

**Артемьев Дмитрий Николаевич**

**АНАЛИЗ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ  
И АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОПТИЧЕСКИХ НЕОДНОРОДНОСТЕЙ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД**

01.04.05 – Оптика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата физико-математических наук

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» на кафедре лазерных и биотехнических систем.

**Научный руководитель:**

**Захаров Валерий Павлович**, доктор физико-математических наук, профессор.

**Официальные оппоненты:**

**Зимняков Дмитрий Александрович**, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», кафедра «Физика», заведующий кафедрой;

**Майорова Александра Михайловна**, кандидат физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, старший научный сотрудник.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Защита состоится 19 ноября 2019 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.215.01 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», по адресу: 443086, г. Самара, Московское шоссе, д. 34.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» по электронному адресу: [http://www.ssau.ru/resources/dis\\_protection/artemyev/](http://www.ssau.ru/resources/dis_protection/artemyev/).

Автореферат разослан

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 212.215.01  
д.ф.-м.н., доцент

Колпаков В.А.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы.**

Анализ взаимодействия оптического излучения с биологическими средами имеет важное значение для понимания происходящих в них процессов, обнаружения и интерпретации оптических неоднородностей, выявления их типа на основе изменения оптических свойств неоднородности по сравнению с окружающей средой. Следует отметить, что биологические среды характеризуются многокомпонентным составом с высокой вариабельностью характеристик, а многократность рассеяния приводит к диффузии электромагнитной энергии, что существенно осложняет визуализацию оптических неоднородностей. Более того, во многих практически интересных случаях неоднородности биологических сред проявляются в перераспределении энергии в спектральном пространстве за счет собственной флуоресценции и нелинейного характера рассеяния при практически неизменном показателе преломления, что исключает рефракционную их визуализацию. Это особенно ярко проявляется в начальной стадии патологических процессов, когда изменение биохимических свойств еще не приводит к изменению оптической плотности среды, но проявляется на микроскопическом уровне в изменении ее спектральных свойств. В этом случае оптическая диагностика патологий биологической ткани сводится к обнаружению и анализу спектральных неоднородностей флуоресценции и комбинационного рассеяния с последующим восстановлением на их основе изменений физико-химических свойств среды и определения типа неоднородности.

### **Степень разработанности темы.**

Прогресс в области фотоники стимулировал разработку методов флуоресцентного анализа, спектроскопии обратного и комбинационного рассеяния, которые позволяют определять химические различия компонент многослойных сред. Большой вклад в понимание оптических свойств биологических тканей внесли работы Chance, Patterson, Jacques, Гучина.

Большое внимание при разработке флуоресцентных методов анализа неоднородностей биологических тканей уделяется применению флуоресцентных маркеров (Lakowicz, Pierscionek, van Best, Yu, Denk), которые накапливаются в клетках за счет соответствующих биохимических реакций. Однако, более интересным является применение методик, использующих собственную флуоресценцию (автофлуоресценцию - АФ) химических компонентов биологических тканей. Это позволяет строить алгоритмы обнаружения оптических неоднородностей, которые могут применяться при скрининге и мониторинге патологических состояний организма без использования специализированных маркеров.

Интенсивность полос комбинационного рассеяния (КР) зависит от концентрации веществ, их структуры и внешних связей (Mahadevan-Jansen, 1996; Morris, 1999, 2000), соответственно, изменение положения и интенсивностей полос позволяет выявить отклонения в компонентном составе от нормальных значений, которые являются характерными оптическими признаками патологических неоднородностей биологических многослойных сред. Основным ограничением в использовании методов спектроскопии комбинационного рассеяния является низкая интенсивность сигнала. Спектры флуоресценции естественных и патологических неоднородностей часто слабо различаются из-за низкой концентрации характерных биомаркеров и перекрытия их спектров, что требует привлечения специализированных методов обработки регистрируемых оптических сигналов.

Существенная вариабельность физико-химических и оптических свойств биологических тканей в норме также затрудняет правильную классификацию обнаруживаемых неоднородностей. Кроме этого, оптические неоднородности

биологических сред могут иметь персональные топологические особенности из-за строения тканей. Для оценки эффективности спектральных методов в задачах классификации традиционно используют понятия чувствительность, специфичность и точность. Чувствительность метода – это отношение числа правильно определенных типов оптических неоднородностей («патологий»), к общему числу «патологий». Специфичность – отношение числа правильно определенных состояний нормы биологической среды («здоровых») к общему числу «здоровых». Точность – отношение числа правильно определенных типов обнаруженных оптических неоднородностей (и «патологически» и «здоровых») к общему числу зарегистрированных неоднородностей.

В последнее время в разных научных группах для повышения информативности анализа биологических сред предложен мультимодальный подход, объединяющий несколько оптических методов для одновременного определения оптических признаков неоднородностей: спектроскопия обратного рассеяния и АФ (Borisova, 2008; Zhu, 2014), АФ и спектроскопия КР (Huang, 2005; Van Manen, 2005; Захаров, 2017), спектроскопия КР и оптическая когерентная томография (Mahadevan-Jansen, 2008; Varkentin, 2018; Захаров, 2015). В частности, научной группой Tunnell были исследованы диагностические возможности методов обратного рассеяния, АФ (возбуждение излучением с длиной волны 337 нм) и КР (возбуждение излучением с длиной волны 830 нм) по дискриминации новообразований кожи. Было протестировано более 130 образцов новообразований, точность разделения которых составила 87%. Группой Ravone была продемонстрирована возможность разделения классов меланоцинарных новообразований кожи с чувствительностью 89% при одновременном анализе КР, возбуждаемого лазерным излучением 785 нм, и АФ, возбуждаемой излучением УФ, видимого и ИК диапазонов. Однако, при переходе только к ИК возбуждению чувствительность снижалась до 56%. Кроме того, не учитывались индивидуальные спектральные особенности среды, которые в силу высокой вариативности оптических свойств биологических сред в норме могут приводить к снижению точности диагностики.

