

Мультиодальная диагностика и визуализация онкологических патологий

В.П.Захаров, И.А.Братченко, О.О.Мякиннин, Д.Н.Артемьев, Д.В.Корнилин,
С.В.Козлов, А.А.Морятов

Продemonстрировано совместное применение оптической когерентной томографии, спектроскопии комбинационного рассеяния и автофлуоресценции биотканей для анализа злокачественных новообразований человека. Быстрое обследование обширных областей биотканей (на уровне целых органов) возможно с использованием автофлуоресцентного отклика. При этом выделяются зоны возможных патологий, далее в интересующей нас зоне можно провести визуализацию топологии новообразования с микронной точностью за счет применения оптической когерентной томографии. В случае подозрения на злокачественность выполняется анализ спектра комбинационного рассеяния биоткани, позволяющий установить тип образования с чувствительностью и специфичностью ~85%. Предложена экспериментальная схема с совместным использованием указанных методов диагностики, являющаяся прототипом медицинской системы комплексного анализа новообразований.

Ключевые слова: мультиодальная диагностика, неинвазивная диагностика, оптическая когерентная томография, комбинационное рассеяние, автофлуоресцентный анализ.

1. Введение

Число ежегодно регистрируемых в мире злокачественных новообразований растет, и по прогнозам медиков в ближайшие десятилетия число онкологических больных будет неуклонно увеличиваться [1]. За последние 20–25 лет в разы повысилось количество выявляемых злокачественных и доброкачественных новообразований кожи, легких, кишечного тракта и других внутренних органов [2, 3]. При этом эффективность диагностики злокачественных новообразований для разных типов рака различна, но в общем случае остается неудовлетворительной на этапе ранней диагностики врачами общей практики, что связано со сложностью интерпретации клинических дифференциальных признаков образований на ранней стадии [4]. Низкая эффективность начальной диагностики онкологических заболеваний способствует развитию новообразований и в конечном счете увеличивает риски смертельного исхода. В связи с этим необходимо использование инструментальных методов диагностики.

Метод оптической когерентной томографии (ОКТ) дает возможность исследовать структуру опухоли [5, 6]. В отличие от таких методов, как ультразвуковое исследование, компьютерная томография и магнитно-резонансная томография, которые могут быть полезны при определении области инвазии опухоли, ОКТ позволяет обнаружить неоднородности в биоткани размером в несколько микрометров. ОКТ используется для двумерной и трех-

мерной визуализации тканей глаза, молочной железы, легких, кожи, толстой кишки, гортани и других тканей. В частности, было показано, что ОКТ является мощным инструментом для диагностики базально-клеточного рака кожи (базалиомы) [7] в связи с его специфической пространственной локализацией. Тем не менее в большинстве случаев ОКТ дает только подробную информацию о морфологических особенностях опухоли без возможности точного определения типа рака. Как правило, чувствительность и специфичность диагностики методом ОКТ не превышает 75%–85% для разных типов рака. Более того, во многих случаях высокая чувствительность (около 85%) сопровождается низкой специфичностью (60%–70%). Отсюда следует, что методы ОКТ должны быть объединены с другими спектральными методами для точного определения типа опухоли.

Одним из таких методов неинвазивного анализа образований является спектроскопия комбинационного рассеяния (КР). Данный метод использовался рядом авторов для анализа новообразований при исследованиях *in vivo* и *ex vivo* кожи [8], легких [9], груди [10], кишечника [11] и других биотканей. Так, в работах [12, 13] была продемонстрирована высокая эффективность метода КР при диагностике меланомы и плоскоклеточного рака кожи: достигнуты чувствительность 91% и специфичность 75%. Однако при переходе к массовым скрининговым исследованиям чувствительность и специфичность метода существенно уменьшаются [14]. Последнее связано с сильной зависимостью интенсивности пиков КР от концентрации биохимических компонентов тканей и с использованием абсолютных критериев в методах, предложенных в указанных выше работах. В связи с этим актуальным является развитие методов вариативного анализа КР для диагностики новообразований у человека, а также применение других методов спектрального анализа для повышения точности такой диагностики.

