

Диагностика пигментированных кожных новообразований методами лазерно-индуцированной автофлуоресцентной и диффузной отражательной спектроскопии

Е.Борисова, П.Троянова, П.Павлова, Л.Аврамов

Представлены результаты исследования кожных доброкачественных и злокачественных пигментированных новообразований с помощью лазерно-индуцированной автофлуоресцентной спектроскопии (ЛИАФС) и диффузной отражательной спектроскопии (ДОС). Источником возбуждения автофлуоресценции кожи человека служил азотный лазер, работающий на длине волны 337 нм. Для измерения диффузного отражения использовалась широкополосная (400–900 нм) галогенная лампа. Флуоресцентные и отраженные от кожи человека сигналы регистрировались in vivo с помощью микроспектрометра. Обсуждаются основные спектральные особенности доброкачественных (дермальные, сложные, дисплазийные невусы) и злокачественных (меланомы) новообразований. Использование для получения заключений о типе новообразования комбинации флуоресцентного и отражательного спектральных методов (в целом это увеличивает общую диагностическую точность) сравнивается с применением только ЛИАФС или только ДОС. Рассмотрено также использование колориметрического преобразования детектируемых спектров отражения и получены дополнительные оценочные критерии для определения типа исследуемого новообразования. Проведена регистрация спектров участков здоровой кожи, расположенных вблизи новообразования, и выявлены различия между спектрами здоровой и пораженной кожи. Обсуждается влияние основных пигментов кожи на регистрируемые спектры и оцениваются возможности дифференцирования злокачественных и доброкачественных новообразований на основе их спектральных свойств. Показано, что неинвазивное и высокочувствительное in vivo детектирование с помощью соответствующих источников света и детекторов должно дать возможность определения существующих патологических признаков в реальном масштабе времени.

Ключевые слова: лазерно-индуцированная автофлуоресценция, диффузное отражение, меланин, меланома, дисплазийные невусы.

1. Введение

Биомедицинская оптика является одной из наиболее быстро развивающихся областей. Неионизирующая природа света, используемого для исследования и детектирования аномалий в тканях человека, делает ее весьма привлекательной для разработки новых диагностических и терапевтических методов [1]. Оптические спектры предоставляют биохимическую и морфологическую информацию об исследуемых биотканях, основанную на их поглощении, а также на упругих и комбинационных рассеивающих свойствах [1–3].

Оптическая биопсия является относительно новым понятием, включающим в себя спектральные методы, которые применяются в медицинской практике при ранней диагностике тканевых патологий in vivo. Использование таких методов предпочтительней традиционной диагностики, требующей удаления нескольких квадратных миллиметров тканевой поверхности и последующе-

го ожидания результатов гистологического исследования. Оптическая биопсия смогла бы обеспечить высокую диагностическую точность за счет высокой чувствительности спектральной техники к малым биохимическим и морфологическим изменениям, происходящим в исследуемых биотканях [4, 5]. Использование такого оборудования потребует лишь сравнительно небольших затрат времени на обучение персонала нескольким практическим навыкам, тогда как для применения некоторых более традиционных методов [2, 6] часто необходимо многолетнее обучение.

Одними из наиболее перспективных оптических методов, предложенных для введения в клиническую диагностическую практику, являются флуоресцентная и отражательная спектроскопии.

Флуоресцентная спектроскопия применяется для анализа большого числа различных объектов – от индивидуальных биохимических образцов до целых органов in vivo [7]. Флуоресцентная методика с использованием или без использования экзогенных флуоресцентных маркеров находит также много других применений: это мониторинг фотоинактивационных процессов в патогенных бактериях [8], дозиметрия при проведении процедур фотодинамической терапии [2, 7, 9, 10], анализ степени поглощения лекарственных препаратов [10, 11].

Лазерно-индуцированная автофлуоресцентная спектроскопия (ЛИАФС) – очень перспективный метод, поскольку, с одной стороны, он дает возможность использовать информацию о естественно присутствующих в тканях эндогенных флуорофорах, а с другой – осуществлять

* Перевод с англ. Э.А.Гениной.

Е.Борисова, Л.Аврамов. Institute of Electronics, Bulgarian Academy of Sciences 72, Tsarigradsko chaussee Blvd., 1784 Sofia, Bulgaria; e-mail: borisova@ie.bas.bg

П.Троянова. National Oncological Diagnostic Center, 6, Plovdivsko pole Str., 1756 Sofia, Bulgaria

П.Павлова. Technical University Sofia, branch Plovdiv, 25, Tsanko Djubabanov Str. 4000, Bulgaria Institute of Solid State Physic, Bulgarian Academy of Sciences

Поступила в редакцию 8 января 2008 г.

детектирование и дифференциацию исследуемых объектов в реальном масштабе времени с заданной точностью, селективностью и специфичностью [2, 3, 12, 13]. Автофлуоресцентная спектроскопическая техника применяется для раннего выявления и/или распознавания различных тканевых патологий: атеросклеротических бляшек [14], старения, пролиферации эпидермиса [5, 15]. Флуоресцентная техника также широко используется для исследования кожных заболеваний, включая эритему [4], псориаз, витилиго [16] и рак кожи [2, 3, 5, 7]. Этот метод дает информацию о биохимическом составе исследуемой биоткани.

Метод диффузной отражательной спектроскопии (ДОС), с другой стороны, дает, в основном, морфологическую информацию о биоткани. Большинство патологий, включая опухоли, демонстрируют значительные архитектурные изменения на клеточном и внутриклеточном уровнях [17]. Поскольку детектируемый диффузный отраженный сигнал является суперпозицией диффузного рассеяния и поглощения пигментов биоткани, результирующий спектр также несет информацию об основных поглотителях в биотканях, таких как гемоглобин и меланин в коже, и о кожных патологиях [1, 6].

Спектроскопия диффузного отражения и обратного рассеяния применяется для получения характеристик ткани яичников [18], пищевода [17], для оценки цвета кожи и эритемной дозы [19], а также для выявления рака толстой кишки [20] и рака кожи [21, 22]. Измерения диффузного отражения с пространственным разрешением используются для определения коэффициентов оптического рассеяния и поглощения биологических тканей [23, 24], которые полностью описывают оптические свойства исследуемой ткани. Оценка цвета кожи с помощью оптической отражательной спектроскопии – другая важная часть исследований свойств кожной ткани. На протяжении столетий цвет кожи является индикатором многих патологических состояний. При этих исследованиях цвет соотносят с минимальной эритемной дозой [25], так же как и спектры отражения – с концентрацией меланина и гемоглобина в коже [26, 27].