В целом мультимодальный подход повышает точность обнаружения и классификации патологических неоднородностей на 10-20%. Однако, одновременно с этим увеличивается объем обрабатываемой информации, что входит в противоречие с требованием обеспечения режима диагностики реального времени. Разрешение данного противоречия возможно за счет понижения размерности пространства анализа путем согласования режимов работы различных методов и разработки быстрых алгоритмов оптического выделения критериальных спектральных признаков и особенностей, позволяющих обнаружить и правильно классифицировать оптическую неоднородность.

#### **Цель диссертационной работы.**

Исследование характеристик комбинационного рассеяния и автофлуоресценции оптических неоднородностей биологических сред и разработка многокритериального метода определения типа неоднородности, учитывающего естественные вариации спектральных особенностей биологических сред в нормальном состоянии.

#### **Задачи диссертационной работы.**

1. Экспериментальное исследование и математическое моделирование автофлуоресценции биологических тканей с различными типами новообразований, представляющие собой оптические неоднородности, в видимой (550-750 нм) и ближней инфракрасной (800-925 нм) областях спектра для выявления физических факторов, влияющих на изменения спектра, и формирования на их основе мультиспектральных оптических критериев классификации неоднородностей.

2. Экспериментальное исследование комбинационного рассеяния неоднородностей биологических тканей для определения спектральных количественных критериев обнаружения конкретного типа новообразования на основании перераспределения интенсивностей полос спектра комбинационного рассеяния в области неоднородности по сравнению с нормальной тканью.

3. Разработка метода многокритериального спектрального анализа неоднородностей биологических сред в многомерном пространстве критериев автофлуоресценции и комбинационного рассеяния в видимой (550-750 нм) и ближней инфракрасной (800-925 нм) областях спектра для детектирования неоднородностей и определения их типа.

**Научная новизна.** В диссертационной работе впервые получены следующие результаты.

1. Установлены количественные характеристики изменения формы автофлуоресцентных спектров неоднородностей биологических сред: соотношения интенсивностей в полосах 570-590 нм и 610-670 нм, смещения положения локального максимума в видимой области, величины кривизны экспоненциальной аппроксимирующей функции в ближней инфракрасной области (800-925 нм). Показано, что спектральные изменения вызваны различной концентрацией и локализацией основных флуорофоров ткани (порфиринов, флавинов, липидов и меланина), а совместный анализ изменений в обеих областях спектра позволяет определить тип неоднородности с точностью 80-85%.

2. Предложен двухстадийный метод анализа комбинационного рассеяния тканей кожи и легкого с последовательным выделением области с патологическими неоднородностями на основании изменения соотношения интенсивностей полос спектра комбинационного рассеяния 1320, 1450, 1660  $\text{см}^{-1}$ , в основном связанными с изменением соотношения липидов и белков, и последующем определением спектрального контраста полос комбинационного рассеяния по отношению к нормальной ткани. Экспериментально показано повышение точности определения типа неоднородности на 5-10% в зависимости от типа новообразования и инвариантность метода к размеру неоднородности и естественной вариации оптических свойств нормальной ткани.

3. Предложен многокритериальный метод анализа и классификации неоднородностей в шестимерном пространстве спектральных критериев комбинационного рассеяния, автофлуоресценции в видимой (550-750 нм), и ближней ИК (800-925 нм) областях. Показано, что слабая взаимная корреляция введенных спектральных критериев обеспечивает точность многокритериального метода определения типа неоднородности 97%, а при использовании только ИК источника возбуждения (785 нм) - 94%, что на 7-11% больше чем для каждого из спектральных методов по отдельности.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Количественные характеристики изменения формы автофлуоресцентных спектров в области неоднородностей биологических сред: соотношение спектральных интенсивностей в областях 570-590 нм и 610-670 нм, смещение локального максимума в видимой области, обусловленные влиянием липоигментов, флавинов и порфиринов; изменение знака и увеличение кривизны экспоненциальной кривой аппроксимирующей функции АФ в ближней инфракрасной области (800-925 нм) при увеличении меланина.

2. Двухстадийный метод анализа комбинационного рассеяния и определения типа патологических неоднородностей кожи и легкого по изменению соотношения интенсивностей полос 1300-1340, 1430-1460, 1640-1680  $\text{см}^{-1}$  в области новообразования

и их контраста по отношению к окружающей нормальной ткани, повышающий точность диагностики на 5-10% и инвариантный к размеру неоднородности и естественной вариации оптических свойств среды.

3. Многокритериальный метод анализа комбинационного рассеяния и автофлуоресценции оптических неоднородностей биологических тканей, обеспечивающий точность определения типа неоднородности 97% в шестимерном пространстве спектральных критериев в видимой (550-750 нм) и ближней ИК (800-925 нм) областях, а при использовании только ИК источника возбуждения - 94% в четырехмерном пространстве критериев.

**Практическая значимость.** Результаты работы могут найти применение при разработке методов диагностики состояния биологических сред, использующих анализ АФ и КР. Разработанный мультимодальный метод анализа автофлуоресценции и комбинационного рассеяния новообразований биологических тканей позволяет обследовать большие участки тканей (несколько см) и проводить уточняющий контроль состояния биотканей в подозрительной области. Данный метод может быть применен для создания систем скрининг-обследования, локализации и определения типа новообразования.

Практическая значимость работы подтверждается получением патента на изобретение «Способ неинвазивной дифференциальной диагностики новообразований кожи» (дата приоритета 25.10.2013, № 2551978), основанный на методе спектроскопии комбинационного рассеяния.

**Достоверность полученных результатов.** Достоверность полученных в работе результатов подтверждается качественным согласованием данных численного моделирования с экспериментально наблюдаемыми зависимостями, сравнением полученных результатов с результатами научных работ других авторов.

**Методы исследований.** В работе использовались апробированные методики исследования. Перед постановкой эксперимента предварительно проводилось математическое моделирование процессов. Для численного моделирования и статистического анализа использовались пакеты Wolfram Mathematica, TracePro®. Измерение характеристик и физических величин в ходе экспериментов производилось с помощью сертифицированных приборов на базе экспериментального стенда, разработанного автором.