Одним из многообещающих способов спектрального анализа биотканей является исследование их собствен-

В.П.Захаров, И.А.Братченко, О.О.Мякиннин, Д.Н.Артемьев, Д.В.Корнилин. Самарский государственный аэрокосмический университет имени академика С.П.Королева (национальный исследовательский университет), Россия, 443086 Самара, Московское ш., 34; e-mail: zakharov@ssau.ru

С.В.Козлов, А.А.Морятов. Самарский государственный медицинский университет, Россия, 443099 Самара, ул. Чапаевская, 89

Поступила в редакцию 16 апреля 2014 г., после доработки – 15 июня 2014 г.

ной автофлуоресценции (АФ). Данный подход позволяет проводить сравнение спектральных характеристик новообразования и прилегающей здоровой ткани, что, в свою очередь, повышает информативность спектральных исследований.

Таким образом, для визуализации опухолей целесообразно применять метод ОКТ, а для повышения точности исследований в настоящей работе предложено использовать фазовый метод определения типа образования совместно с методом спектроскопии КР. Рассмотрены различные математические подходы к классификации групп новообразований. Для быстрого определения границ новообразования и повышения точности диагностики предложено также использовать АФ биоткани.

2. Материалы и методы исследований

2.1. Экспериментальная установка

Для проведения экспериментов *ex vivo* и *in vivo* использовалась лабораторная установка, объединяющая принципы ОКТ и КР (рис. 1). Установка включала в себя термически стабилизированный полупроводниковый лазерный модуль LML-785.0RB-04 8 (центральная длина волны излучения $\lambda = 785 \pm 0.1$ нм, мощность до 150 мВт) для возбуждения КР, широкополосный лазерный диод 1 ($\lambda = 840 \pm 25$ нм, 20 мВт), интерферометр Майкельсона 2, спектрограф 5 с цифровой ПЗС-камерой 6. Оцифровка интерференционной картины выполнялась с помощью карты захвата изображений. При съемке А-сканов с использованием технологии ОКТ регистрация изображений проводилась с предельным разрешением 3.7 мкм. Выделение линий КР осуществлялось полосовым фильтром. Затем обратно рассеянное лазерное излучение, сигналы АФ и КР направлялись дихроичным зеркалом на широкополосный фильтр, не пропускающий зондирующее излучение. Спектры КР и флуоресценции регистрировались с помощью спектрографа Sharmrock SR-303i и цифровой камеры iDus с разрешением 0.05 мкм при низком уровне шумов. Итоговый спектр КР был получен после выделения из регистрируемого сигнала составляющей АФ.

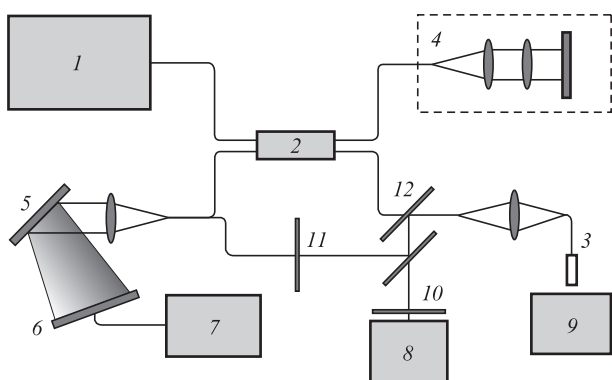


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: 1 – широкополосный источник света ($\lambda \sim 840$ нм); 2 – интерферометр Майкельсона; 3 – оптоволоконный зонд; 4 – опорное плечо интерферометра ОКТ; 5 – спектрограф с высокочувствительной ПЗС-камерой 6; 7 – компьютер; 8 – полупроводниковый лазер ($\lambda = 785$ нм); 9 – исследуемый образец; 10 – полосовой фильтр; 11 – широкополосный фильтр; 12 – дихроичное зеркало.