В некоторых системах при *in vivo* и *in vitro* детектировании и исследовании тканевых образований применяются оба метода – ЛИАФС и ДОС. Комбинация этих методов служит для лучшего разграничения оптических свойств нормальных и патологически измененных биотканей [12, 28, 29]. Спектроскопические методы продолжают развиваться, и одним из способов увеличения статистической значимости диагностических алгоритмов, разработанных на их основе, является выявление спектральных особенностей в основных используемых алгоритмах дифференциации.

В настоящей работе представлены результаты одноканального и совместного применения диагностических алгоритмов, основанных на особенностях спектров автофлуоресценции и диффузного отражения меланинсодержащих новообразований, дисплазийных и злокачественных поражений кожи. Применяется также колориметрический подход, основанный на выделении параметров цветности из спектров отражения. Этот метод можно использовать при необходимости автоматизации процедур оценки пигментированных заболеваний кожи [30]. В настоящей работе проведено сравнение диагностических возможностей методов (ЛИАФС и ДОС) и колориметрической оценки, основанной на спектрах отражения от

кожных новообразований, для определения применимости этих спектроскопических методов в клинической практике.

В случае совместного использования методов ЛИАФС и ДОС для определения пигментированной меланомы диагностическая точность (ДТ) достигает 90 %, тогда как при использовании только одного метода – 70 %. Однако если мы хотим расширить число исследуемых кожных образований, в дифференциальные алгоритмы, разработанные на основе методов ЛИАФС и ДОС, должны быть включены дополнительные спектральные признаки.

2. Методы и материалы

2.1. Клинический и дерматоскопический анализ

В данном исследовании принимали участие 24 пациента Национального онкологического центра, имеющие следующие новообразования: доброкачественные невусы (BN – benign nevus) (8 случаев), дисплазийные невусы (DN – dysplastic nevus) (7 случаев) и злокачественные меланомы (MM – malignant melanoma) (9 случаев). Все перечисленные заболевания представляют собой патологии, характеризующиеся высоким содержанием меланина, причем невусы являются той группой кожных пигментированных патологий, которая может быть по ошибке диагностирована как MM. Пациенты, входящие в базу данных, были распределены согласно классификации Фицпатрика [31] по типам кожи (фототип II и фототип III, наиболее распространенные в данном регионе).

Первоначально образования классифицировались визуально опытным дерматологом (П.Т.) и дерматоскопически (MoleMax II, DERMA Instruments). Каждый объект оценивался с использованием показателей ABCD, где А – асимметрия (asymmetry), В – граница (border), С – цвет (colour) и D – дерматоскопическая структуры (dermoscopic structures). Затем все объекты удалялись. После удаления материал исследовался гистологически, что служило «золотым» стандартом для определения типа заболевания; окончательный анализ пригодности спектроскопических методов выполнялся на основе сравнения всех полученных с их помощью данных с гистологическими результатами.

2.2. Измерения флуоресценции и отражения

Система, используемая для спектроскопического анализа кожи человека, подробно описана в работах [6, 30, 32]. Максимум длины волны возбуждения, находящийся около 340 нм, является оптимальным [2] для дифференцирования автофлуоресцентных сигналов от нормальной кожи и неопластической ткани. В связи с этим в качестве наиболее подходящего источника возбуждения использовался компактный азотный лазер, излучающий на длине волны 337 нм, с энергией в импульсе 14 мкДж и частотой следования импульсов 10 Гц (ILGI-503, Россия). Для измерений отражения использовалась широкополосная галогенная лампа, излучающая в диапазоне 400–900 нм. Доставка излучения от лазера и лампы и сбор флуоресцентного и отраженного сигналов осуществлялись с помощью кварц-полимерных оптических волокон диаметром 600 мкм с числовой апертурой 0.22. Спектры записывались и запоминались с помощью волоконно-оптического микроспектрометра PC2000 (Ocean Optics, США). Для управления системой использовался персональный компьютер, хранение и воспроизведение дан-

ных осуществлялось с помощью специализированного программного обеспечения микроспектрометра OOI Base (Ocean Optics, США).

Для измерения в режиме отражения предварительно проводилась начальная калибровка. Интенсивность I_{pigm} света, отраженного от образца, выражалась процентным соотношением R к интенсивности I_{norm} стандартно отраженного света (в данном случае от образца сульфата бария – BaSO_4). Такое нормирование исключало влияние на измерения спектральных зависимостей интенсивности излучения источника и чувствительности приемника [33].

Спектроскопический анализ участков нормальной кожи и новообразований проводился при комнатной температуре (от 23 до 25 °C) после 5–10-минутного отдыха каждого пациента. Для каждого вызывающего подозрения участка регистрировалось несколько спектров, которые усреднялись с целью уменьшения влияния неоднородностей новообразований. Также детектировались спектры автофлуоресценции и диффузного отражения окружающей нормальной кожи. Эти усредненные спектры участка здоровой кожи служили базовой линией для определения спектральных изменений, возникающих на участках с патологией. Спектры сглаживались с использованием алгоритма Savitzky–Golay с целью снижения аппаратных шумов спектрометрической системы. Между торцами оптического волокна и поверхностью кожи с помощью механического штатива поддерживалось постоянное расстояние, чтобы исключить влияние их смещения на уровень интенсивности. Все спектры были получены при нормальном падении – угол между концами оптических волокон и поверхностью кожи составлял 90°. Такая геометрия использовалась для минимизации погрешностей в спектрах флуоресценции и отражения в процессе измерений [34].