**Личный вклад автора.** Изложенные в диссертации оригинальные результаты получены соискателем, либо при его непосредственном участии. Соискателем самостоятельно проводились вычислительные эксперименты, разрабатывались методы и теоретические модели. В частности, соискатель является одним из основных разработчиков метода двухстадийного фазового анализа комбинационного рассеяния и мультимодального анализа автофлуоресценции и комбинационного рассеяния в многомерном пространстве критериев. Постановка задач и обсуждение результатов проводились совместно с научным руководителем.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 36 научных работ, 16 статей в научных журналах и изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, в том числе 15 статей, рецензируемых базой данных Scopus и WoS, для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

**Апробация результатов диссертации** проводилась на следующих научно-технических конференциях: XI и XII Самарский конкурс-конференция научных работ студентов и молодых исследователей по оптике и лазерной физике, г. Самара (2013, 2014 гг.); XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII международные конференции для молодых ученых и студентов Saratov Fall Meeting –International School for Junior Scientists and

Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, г. Саратов (2013-2018 гг.); международная конференция ICONO/LAT 2013 (International Conference on Coherent and Nonlinear Optics, Conference on Lasers, Applications, and Technologies) – 2013 г., г. Москва; международная конференция Photonics Europe – 2014, 2016 и 2018 гг., г. Брюссель, Бельгия; международная конференция Applied Laser Technologies – 2015г., г. Фаро, Португалия; международная конференция ECBO (European Congress on Biomedical Optics) – 2015 г., г. Мюнхен, Германия; XVII международная конференция Laser Optics – 2016 г., г. Санкт-Петербург; III и IV Международные конференции «Информационные технологии и нанотехнологии» (ИТНТ-2018), 2017-2018 гг., г. Самара.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, библиографического списка, включающего 218 наименований. Работа изложена на 155 листах машинописного текста, содержит 37 рисунков, 11 таблиц.

### **Содержание работы**

**Во введении** обоснована актуальность выбранной темы, приведён обзор существующих работ, сформулированы цель и задачи исследования, изложены основные результаты работы, их научная новизна, приведены положения, выносимые на защиту, описана структура диссертации.

**Первая глава** посвящена обоснованию необходимости использования совместного анализа комбинационного рассеяния и автофлуоресценции для идентификации оптических неоднородностей биологических сред.

Многочратно рассеивающие среды – среды, в которых распространение излучения сопровождается значительным рассеянием, влияющим на условия его распространения. Рассеяние излучения в такой среде происходит на её оптических неоднородностях, различных частицах и включениях. Оптические неоднородности можно условно разделить на два класса: рефракционные (неоднородности показателя преломления из-за изменения плотности ткани) и «иммерсионные» (характерны для патологий из-за неоднородного распределения компонентов среды или конформационных изменений их пространственной структуры и химических связей). Для контроля рефракционных неоднородностей используют методы рассеяния и визуализации (диффузная оптическая томография, оптическая когерентная томография). Для иммерсионных неоднородностей характерны как правило мелкомасштабные изменения: перераспределения концентраций липидов, белков и ДНК/РНК внутри клеток. Поэтому их практически невозможно обнаружить традиционными способами (ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография). Таким образом для контроля иммерсионных неоднородностей применяются спектральные методы: спектроскопия обратного рассеяния, анализ автофлуоресценции, спектроскопия комбинационного рассеяния.

Флуоресцентная спектроскопия (ФС) неоднократно использовалась для обнаружения и исследования оптических неоднородностей и дефектов в различных средах: оптические материалы (кристаллы), растения, биологические ткани. В данной работе представлены результаты исследования патологических неоднородностей биологических сред с использованием анализа автофлуоресценции. Автофлуоресцентная спектроскопия может использоваться для обнаружения неоднородностей в биологических тканях из-за ее высокой чувствительности, простоты методики измерения, отсутствия необходимости применения контрастных агентов и возможности измерения в режиме реального времени. АФ сигнал зависит от длины волны индуцированного лазерного излучения. Большинство исследований для

регистрации и оценки сигналов АФ биологических тканей выполняются с использованием возбуждающего излучения в спектральной области 330-460 нм (в диссертационном исследовании использовалось лазерное излучение с длиной волны 457 нм). Спектры поглощения эндогенных флуорофоров, таких как структурные белки, коферменты, витамины, эндогенные порфирины, липопигменты, расположены в данном спектральном диапазоне. Возбуждение в ближней ИК области используется для оценки АФ сигнала меланина (возбуждающее излучение с длиной волны 785 нм). Таким образом форма АФ спектра зависит от компонентного состава исследуемых объектов, и ее количественная оценка может являться критериальной нормой для идентификации патологических неоднородностей.

Спектроскопия комбинационного рассеяния представляет собой оптический метод без использования меток, с возможностью неинвазивного получения информации о молекулярном строении биологической ткани. В данной работе использовалось узкополосное лазерное излучение с длиной волны 785 нм из-за низкого фонового сигнала АФ. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР) используется для исследования различных областях. Так в физике твердых тел особенности КР позволяют обнаруживать и анализировать неоднородности полупроводников, керамики, тонких пленок, углеродных структур (графит, графен, нанотрубки). В биомедицинских исследованиях наибольший интерес вызывает обнаружение патологических неоднородностей биотканей, ответственных за возникновение злокачественных новообразований. При этом время регистрации сигнала КР существенно больше по сравнению с АФ (с долей секунды до десятков секунд и минут).

В последнее время в разных научных группах для повышения информативности анализа биологических сред предложен мультимодальный подход, объединяющий несколько оптических методов: спектроскопии обратного рассеяния и флуоресценции, флуоресценции и СКР, СКР и оптической когерентной томографии. Мультимодальный подход повышает точность обнаружения и классификации патологических неоднородностей на 10-20%. При этом увеличивается объем обрабатываемой информации, который может быть сокращен за счет понижения размерности пространства анализа путем согласования режимов работы и использования основных спектральных критериев для обнаружения и классификации неоднородности.

**Во второй главе** описываются результаты исследования автофлуоресценции в видимой (550-750 нм) и ближней ИК (800-925 нм) областях двух классов многослойных сред с многократным рассеянием (ткани кожи и легкого) с оптическими неоднородностями. Для интерпретации экспериментальных АФ спектров было проведено численное моделирование АФ в модели кожи с набором основных флуорофоров. Был проведен анализ возможности АФ методов для разделения типов неоднородностей, которые являются индикаторами патологических состояний тканей.

