Journal of Surgery.* – 2017. Vol. – 87. – P. 345-349.
- [5] Bratchenko, I. Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions / I. Bratchenko, D. Artemyev, O. Myakinin, Yu. Khristoforova, A. Moryatov, S. Kozlov, V. Zakharov // *JBO.* – 2017. – Vol. 22. – P. 027005.
- [6] Wold, S. PLS-regression: a basic tool of chemometrics / S. Wold, M. Sjöstroma, L. Eriksson // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* – 2001. – Vol. 58(2). – P. 109-130.

- [7] Frank, E. Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic Regression, and Survival Analysis / E. Frank. – New York: Springer, 2001. – 582 p.
- [8] Austin, L. Raman technologies in cancer diagnostics / L.A. Austin, S. Osseiran, C.L. Evans // *The Analyst*. – 2016. – Vol. 141. – P. 476-503.
- [9] del Rosal, B. Strategies to Overcome Autofluorescence in Nanoprobe-Driven In Vivo Fluorescence Imaging / B. del Rosal, A. Benayas // *Small Methods*. – 2018. – Vol. 2(9). – P. 1800075.
- [10] Khristoforova, Y. Method of autofluorescence diagnostics of skin neoplasms in the near infrared region / Y. Khristoforova, I. Bratchenko, D. Artemyev, O. Myakinin, S. Kozlov, A. Moryatov, V. Zakharov // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. – 2015. – Vol. 1. – P. 186-192.
- [11] Borisova, E. Autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy of pigment disorders in human skin / E.G. Borisova, E. Nikolova, P.P. Troyanova, L.A. Avramov // *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. – 2008. – Vol. 10. – P. 717-722.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ.

***In vivo* Raman and autofluorescence study of the pigmented skin neoplasms**

Y. Khristoforova¹, I. Bratchenko¹, L. Shamina¹, S. Konovakov¹, A. Andreeva², A. Moryatov², D. Kassirov², A. Orlov², S. Kozlov², V.P. Zakharov¹

¹Samara National Research University, Moskovskoe Shosse 34A, Samara, Russia, 443086

²Samara State Medical University, Chapayevskaya 89, Samara, Russia, 443099

Abstract. This paper studies classification of the pigmented skin neoplasms on the basis of the spectral Raman and autofluorescence features. The spectra registration was performed by means of the portable spectroscopic system in the clinical application. The neoplasm spectra study was carried out using by multivariate analysis PLS-DA. The efficiency of the proposed method was expressed by the 84% sensitivity and 76% specificity.