2.3. Колориметрический анализ

Использование колориметрического подхода в данном исследовании основано на том, что каждый участок кожи, включая исследуемые пораженные участки, имеет собственный пигментный состав с соответствующим цветом, который оказывает влияние на отраженное излучение в области 380–780 нм. Цветовые особенности и используемый метод расчета заданы в стандартной базе CIE N15.2 [35, 36]. Этот стандарт определяет перевод измеренного спектра в систему XYZ. Между всеми колориметрическими системами существуют соотношения, основанные на CIE XYZ [37, 38], и, следовательно, результаты, полученные из спектральных данных, можно сравнивать с изображениями тех же участков. В обоих случаях простое преобразование спектра, такое как масштабирование (увеличение по амплитуде) или параллельный перенос (добавление постоянной составляющей), значительно изменяет величину яркости. Однако цветность при масштабировании остается постоянной, но изменяется при параллельном переносе. Прямое сравнение особенностей цвета областей нормальной и аномальной кожи различных пациентов непригодно для классификации реального состояния патологии в связи со значительной вариабельностью пигментации нормальной кожи (различные фототипы кожи, анатомические различия и т. п.). Цвет кожи обычно оценивается в системе La^*b^* , которая дает некоторую независимость результатов от цветовой температуры источника света и хорошее разрешение в красно-желтой цветовой области. После анализа

возможных шагов для унификации колориметрического подхода при огромном многообразии пигментаций и типов новообразований [30, 39] яркость была признана недостаточно информативным параметром для колориметрической дифференциации пигментированных патологий, и после спектральных преобразований с использованием соотношения между спектрами здорового участка и новообразования параметры цветности признаны диагностически значимыми. Однако использование в системе La^*b^* соотношений между интегральными параметрами XYZ объекта и источника «замазывает» различия в спектре, которые указывают на аномальность кожи. Из-за этого запаздывания в системе La^*b^* мы предпочитаем использовать цветное представление с равными расстояниями в области цветности, т. к. в нем отсутствуют разные отношения между параметрами. Из всего многообразия колориметрических координатных систем в данном исследовании используется одна – LSH (lightness – яркость, saturation – насыщенность, hue – цветовой тон), поскольку эти три параметра описывают психосоматическое восприятие цвета людьми. Яркость (L) – это восприятие количества света, а отношение яркостей спектральных компонент определяет цветовой тон (H) и насыщенность (S). Далее считаем, что характеристики S и H, которые вместе называются цветностью, определяются формой спектра коэффициента отражения.

Аналитический подход, применяемый в данной работе при сравнении цветových особенностей, позволяет, во-первых, получить результаты, независимые от начального спектрального распределения, и, во-вторых, использовать одинаковые критерии для всех оценок. Разработанная схема классификации дает возможность по особенностям отклонения цветности определить принадлежность тестируемого спектра путем сравнения его с находящимися в предварительно созданной библиотеке спектрами, соответствующими определенным диагнозам. Процедура сравнения включает установление процентного отношения принадлежности тестируемого новообразования к определенному заболеванию, т. к. наибольшее процентное отношение для рассчитываемого в данный момент спектра соответствует диагнозу. В сравнении участвуют три параметра – S, H и $\Sigma = S + H$, и если два из них указывают на один и тот же тип патологии, то это определяет окончательный диагноз заболевания, исследуемого с использованием основанного на спектрах отражения колориметрического анализа.

3. Результаты и обсуждение

Данные, полученные методами лазерно-индуцированной автофлуоресценции и диффузного отражения, представленные в статье, сглажены и усреднены по типам заболеваний. Спектры нормальной кожи для сравнения со спектральными изменениями, возникающими в присутствии патологий, сглажены и усреднены с использованием данных для всех пациентов.

Каждый спектр автофлуоресценции, записанный *in vivo*, является суперпозицией спектров флуоресценции находящихся в биоткани эндогенных флуорофоров [3–5, 11, 12], искаженных реабсорбцией фотонов тканевыми пигментами, в основном кровью и меланином. Форма спектра флуоресценции нормальной кожи обычно незначительно меняется от пациента к пациенту. Изменения интенсивности являются более ярко выраженными, что

обусловлено различием фототипов кожи и анатомических областей, т. к. в обоих случаях могут наблюдаться разные уровни меланиновой пигментации. Небольшие различия в форме спектра детектируются только для спектров флуоресценции кожи ладони, поскольку на других анатомических участках недостаток меланина ведет к более глубокому проникновению возбуждающего и, соответственно, испускаемого излучения. В этом случае ярко выражено влияние реабсорбции гемоглобина на флуоресценцию более глубоких слоев дермы. Этот эффект подробно обсуждался в нашей работе [40].

На рис.1 представлены спектры лазерно-индуцированной автофлуоресценции нормальной кожи, доброкачественного невуса, дисплазийного невуса и злокачественной меланомы, усредненные по всем пациентам и нормированные по отношению к сигналу отраженного возбуждающего излучения. Спектры приведены со стандартным отклонением, определенным в процессе усреднения данных. Для нормальной кожи стандартное отклонение составляет $\sim 10\%$, тогда как для меланин-пигментированных патологий оно выше, но его величина не коррелирует с анатомической областью или фототипом кожи пациента. Стандартное отклонение, полученное в процессе усреднения спектров автофлуоресценции тех же патологий кожи, составляет менее 10% для доброкачественных невусов, около 12% для дисплазийных невусов и 18% для пигментированных меланом. Существенных изменений формы спектров, соответствующих доброкачественным и злокачественным патологиям, не наблюдается, однако имеют место значительные различия в интенсивностях флуоресцентного сигнала для разных состояний кожи – нормального/анормального и доброкачественного/злокачественного.

Спектр автофлуоресценции кожи человека при ее облучении в УФ-А спектральной области есть результат испускания несколькими основными флуорофорами – коллагеном, эластином, NADH, флавинами, протеиновыми межмолекулярными связями [2–5, 11, 12, 41]. В полученных спектрах флуоресценции спектры NADH, коллагена и коллагеновых межмолекулярных связей можно легко распознать с использованием существующих литературных данных [3–5, 7, 11, 12].

Значительное уменьшение интенсивности флуорес-

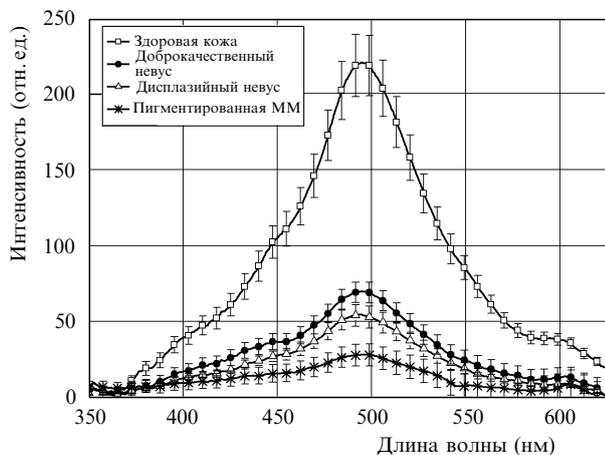


Рис.1. Спектры лазерно-индуцированной автофлуоресценции нормальной кожи, доброкачественного и дисплазийного невусов и злокачественной меланомы, полученные при длине волны возбуждения 337 нм.