Регистрируемые данные АФ и КР имели различную форму и интенсивность, обладали собственными спектральными особенностями и могли варьироваться для образцов тканей различных тканей. Поэтому в данной работе было проанализировано три типа спектральных данных: АФ в видимой области (возбуждение 457 нм), АФ и КР сигналы в БИК области (возбуждение 785 нм). Лабораторная установка представлена на рисунке 1, она сочетает в себе принципы СКР и АФ анализа биологических тканей. Установка включает в себя термостабилизированный полупроводниковый лазерный модуль NIR LML-785.ORB-04 (центральная длина волны  $785 \pm 0,1$  нм, мощность 150 мВт) для возбуждения спектров КР и АФ в БИК области и твердотельный лазерный модуль с диодной накачкой (457 нм, 50 мВт) для индуцирования АФ в видимой области. Лазерное излучение с длиной волны 785 нм проходит через узкополосный фильтр

(BPF), который отсекает паразитный вклад КР оптического волокна. Первое ( $DM_1$ ) и второе ( $DM_2$ ) дихроичные зеркала направляют лазерное излучение 785 и 457 нм на линзу  $L_3$ , которая фокусирует возбуждающее излучение на образец. Та же линза  $L_3$  собирает обратно рассеянное излучение, которое включает в себя упругое рассеяние, АФ и КР. Дихроичное зеркало  $DM_3$  расщепляет собранное излучение на каналы видимого и ближнего ИК диапазонов, которые включают соответствующие широкополосные (отрезающие) фильтры ( $LPF_1/LPF_2$ ) для подавления возбуждающего (ближнего ИК / видимого) лазерного излучения. Излучение по многомодовому волокну направляется на спектрограф Shamrock SR-500i-D1-R (спектральное разрешение 0,05 нм) с цифровой камерой Andor iDus CCD DU416A-LDC-DD, охлажденной до  $-65^\circ\text{C}$ .

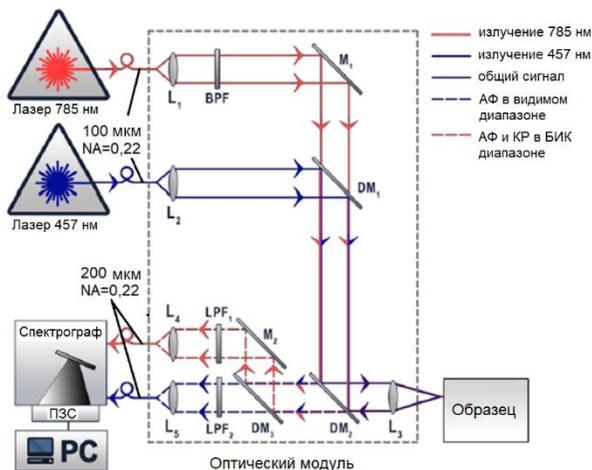


Рисунок 1 – Оптическая схема экспериментальной установки для регистрации КР и АФ биологических тканей

Оптический зонд с системой фильтрации излучения располагался вертикально непосредственно над образцом ткани на расстоянии 7-8 мм. Диаметр луча зондирующего излучения на ткани составлял 1 мм. Глубина проникновения излучения составляла около 1 мм для излучения с длиной волны 457 нм и около 3 мм для 785 нм. Время сбора данных составляло 5 секунд для регистрации АФ и 30 секунд для накопления сигнала КР. Сигналы в двух спектральных диапазонах регистрировались последовательно из одной и той же области ткани. Спектры КР и АФ регистрировались в области неоднородности и нормальной ткани (в пределах от 2 до 4 см от края опухоли).

Для качественной и количественной оценок вклада флуорофоров в регистрируемый спектр АФ кожи было проведено математическое моделирование автофлуоресценции многослойных биологических сред. Разработанная многослойная модель биологической среды учитывала изменение концентрации основных флуорофоров по слоям вследствие топологических и биохимических изменений новообразований тканей. Был проведен анализ флуорофоров и их оптических характеристик, осуществлён выбор основных компонент. В работе была выбрана длина волны 450 нм для возбуждения АФ для сравнения с экспериментально зарегистрированной АФ тканью кожи. Возбуждение в ближней ИК области (780-800 нм) не рассматривалось, так как основной вклад в регистрируемый сигнал вносит один флуорофор – меланин.

При моделировании флуоресценции задавались следующие параметры: квантовый выход, коэффициент молярной экстинкции, молярная концентрация, спектры возбуждения и спектры испускания. На основе анализа спектров поглощения и эмиссии эндогенных флуорофоров, были выбраны те у которых максимум поглощения расположен в области 440-460 нм, а именно: меланин, каротиноиды, флавины, билирубин и липофусцин. На основе литературы была произведена локализация флуорофоров в модели кожи.

Было проведено моделирование АФ спектров кожи различных фототипов (различная концентрация меланина в нижних слоях эпидермиса) и новообразований (локализация в верхних слоях эпидермиса меланина и липофусцина). Результаты моделирования показали, что отличия в спектрах патологии по сравнению со здоровой тканью могут быть обусловлены различной концентрацией меланина, флавинов и липоигментов, а билирубин и каротиноиды не вносят существенных изменений в модельный спектр. Результаты моделирования сравнивались с результатами экспериментального исследования АФ здоровой кожи и злокачественных новообразований (меланомы и базалиомы) при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 457 нм. Для модельных спектров разница интенсивностей модельных спектров меланома – нормальная кожа имела качественное согласование с экспериментальными данными. Для «патологии» были получены более высокие значения интенсивностей в длинноволновой области спектра (550-640 нм) характерные для плоскоклеточного рака.

После численного моделирования проводился анализ экспериментально зарегистрированных спектров АФ кожи в видимой (550-750 нм) и ближней ИК областях (800-925 нм), результаты которого представлены на рисунке 2. Для оценки формы АФ спектров результаты были нормированы на максимальное значение в ближней области и на максимальное значение интенсивности нормальной ткани в ближней ИК области.