2.2. Объект исследования

В качестве объектов исследований *ex vivo* использовались образцы различных новообразований кожи и легких человека, удаленных в хирургических отделениях Самарского областного клинического онкологического диспансера. В серии экспериментов *ex vivo* были зарегистрированы спектры КР 23 новообразований кожи: 8 меланом, 4 базалиом, 6 пигментных невусов и 5 других доброкачественных новообразований, а также спектры КР 10 образцов нормальной кожи. При проведении экспериментов *in vivo* были проанализированы 46 спектров КР, полученных при исследовании 9 меланом, 8 базалиом, 2 невусов, 2 доброкачественных опухолей, а также 25 образцов здоровой кожи. Объектами исследований новообразований легкого *ex vivo* служили 11 образцов аденокарциномы и 11 образцов плоскоклеточного рака, при этом для каждого образца регистрировался сигнал от здоровой ткани. Образцы с характерными размерами 2–4 см по каждой из трех координат представляли собой участок патологии, окруженный здоровой тканью.

Регистрация ОКТ-изображений и спектров КР осуществлялась с помощью системы, представленной на рис. 1. Торец оптоволоконного зонда 3 располагался над исследуемой областью на расстоянии 5–7 мм. Позиционирование на объекте излучения для регистрации ОКТ-изображений за счет использования гальванопривода с системой зеркал позволяло проводить согласование данных ОКТ и КР. После регистрации ОКТ-изображения и определения зон здоровой ткани и патологии регистрировалась серия спектров КР области новообразования и здоровой кожи. Время обследования одного пациента составляло не более 3–5 мин. Полученные данные анализировали, сравнивая их с результатами гистологического исследования.

Все пациенты, добровольно участвующие в исследовании, были старше 18 лет. Их предварительное обследование и подготовка к хирургическому лечению проводились в Самарском областном клиническом онкологическом диспансере. Исследование получило положительную оценку комитета по биоэтике Самарского государственного медицинского университета.

3. Результаты исследования биотканей

3.1. Метод ОКТ для визуализации биотканей

Как указывалось во Введении, ОКТ дает возможность определять тип некоторых онкологических патологий. На рис. 2 приведены ОКТ-изображения (В-сканы) базальноклеточного рака и злокачественной меланомы кожи. Разрешение ОКТ позволяет в мельчайших деталях рассмотреть область развития патологии и точно установить зону инвазии. Однако на практике довольно сложно определить тип конкретной опухоли с использованием только метода ОКТ. Если для базально-клеточного рака характерна округлая область «гнезда» (правая стрелка на рис. 2, а), то для меланомы не существует такой топологической закономерности. Каждая меланома имеет уникальное строение и на ОКТ-изображении видны лишь области неоднородности биоткани. Заметим, что встречаются и новообразования базально-клеточного рака, которые не имеют характерной формы, а выглядят как хаотично разбросанные области неоднородностей в здоровой биоткани.

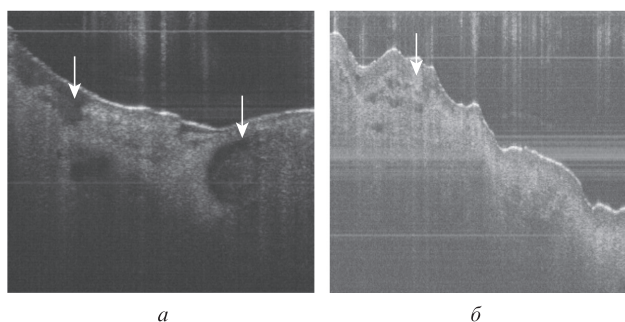


Рис.2. ОКТ-изображения базально-клеточного рака (а) и злокачественной меланомы (б) кожи. Размер исследуемого участка 1.5×1.5 мм. Стрелками указаны области патологии.