ценции, коррелирующее с типом пигментированного новообразования, наблюдалось для всех новообразований. Очень близкие значения интенсивности флуоресценции имеют максимум два типа исследуемых невусов. Интенсивность флуоресценции злокачественной меланомы много ниже, чем у нормальной кожи и невуса, и может быть отличима от интенсивности флуоресценции пигментированных невусовых пятен. Поскольку индикативных различий между формами спектров флуоресценции нормальной кожи, невусов и ММ не наблюдается, для распознавания невусов и ММ получен простой алгоритм, использующий в качестве критерия дифференциации только уровень интенсивности. Небольшие особенности формы спектров злокачественной меланомы связаны с метаболическими изменениями (рост интенсивности флуоресценции NADH в диапазоне 430–460 нм) и с увеличением содержания крови (более глубокие минимумы на длинах волн 420, 540, 575 нм).

На рис.2 представлены спектры диффузного отражения доброкачественных и злокачественных меланин-пигментированных новообразований и нормальной кожи. На спектрах приведены стандартные отклонения, полученные при усреднении всех спектров, относящихся к данному состоянию кожи: 18% для нормальной кожи, менее 20% в синей и $\sim 6\%$ в красной частях спектра для доброкачественных невусов, $\sim 18\%$ в синей и $\sim 10\%$ в красной частях спектра для дисплазийных невусов и $\sim 20\%$ для пигментированных меланомных новообразований.

По сравнению со спектром здоровой кожи спектр отражения доброкачественного сложного невуса демонстрирует значительное уменьшение коэффициента отражения во всем спектральном диапазоне, наиболее выраженное в синей области, где меланин поглощает больше, чем в красной. Такие же результаты наблюдаются и в случае дисплазийного невуса, однако при этом интенсивность отраженного сигнала еще меньше. Спектр злокачественной меланомы имеет наименьшее полное отражение по сравнению со всеми типами образований.

Спектры отражения сложного и дисплазийного невусов существенно отличаются от спектра меланомы. В синей и красной спектральных областях это различие

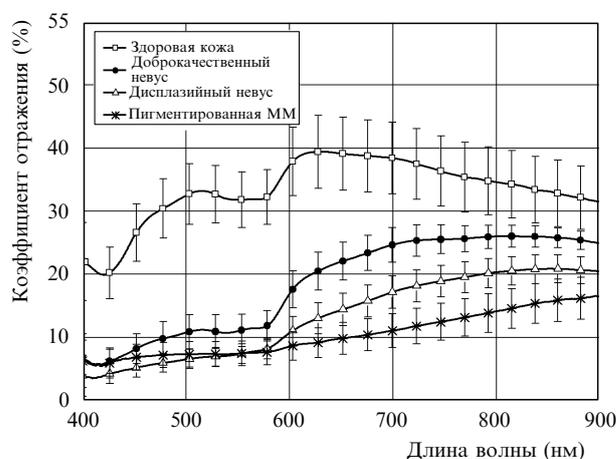


Рис.2. Спектры диффузного отражения нормальной кожи, доброкачественного и дисплазийного невусов и злокачественной меланомы, полученные с использованием широкополосного источника излучения.

может быть еще более выраженным, если использовать соответствующее отношение интенсивностей отраженных сигналов в этих спектральных областях. В предыдущих работах [34, 40, 42] мы предложили в качестве параметров дифференциации для диагностики ММ несколько спектральных особенностей, выделенных из детектируемых спектров отражения. Эти спектральные особенности включают отношения интенсивностей на $\lambda = 500, 575, 700$ нм, связанные со специфической комбинацией поглощающих свойств гемоглобина и меланина на указанных длинах волн, а также наклоны спектров и площади под кривыми в различных частях спектра отражения, полученного от исследуемого образования (см. рис.3). Типичные спектры отражения нормальной кожи европейцев имеют отрицательный наклон с ростом длины волны в области 700–900 нм. Для меланин-пигментированных патологий, таких как ММ, этот наклон положителен, т. е. увеличение содержания меланина сильно влияет на сигнал, отраженный от участка новообразования. Поскольку поглощение меланина больше в области коротких длин волн и меньше в красной и ближней ИК спектральных областях [43], то это влияние в обеих частях спектров отражения различно, и наклон кривой меняется от отрицательного для непигментированной нормальной кожи до положительного для сильно меланин-пигментированных образований.

Разные авторы использовали множество спектральных особенностей, выделенных из полученных для новообразований *in vivo* спектров флуоресценции и диффузного отражения. Например, если для определения различных пигментированных кожных новообразований применяются измерения коэффициентов отражения, то для дифференциации доброкачественных и злокачественных патологий используются специфические особенности полученных спектров, такие как среднее значение характерной длины (длин) волны, наклон спектра в одной или более спектральных областях, интегральное значение отраженного сигнала для специфического диапазона длин волн [21, 22, 42]. В зависимости от специфических спектральных особенностей, используемых разными авторами, чувствительность (SE – sensitivity) и избирательность (SP – specificity) метода отражательной спект-

роскопии могут изменяться в широком диапазоне. Таким образом, отношения SE:SP, которые приводятся в различных работах, составляют 76:87 [44], 80:46 [45], 83.6:90.8 [21], 89:88 [46] и 90.3:77.4 [47].

В наших исследованиях мы также попытались найти наиболее информативные особенности спектров автофлуоресценции и отражения, которые обладали бы максимальной избирательностью обнаружения различных патологий, а также предложить некоторые алгоритмы для достижения этой цели [6, 30, 34, 40]. На основании предварительно разработанных спектроскопических алгоритмов дифференциации здесь представлены диагнозы, установленные по набору данных 24 пациентов.

В табл.1–3 приведены диагнозы, поставленные с помощью методов ЛИАФС, ДОС и колориметрических параметров SH Σ , а также результаты гистологических исследований – так называемые истинные диагнозы. Используются данные восьми пациентов из каждой группы патологий, объединенные согласно результатам предварительных клинического и дерматоскопического исследований. Это позволяет нам дать несколько хороших примеров возможных ошибочных клинических диагнозов, установленных как в результате первоначального исследования новообразований, так и с помощью спектральных методов.