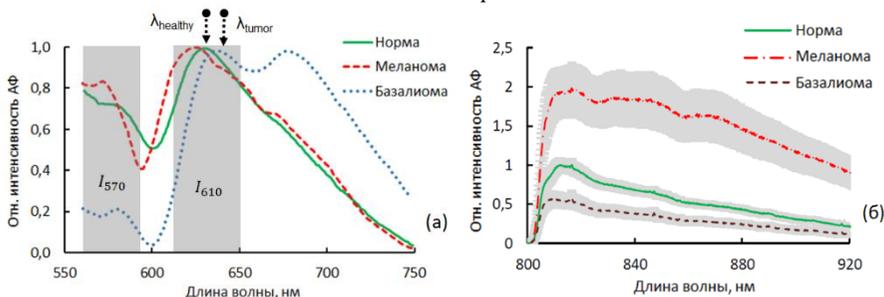


Рисунок 2 –Экспериментальные АФ спектры здоровой кожи, базалиомы и меланомы в видимой (а) и ближней ИК (б) областях

На рисунке 2.а у спектров расположены основные локальные максимумы в областях 570-590 нм и 610-670 нм. Приведенные примеры спектров являются характерными АФ откликами нормальной кожи, меланомы и базалиомы, при этом имеет место быть вариабельность интенсивности от образца к образцу. Вариабельность возникает вследствие различного содержания флуорофоров в ткани. В рассматриваемом диапазоне за возникновение пиков в первую очередь ответственны липоигменты, флавины и порфирины. Были предложены количественные критерии оценки АФ кривой в видимой области: соотношение максимальных интенсивностей сигнала в полосах 570-590 нм и 610-670 нм –  $FI_{VIS}=I_{610}/I_{650}$  (разделение меланомы от базалиомы с точностью 53%) и локальный сдвиг положения максимума между опухолью и здоровой кожей в диапазоне 610-670 нм –  $F\lambda_{VIS}$  (разделение с точностью

54%). Для повышения точности разделения неоднородностей был проведен анализ результатов на фазовой плоскости с критериями  $FI_{VIS}$  и  $F\lambda_{VIS}$ . Точность разделения составила 82% (чувствительность – 89%, специфичность – 79%, погрешность 7-10%).

Характерный вид АФ спектров тканей кожи и новообразований в ближней ИК области (возбуждающее излучение с длиной волны 785 нм) представлен на рисунке 2.б. Основным флуорофором в данной области для кожи является меланин. АФ спектр представляет собой нелинейно спадающую функцию. В спектральном диапазоне 870-920 нм интенсивность АФ уменьшается с ростом длины волны, а наиболее значительные качественные изменения в спектре АФ наблюдались в диапазоне 810-870 нм. Для анализа экспериментальных данных в указанном диапазоне АФ спектр был аппроксимирован экспоненциальной функцией:

$$I_{ap}(\lambda) = FI_{NIR} \cdot e^{-F\lambda_{NIR} \cdot \frac{\lambda}{\lambda_{max}}} + C, \quad (1)$$

где знак коэффициента  $FI_{NIR}$  отвечает за форму (выпуклую/вогнутую) аппроксимирующей кривой, коэффициент  $F\lambda_{NIR}$  характеризует кривизну, а  $\lambda_{max} = 870$  нм - правая граница интервала аппроксимации.

Была проведена классификация новообразований при помощи одного критерия ( $FI_{NIR}$  или  $F\lambda_{NIR}$ ) и фазовой плоскости ( $FI_{NIR} + F\lambda_{NIR}$ ). Точность выделения неоднородностей класса меланомы при исследованиях *ex vivo* (проведение экспериментов в живой ткани, перенесённой из организма в искусственную внешнюю среду) составила 88% (чувствительность – 96%, специфичность – 83%, погрешность 3-5%). Так же были проведены экспериментальные исследования АФ в ближней ИК области *in vivo* (проведение экспериментов на живой ткани при живом организме) новообразований кожи (были одобрены этическим комитетом СамГМУ). Анализ результатов подтвердил сохранение характерных изменений форм АФ спектров при переходе от *ex vivo* к *in vivo* исследованиям, при этом точность выделения меланомы осталась на прежнем уровне – 86% (чувствительность – 92%, специфичность – 80%, погрешность 7-11%).

Были проведены расчеты дискриминации неоднородностей меланомы от базалиомы для одной и той же выборки образцов с совместным использованием введенных спектральных АФ критериев:  $FI_{VIS}$ ,  $F\lambda_{VIS}$ ,  $FI_{NIR}$  и  $F\lambda_{NIR}$ . Наиболее высокую точность разделения 87% (погрешность 6%) на фазовой плоскости показала пара  $FI_{VIS} + F\lambda_{NIR}$  на 5-15% выше использования других пар или отдельных критериев. Полученные результаты подтверждают ранее выдвинутую гипотезу о необходимости спектральных исследований в различных диапазонах: в видимом для анализа липопигментов, флавинов и порфиринов и ближнем ИК для оценки меланина.

Помимо кожи были исследованы ткани легкого со злокачественными новообразованиями: плоскоклеточная карцинома и аденокарцинома. АФ спектры в ближней ИК области могут быть разделены по абсолютным значениям интенсивностям между нормальной тканью и неоднородностями. При этом разделить плоскоклеточный рак и аденокарциному является невозможным из-за близкого уровня интенсивности и формы АФ спектров.

Для тканей кожи и легкого был проведен анализ изменений интенсивности АФ спектров в ближней ИК области для одного образца в различных точках при последовательных измерениях. Результаты анализа продемонстрировали различие абсолютных спектральных характеристик патологий и здоровой ткани. Таким образом была показана возможность использования АФ спектроскопии для определения границ пораженной области с точностью диаметра пучка лазера, в данном исследовании 1 мм.

**Третья глава** посвящена экспериментальному исследованию КР в биологических средах с неоднородностями (ткани кожи и легкого с патологическими новообразованиями). Регистрируемый спектр включает в себя сигналы АФ и КР. Для выделения спектра КР в работе был использован метод полиномиальной аппроксимации с высокочастотной фильтрацией сигнала. КР спектры в дальнейшем анализировались для разделения классов при помощи фазовых плоскостей (двухстадийный фазовый метод), где каждый спектр представлялся в виде точки на плоскости в соответствии своим спектральным характеристикам, либо применялся метод главных компонент - МГК.