Исследования с помощью ОКТ 27 новообразований кожи показали, что диагностика типа опухоли только этим методом возможна лишь в случае базально-клеточного рака. Семь из девяти исследованных образцов базально-клеточного рака содержали характерную округлую неоднородность, в двух образцах она отсутствовала. Из этого следует, что диагностика базально-клеточного рака с использованием ОКТ позволяет добиться чувствительности $\sim 80\%$. Полученные результаты совпадают с данными других исследований [15]. Невозможность определения типа опухоли лишь средствами визуализации и обуславливает необходимость применения для этой цели спектроскопических методов.

3.2. Анализ спектров КР новообразований

Соотношения интенсивностей линий КР в спектрах исследуемых образцов могут существенно отличаться друг от друга. Это связано с различной концентрацией веществ в ткани у разных групп пациентов. Поэтому проводилась нормировка интенсивностей всех спектров на максимум интенсивности пика в полосе $1430\text{--}1460\text{ см}^{-1}$.

Характерные нормированные спектры КР новообразований и нормальной кожи представлены на рис.3. Видно, что максимальную интенсивность в спектре КР имеет полоса $1430\text{--}1460\text{ см}^{-1}$, которой отвечает изгибная мода колебаний CH_2/CH_3 . Наряду с данной полосой уверенно регистрируются полосы $1240\text{--}1280\text{ см}^{-1}$ (продольная мода колебаний CN), $1300\text{--}1340\text{ см}^{-1}$ (изгибные и скручивающие моды связи CH_2), $1540\text{--}1580\text{ см}^{-1}$ (деформационная мода связи $\text{C}=\text{C}$ и триптофана), $1640\text{--}1680\text{ см}^{-1}$ (продольная колебательная мода $\text{C}=\text{O}$ в соединениях Амид I) [16].

Наиболее существенные изменения в спектрах КР новообразований по сравнению со спектрами КР нормальной кожи происходят в полосах $1300\text{--}1340\text{ см}^{-1}$ и $1640\text{--}1680\text{ см}^{-1}$. При этом, если в полосе $1640\text{--}1680\text{ см}^{-1}$ наблюдается уменьшение абсолютной интенсивности КР для всех типов злокачественных новообразований, то в полосе $1300\text{--}1340\text{ см}^{-1}$, в отличие от результатов работы [17], имеет место уменьшение абсолютной интенсивности КР для базально-клеточного рака и ее увеличение для меланомы по сравнению с таковой для нормальной кожи.

Следует также отметить, что в проведенных экспериментах, в отличие от работ [18, 19], наблюдался двойной пик КР в области $1300\text{--}1340\text{ см}^{-1}$. При этом для всех типов злокачественных новообразований происходит перераспределение интенсивности излучения между двумя пиками по сравнению с распределением интенсивности КР для нормальной кожи в указанной области спектра (рис.3).

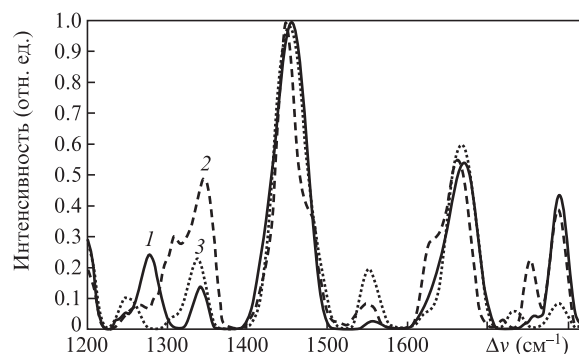


Рис.3. Нормированные спектры КР здоровой кожи (1), меланомы (2) и базально-клеточного рака (3).

Различие спектров КР новообразований и здоровой кожи может быть связано с увеличением концентрации нуклеиновых кислот и изменением структуры белков [18, 19] в клетках новообразования, а изменение абсолютной интенсивности КР, по-видимому, объясняется уменьшением плотности белков, встроенных в мембраны клеток новообразований, и увеличением общего удельного веса данных клеток.

Регистрация интенсивностей определенных полос спектра КР новообразования позволяет установить его тип. В нашем исследовании в качестве таких полос были выбраны следующие: $1300\text{--}1340\text{ см}^{-1}$, $1440\text{--}1460\text{ см}^{-1}$ и $1640\text{--}1680\text{ см}^{-1}$.