В табл.1–3 знаком плюс обозначены случаи, в которых гистологический диагноз совпадает с диагнозом, установленным с помощью конкретного метода или параметра, знаком минус – случаи, когда при использовании конкретного метода/параметра тип патологии диагностировался неправильно. В случаях ошибочного диагноза указывается тип новообразования, установленный с помощью используемых методов: BN – доброкачественный невус, DN – дисплазийный невус, ММ – злокачественная меланома, ВСС (base-cell carcinoma) – базово-клеточная карцинома, НЕМ (heamangioma) – гемангиома. Последние две патологии в данной статье, посвященной меланин-пигментированным доброкачественным и злокачественным кожным образованиям, не рассматриваются и даны в таблицах только в качестве примера диагностической ошибки.

В таблицах представлены восемь образований, диаг-

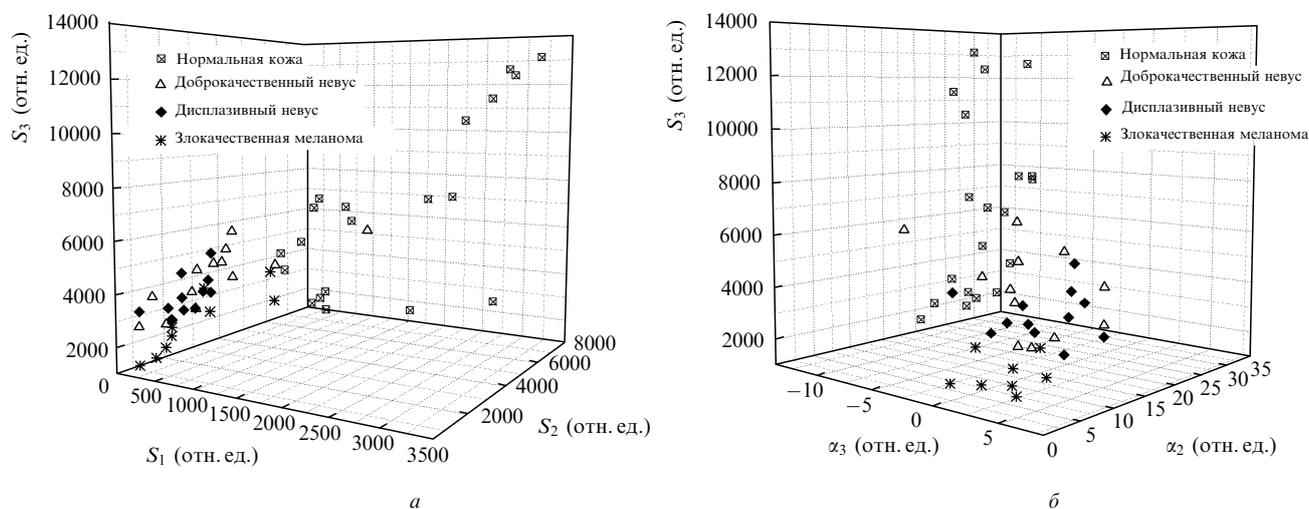


Рис.3. Трехмерные распределения спектральных признаков, выбранных в качестве наилучших дифференцирующих характеристик для диагностики нормальной кожи, доброкачественных сложных невусов, дисплазийных невусов и злокачественной меланомы: S_1 – площадь под кривой спектра отражения на участке 450–530 нм, S_2 – на участке 570–700 нм и S_3 – на участке 700–900 нм (а); наклон α_3 спектральной кривой на участке 700–900 нм и α_2 – на участке 570–700 нм, а также площадь S_3 на участке 700–900 нм (б).

ностированных с помощью дерматоскопического исследования с использованием критериев ABCD для дифференцирования сложных и дермальных невусов (табл.1) и дисплазийных невусов (табл.2) в качестве доброкачественных патологий, а также пигментированной злокачественной меланомы (табл.3). Спектроскопическая оценка проводилась после первоначальных клинических и дерматоскопических исследований, и независимо устанавливались диагнозы, основанные на разработанных нами ранее [32, 40] диагностических алгоритмах, использующих особенности спектров флуоресценции и отражения образований. После оптического исследования DN и MM удалялись хирургически вследствие их злокачественности, доброкачественные невусы удалялись согласно требованию пациентов по косметическим соображениям. Затем проводился гистологический анализ всех представленных патологий.

В табл.1 наиболее интересным примером для обсуждения диагностической точности применяемых спектральных методов является пациент М.В. Исходя из первоначального клинического исследования, образование классифицировалось как доброкачественный невус, однако из колориметрических критериев оценки только параметр «цветовой тон» классифицировал его как дермальный невус. В данном случае наблюдался очень низкий уровень автофлуоресцентного сигнала и такие особенности спектра отражения, в соответствии с которыми он мало отличается от спектра дисплазийного невуса или меланомы. Поэтому диагноз на основе параметра Н также ошибочен. Другие два параметра (S и Σ) отражают истинный характер патологии исследуемого образования. Изъязвленный сложный невус (пациент Т.Г.) ошибочно диагностирован при использовании только особенностей отражения и его колориметрических отклонений. С использованием безразмерных соотношений $R_1 = I_{norm}(500\text{ нм})/I_{pig}(700\text{ нм})/I_{norm}(700\text{ нм})/I_{pig}(500\text{ нм})$, $R_2 = I_{pig}(500\text{ нм})/I_{pig}(575\text{ нм})$, $R_3 = I_{pig}(575\text{ нм})/I_{pig}(700\text{ нм})$ [6, 34] из спектров отражения новообразования было получено необычное заключение: исследуемое новообразо-

вание может являться гемангиомой. Это связано с большим влиянием поглощения излучения кровью на диффузное отражение от патологического объекта, вызванным кровотоком из объекта. Диагноз ВСС, полученный с помощью колориметрических признаков S и Σ, также обусловлен влиянием гемоглобина на спектры диффузного отражения. Одними из хорошо выраженных особенностей ВСС в режиме отражения являются связанные с присутствием гемоглобина более глубокие минимумы на длинах волн 420, 543 и 575 нм, которые коррелируют с цветовыми особенностями, наблюдаемыми в данном частном случае изъязвленного невуса. У пациента М.Д. – также ошибочный диагноз. Очень низкий уровень сигнала автофлуоресценции, близкий к характерным для дисплазийных невусов средним значениям, и колориметрические характеристики Н и Σ также указывают на DN. Само новообразование, по данным визуального наблюдения, чрезвычайно пигментировано, что оказывает сильное влияние как на уровень сигнала ЛИАФ, так и на параметры Н и Σ при колориметрической интерпретации отраженного сигнала.