Характерные нормированные на максимальное значение интенсивности спектры комбинационного рассеяния для новообразований и нормальной кожи представлены на рисунке 3. В результате исследования было определено, что наиболее информативными полосами являются: 1430-1460  $\text{см}^{-1}$  (изгибная мода колебаний  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ ), 1300-1340  $\text{см}^{-1}$  (изгибные и скручивающие моды связи  $\text{CH}_2$ ) и 1640-1680  $\text{см}^{-1}$  (продольная колебательная мода  $\text{C}=\text{O}$  в Амидах). Изменение спектров комбинационного рассеяния может быть связано с увеличением концентрации нуклеиновых кислот, структуры белков изменением отношения ДНК/РНК. На рисунке 3 представлены спектры КР, зарегистрированные *ex vivo* и *in vivo*. Анализ рисунков 3а и 3б показывает, что спектр ткани с патологическими неоднородностями, зарегистрированный *in vivo*, включает больший вклад от нормальных тканей по сравнению с патологическими спектрами *ex vivo* (увеличение интенсивности пика 1660  $\text{см}^{-1}$  и практически полное совпадение интенсивностей между классами).

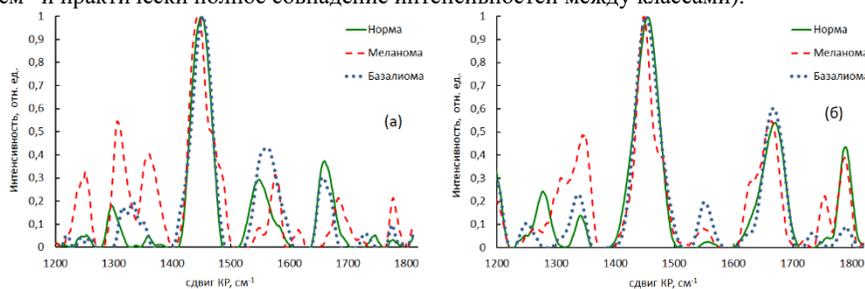


Рисунок 3 — Нормированные спектры КР кожи, меланомы и базальноклеточной карциномы в области 1200-1800  $\text{см}^{-1}$ , зарегистрированные *ex vivo* (а) и *in vivo* (б)

Был предложен двухстадийный метод фазового типа для обнаружения и идентификации типа неоднородности новообразования вместо широко распространённых пороговых критериев. На первом этапе, каждый зарегистрированный спектр представляется в виде точки на фазовой плоскости с двумя фазовыми характеристиками  $I_{1320}$  и  $I_{1660}$ , которые определяются как соотношение максимальной интенсивности рассеяния в полосах 1300-1340  $\text{см}^{-1}$  и 1640-1680  $\text{см}^{-1}$  к интенсивности КР в 1440-1460  $\text{см}^{-1}$ . На втором этапе двухстадийного фазового метода используются параметры фазовых характеристик, определяемые на основе изменения спектральной интенсивности неоднородности по сравнению с нормальной тканью. Эти параметры определяются как разница между относительными интенсивностями КР

$$RS_k = \frac{|I_k^{(m)} - I_k^{(h)}|}{I_k^{(m)} + I_k^{(h)}}, \quad (2)$$

где индекс  $h$  означает здоровую ткань, индекс  $m$  злокачественную, а индекс  $k$  указывает конкретный спектральный диапазон (1320, 1450, 1660  $\text{см}^{-1}$ ). Эти параметры образуют фазовое пространство. Были проанализированы попарно все диапазоны, наиболее

информативной оказалась пара 1320 и 1450  $\text{см}^{-1}$ . Таким образом на втором этапе учитываются индивидуальные особенности образца. Каждая точка на фазовой плоскости может быть отнесена к определенному типу неоднородности или нормальной ткани в соответствии с результатом гистологического анализа. Для выделения классов биоткани на фазовой плоскости применялся дискриминантный анализ (ДА). Дискриминация новообразований фазовым методом показала свою работоспособность как для *ex vivo*, так и для *in vivo* исследований.

Для анализа эффективности фазового метода было проведено сравнение результатов дискриминации с независимым методом - методом главных компонент (МГК). Первый этап фазового метода показал чуть более высокие значения по точности классификации на 5-10%. При этом значения чувствительности всегда были выше на 10-15% для фазового метода по сравнению с МГК. Итоговая точность обнаружения неоднородностей меланомы относительно других тканей была более 85%

В исследованиях КР тканей легкого был использован тот же подход в обработке и анализе спектров, были выбраны те же информативные полосы, состоящие из пиков: 1450  $\text{см}^{-1}$  (изгибная мода связей  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , которая встречается в фосфолипидах и белках, таких как коллаген), 1300  $\text{см}^{-1}$  (крутильные и веерные колебания  $\text{CH}_2$  в коллагене и фосфолипидах), 1335  $\text{см}^{-1}$  (веерные колебания  $\text{CH}_3\text{CH}_2$  в коллагене и нуклеиновых кислотах), и 1660  $\text{см}^{-1}$  (продольные колебания  $\text{C}=\text{O}$  в Амиде I,  $\alpha$ -спиралях и белках, таких как коллаген и эластин, продольные колебания  $\text{C}=\text{C}$  в липидах). Двухстадийный фазовый метод был применен для анализа КР неоднородностей тканей легкого. Классы новообразований и здоровой ткани уверенно отделяются друг от друга. На втором этапе, фазовый метод успешно разделяет аденокарциному от плоскоклеточной карциномы с помощью квадратичного ДА. Двухстадийный фазовый метод позволяет достичь 100% чувствительности и 82% специфичности для идентификации аденокарциномы и 91% и 78% для плоскоклеточного рака.

Анализ экспериментальных результатов приводит к выводу, что предложенный двухстадийный метод может значительно улучшить точность диагностики меланомы с помощью относительных дифференциальных фазовых параметров в полосах 1300-1340 и 1440-1460  $\text{см}^{-1}$  спектра комбинационного рассеяния. Для тканей лёгкого первый этап может быть использован для идентификации злокачественной ткани, а второй этап помогает классифицировать различные типы злокачественных неоднородностей.