Большинство известных методов анализа спектров КР новообразований кожи [16–22] основаны на введении так называемых пороговых интенсивностей в полосах $1300\text{--}1340\text{ см}^{-1}$, $1640\text{--}1680\text{ см}^{-1}$ и $1440\text{--}1460\text{ см}^{-1}$. При этом чувствительность и специфичность методов, основанных на абсолютных пороговых характеристиках, не превышает $78\%\text{--}82\%$.

Проведенные нами исследования позволяют сформулировать и предложить другой алгоритм анализа спектра КР новообразований – расчет фазовых критериев для определения типа опухоли. Для этого используется фазовый метод анализа новообразований, который заключается в следующем.

На первом этапе последовательно анализируются полученные спектры КР. Затем вводятся две фазовые характеристики: I_{1320} и I_{1660} – отношения интенсивностей максимумов в полосах $1300\text{--}1340\text{ см}^{-1}$ и $1640\text{--}1680\text{ см}^{-1}$ к интенсивности максимума в полосе $1440\text{--}1460\text{ см}^{-1}$. Тогда каждое измерение может быть представлено в виде точки на фазовой плоскости с координатами I_{1320} , I_{1660} . Используя в качестве эталонного метода гистологические исследования образцов, проводящиеся независимо от спектральных измерений, мы можем каждую экспериментальную точку на фазовой плоскости отнести к конкретному типу опухоли или к здоровой ткани.

Для выделения классов на фазовой плоскости использовался линейный дискриминантный анализ. Качество подхода характеризовалось его чувствительностью и специфичностью.

3.3. Совместное использование ОКТ и спектроскопии КР для диагностики патологий

При совместном исследовании методами ОКТ и КР довольно просто установить расположение новообразования в здоровых тканях. ОКТ позволяет получить точ-

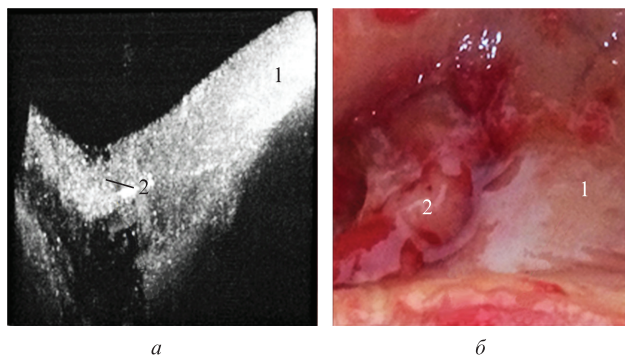


Рис.4. ОКТ-изображение (а) и цифровая фотография (б) образца бронха с метками для проведения КР-исследования: 1 – нормальная биоткань, 2 – опухоль.

ную морфологическую картину новообразования, тем самым помогая врачу определить зону инвазии и уменьшить зону резекции. На рис.4 приведены фотография новообразования в бронхе легкого и его ОКТ-изображение. ОКТ-изображение дает возможность понять, что в здоровой ткани развивается патология, но установить ее тип по В-скану невозможно. После обнаружения опухоли и места ее расположения нужно провести регистрацию спектров КР областей патологии и нормальной ткани.

На этапе анализа спектров КР использовались данные с фазовых плоскостей. Это позволило успешно выделить злокачественные новообразования легкого на фоне здоровой ткани и провести идентификацию меланомы кожи. На рис.5 представлена фазовая плоскость для исследования легкого. Определение злокачественного новообразования возможно с высокой чувствительностью и специфичностью (81% и 84% соответственно), однако установление конкретного типа новообразования (аденокарциномы или плоскоклеточного рака) является затруднительным.

Предварительно рассчитанные значения чувствительности и специфичности метода диагностики меланомы *ex vivo* с использованием фазового метода составили 87.5% и 92% соответственно. При исследованиях *in vivo* чувствительность определения меланомы была равна 77.7%, а специфичность – 87.8% (рис.6).