В табл.2 представлены результаты диагностирования методами ЛИАФС, ДОС и колориметрии пациентов с первоначальным дерматоскопическим диагнозом DN. Большая часть группы диагностирована правильно, однако два случая представляются интересными для обсуждения в данной статье. Это пациент М.Д. с интенсивно пигментированным невусом, который ошибочно диагностирован с помощью спектроскопических методов как более злокачественное новообразование – MM (таким образом, увеличился показатель недоверия к спектральным диагностическим методам), и пациент Р.В., которому при дерматоскопическом наблюдении изначально был поставлен ошибочный диагноз DN, тогда как по результатам абсолютного большинства методов это MM. Поскольку гистологическая оценка совпадает с диагнозом, полученным спектроскопическими методами, только диагноз пациента М.Д. считается ошибочным.

Табл.1. Диагнозы, установленные методами ЛИАФС, ДОС и SHΣ, а также на основе гистологического исследования новообразований (истинный диагноз). Первоначальный диагноз, поставленный при визуальном и дерматоскопическом исследовании, – доброкачественный невус (BN).

Пациент (пол, возраст)	ЛИАФС	ДОС	S	H	Σ	Истинный диагноз
К.Р. (Ж, 31)	+	+	+	DN	+	Сложный невус
М.Д. (Ж, 20)	+	+	+	DN	DN	Сложный невус
С.С. (Ж, 40)	+	+	+	+	+	Сложный невус
Т.Г. (Ж, 20)	+	HEM	BCC	DN	BCC	Сложный невус
А.А. (Ж, 32)	+	+	+	DN	MM	Дермальный невус
К.Т. (Ж, 29)	+	+	+	MM	+	Дермальный невус
М.В. (М, 43)	MM	MM	MM	+	MM	Лентиго MM
М.Д. (Ж, 20)	DN	+	+	DN	DN	Дермальный невус

Примечание. Ж – женщина, М – мужчина.

Табл.2. Диагнозы, установленные методами ЛИАФС, ДОС и SHΣ, а также на основе гистологических исследований новообразований (истинный диагноз). Первоначальный диагноз, поставленный при визуальном и дерматоскопическом исследовании, – дисплазийный невус (DN).

Пациент (пол, возраст)	ЛИАФС	ДОС	S	H	Σ	Истинный диагноз
К.Т. (Ж, 29)	+	+	BN	+	+	DN
Л.Р. (Ж, 36)	BN	+	BN	+	+	DN
М.Д. (Ж, 23)	MM	MM	BN	MM	MM	DN
Р.Г. (М, 32)	+	+	+	MM	+	DN
Р.В. (Ж, 25)	MM	MM	MM	MM	MM	Лентиго MM
Р.Д. (Ж, 29)	+	+	+	+	+	DN
Р.Т. (М, 42)	+	+	+	MM	+	DN
Т.Г. (Ж, 20)	+	BN	BN	+	+	DN

Примечание. Ж – женщина, М – мужчина.

Табл.3. Диагнозы, установленные методами ЛИАФС, ДОС и ШΣ, а также на основе гистологических исследований новообразований (истинный диагноз). Первоначальный диагноз, поставленный при визуальном и дерматоскопическом исследовании, – дисплазийный невус (ММ).

Пациент (пол, возраст)	ЛИАФС	ДОС	S	H	Σ	Истинный диагноз
D.O. (М, 87)	+	+	+	+	+	Лентиго ММ
Н.Н. (М, 31)	BN –	DN –	BN –	DN –	BN –	Врожденный невус
I.I. (М, 73)	+	+	+	+	+	Лентиго ММ
I.J. (М, 71)	DN –	+	+	+	+	Лентиго ММ
I.S. (М, 57)	+	HEM –	BCC –	+	+	Узелковая ММ
К.С. (Ж, 52)	+	+	+	+	+	Лентиго ММ
М.Т. (Ж, 67)	+	BN –	BN –	DN –	BN –	Узелковая ММ
S.Y. (М, 68)	DN –	+	BCC –	+	BCC –	Узелковая ММ

Примечание. Ж – женщина, М – мужчина.

В табл.3 представлены восемь пациентов с первоначально установленной патологией – ММ. После дерматоскопической оценки произведены спектральные измерения и получены независимые дополнительные диагностические заключения. Первое заключение, которое могло быть сделано по полученным результатам, – лентиго меланомы лучше распознаются спектральными методами, чем узелковые новообразования. В случае узелкового новообразования (пациент М.Т.) определение патологии методом отражательной спектроскопии дало ошибочный результат. Случай пациента Н.Н. представляет интерес, поскольку первоначальный диагноз, поставленный с помощью визуального и дерматоскопического исследований, не совпадает с клиническим. Проведенное после первоначальной оценки спектральное наблюдение также не дало единого заключения о характере невусов – доброкачественном или дисплазийном.

Алгоритм, применяемый для определения типа патологии, базируется на предварительно собранной базе данных спектральных особенностей нескольких видов доброкачественных и злокачественных новообразований кожи: это уровни интенсивности, безразмерные от-

ношения, наклоны и/или площади участков спектров [42]. Таким образом, при появлении нового вида патологии возможен ошибочный диагноз, если ее признаки близки к уже запрограммированным в используемом алгоритме. Понятие «новая» используется с точки зрения собранного набора данных и алгоритма, разработанного на основе выбранных особенностей спектров автофлуоресценции и отражения, которые находятся в нашей базе данных. В этом особом случае используемые спектральные алгоритмы дают смесь ошибочных диагнозов в рамках классификации доброкачественных и дисплазийных невусов. После гистологической оценки патологии образование было классифицировано как врожденный невус – доброкачественная меланин-пигментированная патология кожи.

На основании диагнозов, представленных в табл.1 – 3, мы можем оценить статистические параметры применяемых методов диагностики по сравнению с «золотым стандартом» гистологического исследования. В табл.4 и 5 представлены чувствительность, специфичность, диагностическая точность и другие статистически важные параметры, служащие для определения пригодности применяемых спектральных и колориметрического методов как отдельно (табл.4), так и в комбинации (табл.5).

Использование простого спектроскопического метода, такого как лазерно-индуцированная автофлуоресцентная спектроскопия или диффузная отражательная спектроскопия кожных пигментированных образований, дает значения чувствительности, специфичности и общей диагностической точности применяемых алгоритмов, близкие к полученным с помощью дерматоскопического исследования патологий кожи опытными дерматологами [48]. Эти результаты намного лучше полученных при начальном визуальном исследовании такого вида патологий, которое в большинстве случаев является источником предварительного диагноза при существовании подозрительных образований на коже пациента [49]. Однако статистические параметры могут быть улучшены при использовании дополнительных особенностей спектров автофлуоресценции или отражения, так же как и двух или трех методов и алгоритмов, для дифференциации и оценки пигментированных кожных патологий.