**Четвертая глава** посвящена дифференциации меланомы кожи и базалиомы на основе совместного анализа спектров комбинационного рассеяния и автофлуоресценции, стимулированной лазерами с длинами волн 457 нм и 785 нм. Были предложены шесть спектральных критериев, в которых использовалась информация об изменении концентраций меланина, порфиринов, флавинов, липидов и коллагена в опухоли по сравнению со здоровой кожей. Измеренная корреляция между предлагаемыми критериями позволяет определить слабокоррелированные группы критериев для дискриминантного анализа и выбрать основные компоненты.

Всего в диссертационном исследовании всего было исследовано 79 образцов новообразований кожи. Для первой группы из 158 образцов (79 здоровых тканей, 39 меланом и 40 базалиом) проводился анализ КР и АФ в БИК области. Для второй группы из 74 образцов (37 здоровых тканей, 27 базалиом и 10 меланом) помимо анализа в БИК области (АФ и КР) проводилась регистрация АФ спектров в видимой области с использованием лазера с длиной волны 457 нм.

Все обработанные спектры КР, ближней ИК АФ и видимой АФ были сгруппированы в соответствии с гистологическими данными, в дальнейшем спектральные критерии ( $RS_{1320}$ ,  $RS_{1660}$ ,  $FI_{NIR}$ ,  $F\lambda_{NIR}$ ,  $FIVIS}$ ,  $F\lambda_{VIS}$ ) были статистически обработаны с использованием метода главных компонент. Такой подход позволил

сократить число переменных от тысяч (по всем спектрам) до нескольких переменных и включить в анализ индивидуальные особенности образцов.

Двухстадийный КР анализ показывает относительное изменение содержания белков и липидов в опухоли, точность диагностики может быть улучшена путем дополнительного анализа других компонентов ткани. Содержание меланина оказывается полезным дополнительным критерием, так как меланома является более пигментированным новообразованием по сравнению с базалиомой. Таким образом, измерение содержания меланина может улучшить классификацию меланомы и базалиомы с помощью оптических методов, таких как АФ в ближней ИК области. Так кривизна и наклон функции аппроксимации зависят от содержания меланина в тканях кожи. И эти коэффициенты могут измеряться одновременно с КР сигналом. В отличие от анализа КР и АФ ближней ИК области АФ, стимулированная в видимой области, позволяет выявить свойства липидов, флавинов и порфиринов в тканях кожи.

В главе представлены результаты разделения классов неоднородностей меланомы и базалиомы отдельными критериями, фазовыми плоскостями и использованием четырехмерного (анализ КР и АФ в ближней ИК области) и шестимерного (дополнительно анализ АФ в видимой области) пространств критериев (таблица 1).

Таблица 1 – Точность разделения неоднородностей меланомы и базалиомы спектральными критериями

Критерии	Чувствительность	Специфичность	Точность
$RS_{1320}$	90%	68%	79%
$RS_{1660}$	82%	38%	61%
$FI_{NIR}$	74%	48%	61%
$F\lambda_{NIR}$	69%	85%	77%
$FI_{VIS}$	100%	43%	50%
$F\lambda_{VIS}$	100%	33%	51%
$RS_{1320}$ и $RS_{1660}$ (фазовый метод КР)	97%	62%	80%
$FI_{NIR}$ и $F\lambda_{NIR}$ (АФ в диапазоне 800-925 нм)	92%	38%	65%
$FI_{VIS}$ and $F\lambda_{VIS}$ (АФ в диапазоне 550-750 нм)	80%	78%	78%
$FI_{VIS}$ and $F\lambda_{NIR}$ (АФ в диапазонах 550-750 нм и 800-925 нм)	70%	93%	87%
$FI_{NIR}$ , $F\lambda_{NIR}$ , $RS_{1320}$ и $RS_{1660}$ (4D метод)	95%	93%	94%
$FI_{NIR}$ , $F\lambda_{NIR}$ , $RS_{1320}$ , $RS_{1660}$ , $FI_{VIS}$ и $F\lambda_{VIS}$ (6D метод)	100%	96%	97%

Наиболее полезными критериями для разделения меланомы и базалиомы являются  $RS_{1320}$  и  $F\lambda_{NIR}$  с точностью 79% и 77% соответственно. Использование более двух критериев позволяет повысить точность разделения неоднородностей до 87%. Анализ классов тканей кожи методами, основанными на четырехмерном или шестимерном пространстве критериев, показывает улучшение разделения меланомы и базалиомы от 7% до 10% по сравнению с анализом фазовой плоскости. Точность 6-D алгоритма на 3% (чувствительность – 100%, специфичность -96%, точность – 97%,

погрешность 3%) выше, чем в случае 4-D алгоритма (чувствительность – 95%, специфичность – 93%, точность – 94%, погрешность 3%). Такое повышение точности обусловлено большей вероятностью найти наивысшие различия между выбранными критериями в многомерном пространстве. С другой стороны, данные для 6-D критериального анализа были получены для меньшего числа экземпляров, отсюда следует должна оцениваться корреляция между критериями, чтобы понять их вклад в точность классификации. Были сформулированы возможные причины корреляции критериев между собой с точки зрения предоставляемой ими спектральной информации. Наиболее низкую корреляцию между собой показали пары:  $RS_{1660}$  и  $FI_{NIR}$ ,  $RS_{1660}$  и  $FI_{VIS}$ ,  $FI_{VIS}$  и  $F\lambda_{VIS}$ ,  $RS_{1320}$  и  $F\lambda_{VIS}$ . Поскольку некоторые из выбранных критериев имеют сильные корреляции, есть возможность уменьшить количество критериев путем выбора критериев с наименьшими корреляциями для достижения максимальной точности диагностики в трехмерном фазовом пространстве. В анализе трехмерного пространства использовались главные компоненты с самыми высокими вариациями и с самой низкой корреляцией между собой. Этот анализ обеспечивает точность от 85% до 97% для разделения неоднородностей меланомы и базалиомы. Различия в точности разделения тканей кожи для реализации 4 и 6 критериев вызваны дополнительными АФ критериями в видимой области (550-750 нм). Эти критерии имеют низкую корреляцию с критериями комбинационного рассеяния и АФ в ближней ИК области (800-925 нм), и их внедрение повышает чувствительность и специфичность разделения меланомы и базалиомы примерно на 4%.