Из анализа рис.5 и 6 следует, что использование данных о спектрах КР биотканей позволяет добиться уверен-

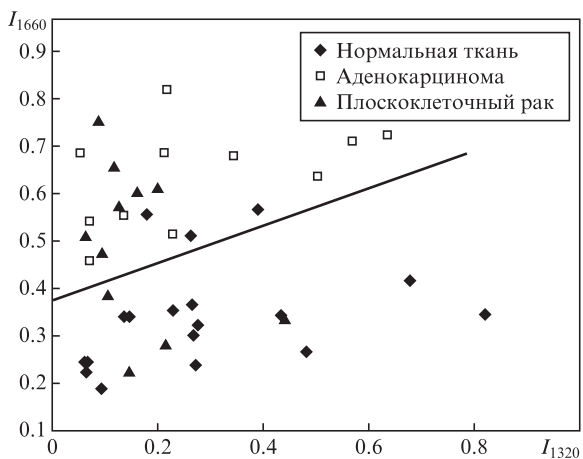


Рис.5. Определение типа ткани легкого при исследовании *ex vivo*. Прямая линия разделяет фазовые точки, соответствующие нормальной ткани и тканям с новообразованиями.

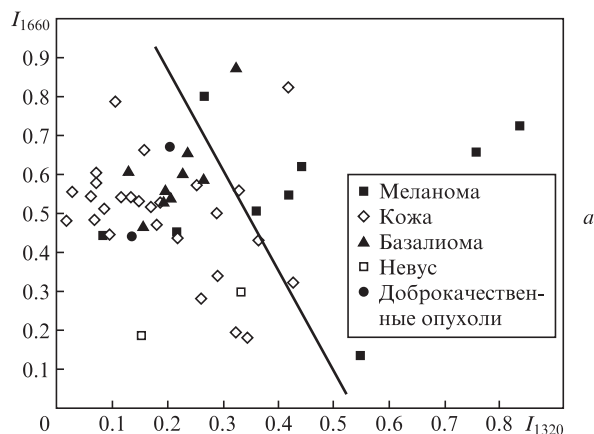
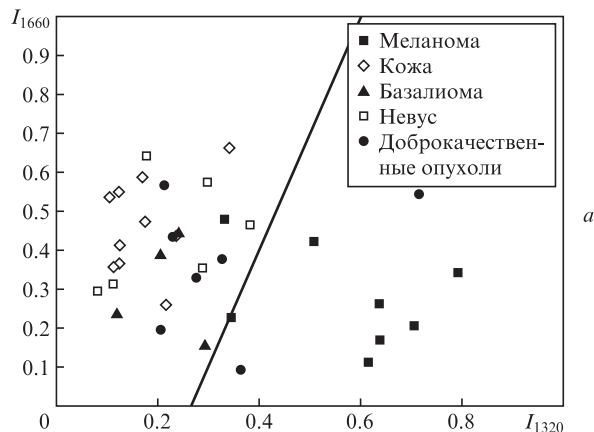


Рис.6. Определение типа ткани кожи при исследованиях *ex vivo* (а) и *in vivo* (б). Прямые линии разделяют фазовые точки, соответствующие нормальной коже и коже с новообразованиями.

ной диагностики злокачественных образований с чувствительностью ~85%.

3.4. Анализ спектров АФ

Для повышения информативности диагностики в проведенном исследовании осуществлялся анализ спектра АФ. Спектроскопия АФ неоднократно использовалась ранее для обнаружения патологий кожи и легкого человека. Известно, что биоткани содержат хромофоры: эластин, коллаген, кератин и NADH, вносящие свой вклад в спектр флуоресценции, а также чисто поглощающие хромофоры: меланин и гемоглобин. Спектроскопия АФ применялась для диагностики различных новообразований кожи: меланоцитарных (меланома, пигментные невусы), базально-клеточного и плоскоклеточного раков и др. [23–30], а также злокачественных опухолей легкого [31].