В табл.5 представлены данные, позволяющие судить о диагностической пригодности метода оценки злокачественных меланом с помощью комбинирования алгоритмов, основанных на методах флуоресценции и отра-

Табл.4. Статистические параметры правильного диагноза данного типа меланин-пигментированной кожной патологии, поставленного методами ЛИАФС, ДОС и ШΣ по отдельности.

Диагноз	Метод	SN (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)	IS (%)	DA (%)
BN	ЛИАФС	87.5	93.8	87.5	93.8	100	77.8
	ДОС	75	87.5	75	87.5	100	60
	ШΣ	50	93.8	80	78.9	62.5	44.4
DN	ЛИАФС	71.4	82.4	62.5	87.5	114.3	50
	ДОС	71.4	94.1	83.3	88.9	85.7	62.5
	ШΣ	85.7	88.2	75	93.8	114.3	66.7
ММ	ЛИАФС	77.8	93.3	87.5	87.5	88.9	70
	ДОС	77.8	93.3	87.5	87.5	88.9	70
	ШΣ	77.8	93.3	87.5	87.5	88.9	70

Примечание: SN (sensitivity) – чувствительность; SP (specificity) – специфичность; PPV (positive predictive value) – положительная прогностическая ценность; NPV (negative predictive value) – отрицательная прогностическая ценность; IS (index of suspicion) – индекс сомнения; DA (diagnostic accuracy) – диагностическая точность.

Табл.5. Статистические параметры пигментированной злокачественной меланомы (правильный диагноз), полученные с использованием комбинации алгоритмов на основе методов ЛИАФС, ДОС и СНΣ.

Метод	SN (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)	IS (%)	DA (%)
ЛИАФС + ДОС	100	93.3	90	100	111.1	90
ДОС + СНΣ	88.9	93.3	88.9	93.3	100	80
ЛИАФС + ДОС + СНΣ (3/3)	55.6	93.3	83.3	77.8	66.7	50
ЛИАФС + ДОС + СНΣ (2/3)	77.8	93.3	87.5	87.5	88.9	70
ЛИАФС + ДОС + СНΣ (1/3)	100	93.3	90	100	111.1	90

жения, отражения и колориметрии, а также комбинирования трех видов измерений и оценок – флуоресценции, отражения и колориметрии. В первых двух случаях, когда для определения меланомы используются два вида алгоритмов, в качестве положительного результата принимается ситуация, когда один из двух алгоритмов показывает, что новообразование является злокачественным. При использовании всех трех видов алгоритмов (ЛИАФС + ДОС + СНΣ) оцениваются три ситуации: только одна из трех аппроксимаций свидетельствует о правильности диагноза (ММ), две из трех аппроксимаций дают тот же результат и все три алгоритма, основанные на различных особенностях автофлуоресценции, диффузного отражения или колориметрии, дают аналогичные заключения о виде патологии.

Когда три метода оценки применяются раздельно, диагностическая точность определения злокачественной меланомы составляет ~70 %. При комбинировании этих методов достигаются значительно лучшие результаты. Комбинация ДОС и СНΣ дает диагностическую точность ~80 % что, ниже, чем в случае комбинации ЛИАФС и ДОС. Поскольку параметры S, H и Σ получены из спектров диффузного отражения образования, они несут информацию о самом образовании и являются дополнением к спектру отражения. Однако, используя эти параметры, мы повышаем на 10% диагностическую точность, достигнутую при использовании только одного из алгоритмов выбора решения; кроме того, колориметрическая аппроксимация могла бы при дальнейшем ее развитии упростить при необходимости оборудование, используемое для клинических приложений. Наилучшие результаты достигнуты при обычном применении комбинации ЛИАФС и ДОС. Достигнутая диагностическая точность составляет 90 %, чувствительность и специфичность превышают 90 % (100 % и 93.3 % соответственно). Такие же результаты получены, когда применяются все три метода – флуоресцентный, отражательный и колориметрический, и новообразование считается злокачественным, если данный диагноз подтвержден одним из трех методов. Такой результат, возможно, связан с небольшим числом пациентов (24 пациента с патологиями BN, DN и MM), задействованных в данном эксперименте. В случае более обширного набора данных совместное использование всех трех методик должно увеличить диагностическую точность.

Стоит отметить, что если учитываются два из трех или три из трех индикаторов одновременно, то чувствительность, специфичность и диагностическая точность быстро снижаются вследствие неопределенности в оценке новообразования с помощью отдельных методик. Результаты будут отрицательными, если все три методики указывают на один и тот же диагноз; диагностическая точность в данном случае составляет около 50 %, что неприемлемо для клинических приложений.

4. Заключение

Степень распространенности и летальности меланомы увеличивается во многих странах. Очевидно, что стандартная биопсия может быть причиной диссеминации раковых клеток и не рекомендуется к использованию. В связи с этим развитие неинвазивных, быстрых и надежных методов, таких как оптическая биопсия, проходит успешно.

В данном исследовании мы продемонстрировали потенциал оптической биопсии, использующей комбинацию методов ЛИАФС, ДОС и колориметрическую оценку параметров цветности, полученных из спектров отражения нормальных и аномальных участков кожи, для дифференциальной диагностики распространенных доброкачественных и злокачественных меланин-пигментированных кожных образований. Наилучшие результаты достигаются при комбинации лазерно-индуцированной автофлуоресценции и диффузной отражательной спектроскопии, обычно используемых для определения злокачественных меланом. Диагностическая точность достигает 90 %, чувствительность и специфичность составляют соответственно 100 % и 93.3 %. Мы также обсудили некоторые источники спектральных особенностей спектров флуоресценции и отражения исследуемых образований. Эти результаты могут быть использованы для лучшего понимания применимости оптической биопсии и расширения диапазона возможностей, связанных с ранней диагностикой и дифференциацией кожных заболеваний.

Работа поддержана Болгарским министерством образования и науки, грант MUF-03/05 «Создание прибора и методик оптической биопсии кожи человека» и грант M-1422/04 «Расширение и улучшение возможностей применения оптической биопсии и ее утверждение в диагностике злокачественных кожных опухолей».