## Заключение

В работе получены следующие основные результаты:

1. Предложены количественные критерии изменения формы автофлуоресцентных спектров: соотношение интенсивностей и смещение локального максимума в видимой области (550-750 нм), кривизна экспоненциальной аппроксимирующей функции в ближней инфракрасной области (800-925 нм), для классификации неоднородностей биологических сред. Спектральные изменения вызваны различной концентрацией и локализацией основных флуорофоров ткани (порфиринов, флавинов, липидов и меланина), и совместный анализ критериев в двух областях позволил с точностью 80-85% определить тип неоднородности.

2. Предложен двухстадийный фазовый метод анализа комбинационного рассеяния тканей кожи и легкого с последовательным выделением области с патологическими неоднородностями на основании изменения соотношения интенсивностей полос спектра комбинационного рассеяния белков и липидов (1320, 1450, 1660  $\text{см}^{-1}$ ) и последующем определении спектрального контраста полос комбинационного рассеяния неоднородностей по отношению к нормальной ткани. Экспериментально показано повышение точности определения типа неоднородности на 5-10% в зависимости от типа новообразования и инвариантность метода к размеру неоднородности и естественной вариации оптических свойств нормальной ткани.

3. Предложен многокритериальный метод анализа и классификации неоднородностей в шестимерном пространстве спектральных критериев комбинационного рассеяния, автофлуоресценции в видимой (550-750 нм), и ближней ИК (800-925 нм) областях на основе слабой взаимной корреляции количественных критериев. Показано, что точность определения типа неоднородности многокритериальным методом равнялась 97%, а при использовании только ИК источника возбуждения (785 нм) – 94%, что на 7-11% больше чем для каждого из спектральных методов по отдельности.

## Основные результаты опубликованы в следующих работах:

### Статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК и журналах, реферируемых Scopus, WoS

1. Захаров, В.П. Диагностика новообразований кожи методом комбинационного рассеяния [Текст] / В.П. Захаров, К.В. Ларин, С.В. Козлов, А.А. Морятов, И.А. Братченко, О.О. Мякинин, **Д.Н. Артемьев**, Ю.А. Христофорова // Физика волновых процессов – 2013. – Т. 16, № 3. – С. 73-78.
2. Zakharov, V.P. Two-step Raman spectroscopy method for tumor diagnosis [Text] / V.P. Zakharov, I.A. Bratchenko, S.V. Kozlov, A.A. Moryatov, O.O. Myakinin, **D.N. Artemyev** // Proceedings of SPIE. – 2014. – Vol. 9129. – P. 91293V (6 pp). doi: 10.1117/12.2052121.
3. Zakharov, V.P. Multimodal diagnosis and visualisation of oncologic pathologies [Text] / V.P. Zakharov, I.A. Bratchenko, O.O. Myakinin, **D.N. Artemyev**, S.V. Kozlov, A.A. Moryatov // Quantum Electronics. – 2014. – Vol. 44, No. 9. – P. 726-731. doi: 10.1070/qe2014v044n08abeh015545.
4. Zakharov, V.P. Combined autofluorescence and Raman spectroscopy method for skin tumor detection in visible and near infrared regions [Text] / V.P. Zakharov, I.A. Bratchenko, **D.N. Artemyev**, O.O. Myakinin, Y.A. Khristoforova, S.V. Kozlov, A.A. Moryatov // Proceedings of SPIE. – 2015. – Vol. 9537. – P. 95372H (6 pp). doi: 10.1364/ecbo.2015.95372h.
5. Zakharov, V.P. Comparative analysis of combined spectral and optical tomography methods for detection of skin and lung cancers [Text] / V.P. Zakharov, I.A. Bratchenko, **D.N. Artemyev**, O.O. Myakinin, D.V. Kornilin, S.V. Kozlov, A.A. Moryatov // Journal of Biomedical Optics. – 2015. – Vol. 20, No. 2. – P. 025003. doi: 10.1117/1.jbo.20.2.025003.
6. Bratchenko, I.A. Fluorescence spectroscopy for neoplasms control [Text] / I.A. Bratchenko, Y.A. Khristoforova, O.O. Myakinin, **D.N. Artemyev**, S.V. Kozlov, A.A. Moryatov, V.P. Zakharov // Proceedings of SPIE. – 2016. – Vol. 9887. – P. 98870Y (9 pp). doi: 10.1117/12.2227610.
7. Khristoforova, Y. A. Optical diagnostics of malignant and benign skin neoplasms [Text] / Y.A. Khristoforova, I.A. Bratchenko, **D.N. Artemyev**, O.O. Myakinin, A.A. Moryatov, O.I. Kaganov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // Procedia Engineering. – 2017. – Vol. 201. – P. 141–147 (7 pp). doi: 10.1016/j.proeng.2017.09.664.
8. Bratchenko, I.A. Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions [Text] / I.A. Bratchenko, **D.N. Artemyev**, O.O. Myakinin, Y.A. Khristoforova, A.A. Moryatov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // Journal of Biomedical Optics. – 2017. – Vol. 22, No. 2. – P. 027005. doi: 10.1117/1.jbo.22.2.027005.
9. Khristoforova, Y. A. In vivo NIR Raman and autofluorescence spectroscopies of skin neoplasms [Text] / Y.A. Khristoforova, I.A. Bratchenko, O.O. Myakinin, **D.N. Artemyev**, A.A. Moryatov, O.I. Kaganov, S.V. Kozlov, Orlov A.E., V.P. Zakharov // Proceedings of SPIE. – 2018. – Vol. 10753. – P. 1075314 (7 pp). doi: 10.1117/12.2320483.
10. Khristoforova, Y. A. Portable spectroscopic system for in vivo skin neoplasms diagnostics by Raman and autofluorescence analysis [Text] / Y.A. Khristoforova, I.A. Bratchenko, O.O. Myakinin, **D.N. Artemyev**, A.A. Moryatov, A.E. Orlov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // Journal of Biophotonics. – 2019. – Vol. 12, No. 4. – P. e201800400. doi: 10.1002/jbio.201800400.