1. Wang L., Wu H. *Biomedical Optics: Principles and Imaging* (Hoboken: Wiley-Interscience, 2007).
2. Svanberg S. *Phys. Scr. T*, **110**, 39 (2004).
3. Tuchin V. *Handbook of Biomedical Diagnostics* (Bellingham: SPIE Press, 2002).
4. Sinichkin Yu., Utz S., Mavliutov A., Pilipenko H. *J Biomed Opt.*, **3**, 201 (1998).
5. Kollias N., Zonios G., Stamatias G. *Vib. Spectrosc.*, **28**, 17 (2002).
6. Borisova E., Troyanova P., Avramov L. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **6257**, 0U-1 (2006).
7. Vo-Dinh T., Cullum B., in *Biomedical Photonics Handbook* (Boca Raton, FL: CRC Press, 2003).
8. Mantareva V., Kussovski V., Angelov I., Borisova E., Avramov L., Woehrl D. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4829 (2007).
9. Drakaki E., Makropoulou M., Mallas E., Serafetinides A. *Proc SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3571**, 392 (1999).
10. Mantareva V., Petrova D., Avramov L., Angelov I., Borisova E., Peeva M., Woehrl D. *J. Porphyr. Phthalocyan.*, **9**, 47 (2005).
11. Bachmann L., Zzell D., da Costa Ribeiro A., Gomes L., Ito A. *Appl. Spectr. Rev.*, **41**, 575 (2006).

12. Bigio J., Mourant J. *Phys. Med. Biol.*, **42**, 803 (1997).
13. Churmakov D., Meglinski I., Piletsky S., Greenhalgh D. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, 1722 (2003).
14. Makropoulou M., Drakaki E., Anastassopoulou N., Raptis Y., Serafetinides A., Paphiti A., Tsiligiris B., Arapoglou B., Demakakos P. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3564**, 68 (1999).
15. Kollias N., Gillies R., Moran M., Kochevar I., Anderson R. *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 776 (1998).
16. Smits T., Kleinpenning M., van Erp P., van de Kerkhof P., Gerritsen M.-J. *Brit. J. Dermatol.*, **155**, 429 (2006).
17. Mourant J., Bigio I., in *Biomedical Photonics Handbook* (Boca Raton, FL: CRC Press, 2003).
18. Mirabal Y., Chang S., Atkinson E., Malpica A., Follen M., Richards-Kortum R. *J. Biomed. Opt.*, **7**, 587 (2002).
19. Rigal J., Abella M., Giron F., Caisey L., Lefebvre M. *Skin Res. Tech.*, **13**, 101 (2007).
20. Zonios G., Perelman I., Backman V., Manahoran N., Fitzmaurice M., Van Dam J., Feld M. *Appl. Opt.*, **38**, 6628 (1999).
21. Wallace V., Crawford D., Mortimer P., Ott R., Bamber J. *Phys. Med. Biol.*, **45**, 735 (2000).
22. Marchesini R., Bono A., Baroli C., Lualdi M., Tomatis S., Cascinelli N. *Melanoma Research*, **12**, 279 (2002).
23. Kienle A., Lilge L., Patterson M., Hibst R., Steiner R., Wilson B. *Appl. Opt.*, **35**, 2304 (1996).
24. Pfefer T., Matchette L., Bennett C., Gall J., Wilke J., Durkin A., Ediger M. *J. Biomed. Opt.*, **8**, 206 (2003).
25. Park B., Youn J. *Skin Res. Tech.*, **4**, 14, (1998).
26. Angelopoulou E. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4299**, 243 (2001).
27. Clarys P., Alewaeters K., Lambrecht R., Barel A. *Skin Res. Tech.*, **6**, 230 (2000).
28. Zeng H., MacAulay C., Palcic B., McLean D. *Phys. Med. Biol.*, **38**, 231 (1993).
29. Palmer G., Marshek C., Vrotsos K., Ramanujam N. *Las. Surg. Med.*, **30**, 191 (2002).
30. Pavlova P., Borisova E., Avramov L. *Proc. 9th National Conf. on Biomed. Phys. Eng.* (Sofia, Bulgaria, 2004, p. 260).
31. Wolff K., Gschnait F., Honigsmann H., Konrad K., Parrish J., Fitzpatrick T. *Brit. J. Dermatol.*, **96**, 1 (1977).
32. Borisova E., Troyanova P., Stoyanova V., Avramov L. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5830**, 394 (2005).
33. Jacques S., Saidi I., Ladner A., Oelberg D. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2975**, 115 (1997).
34. Borisova E., Troyanova P., Avramov L. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **6734**, 6734-16 (2007).
35. Pierard G. *J. Europ. Acad. Dermatol. Venerol.*, **10**, 1 (1998).
36. *Colorimetry* (Central Bureau of the CIE, Vienna, Austria, 1986, Publ. CIE No.15.2).
37. Gonzalez R., Woods R. *Digital Image Processing* (Addison Wesley Publ. corp. 1992).
38. Роджерс Д. *Алгоритмические основы машинной графики* (М.: Мир, 1989).
39. Borisova E., Pavlova P., Troyanova P., Avramov L. in *Chromatic Monitoring of Complex Conditions* (London, UK: Taylor and Francis – CRC Press, 2008).
40. Troyanova P., Borisova E., Stoyanova V., Avramov L. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **6284**, 0K-1 (2006).
41. Drakaki E., Borisova E., Makropoulou M., Avramov L., Serafetinides A., Angelov I. *Skin Res. Tech.*, **13**, 350 (2007).
42. Stoyanova V., Troyanova P., Borisova E., Avramov L. *Proc. IV Int. Symp. LTL'05* (Plovdiv, Bulgaria, 2006, p. 256).
43. Bashkatov A., Genina E., Kochubey V., Tuchin V. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38**, 2543 (2005).
44. Wallace V., Bamber J., Crawford D., Ott R., Mortimer P. *Phys. Med. Biol.*, **45**, 2859 (2000).
45. Farina B., Bartoli C., Bono A., Colombo A., Lualdi M., Tragni G., Marchesini R. *Phys. Med. Biol.*, **45**, 1243 (2000).
46. Tomatis S., Bartoli C., Bono A., Cascinelli N., Clemente C., Marchesini R. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **42**, 32 (1998).
47. Marchesini R., Cascinelli N., Brambilla M., Clemente C., Mascheroni L., Pignoli E., Testori A., Venturoli D. *Photochem. Photobiol.*, **55**, 515 (1992).
48. Troyanova P. *Skin Res. Tech.*, **9**, 269 (2003)
49. Troyanova P. *Dermatoscopy. Manual for Dermatological Practice (in Bulgarian)* (Sofia: Program Products and Systems Ltd., 2000).