В настоящей работе проводился анализ АФ новообразований кожи и легкого при ее возбуждении излучением с длиной волны 785 нм. На вид спектра АФ оказывают влияние нуклеиновые кислоты, жиры, меланин, гемоглобин и белки, такие как эластин, коллаген и кератин [32]. Характерный спектр АФ новообразований кожи и легкого имеет вид спадающей с увеличением длины волны экспоненциальной функции. Типичные усредненные спектры новообразований биотканей исследованных образцов представлены на рис.7. Из рис.7,а видно, что интенсивность АФ нормальной ткани значительно больше интенсивности АФ раковой опухоли, а из рис.7,б следует, что интенсивность АФ меланомы существенно превышает ин-

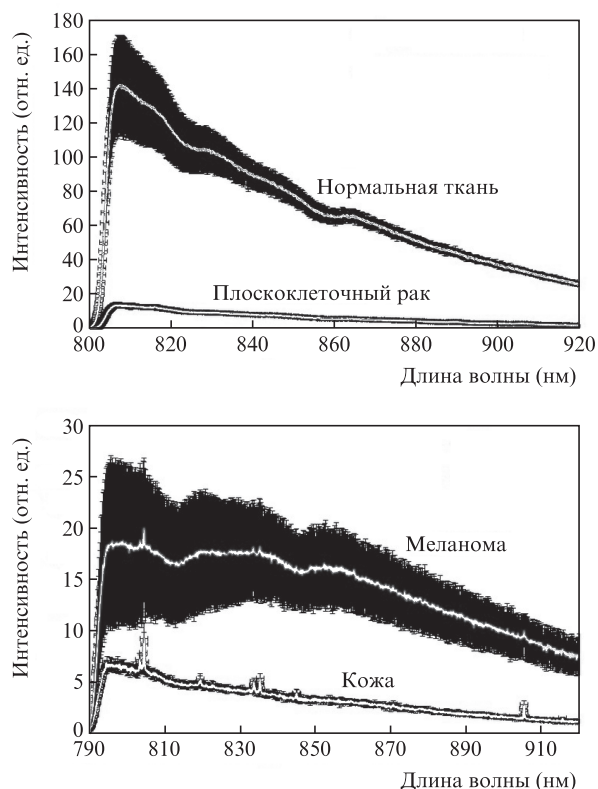


Рис.7. Типичные спектры АФ плоскоклеточного рака (а) и меланомы (б), а также здоровых тканей легкого и кожи соответственно. Указаны доверительные интервалы.

тенсивность АФ нормальной кожи, несмотря на существенный разброс значений интенсивности ($\sim 40\%$) в спектре меланомы. Такой разброс в значениях интенсивности вызван постоянным уменьшением величины сигнала АФ с течением времени при непрерывном облучении образца ткани возбуждающим лазерным излучением.

На основе анализа полученных спектров новообразований кожи был предложен количественный критерий оценки формы спектра, аппроксимированного полиномом 2-го порядка, по его кривизне на участке 810–850 нм. Так, для меланоцитарных новообразований на данном участке отмечался характерный вид спектра в форме «горба». Предложенный критерий позволял с точностью, близкой к 100%, диагностировать невусы и пигментные меланомы, однако провести дифференциацию пигментных меланом и невусов оказалось практически невозможным. Кроме того, данный критерий оценки формы спектра не эффективен для диагностики беспигментной меланомы.

Также одним из направлений применения флуоресцентного анализа может являться быстрое (поскольку сигнал АФ можно накопить за десятки доли секунды) нахождение границ опухоли без определения типа новообразования. На рис.8 представлены интенсивности АФ плоскоклеточного рака в ткани легкого и невуса в здоровой ткани, последовательно зарегистрированные в контрольных точках на образцах исследуемых биотканей на расстоянии 2.5 мм друг от друга. Вычисление пороговой интенсивности АФ осуществлялось методом Оцу [33]. На рис.8,а точки 1–5 соответствуют опухоли, а точки 6–8 – здоровой ткани легкого. Данные результаты подтверждают сказанное выше о том, что сигнал АФ для плоскоклеточного рака легкого существенно меньше, чем для здоровой ткани.

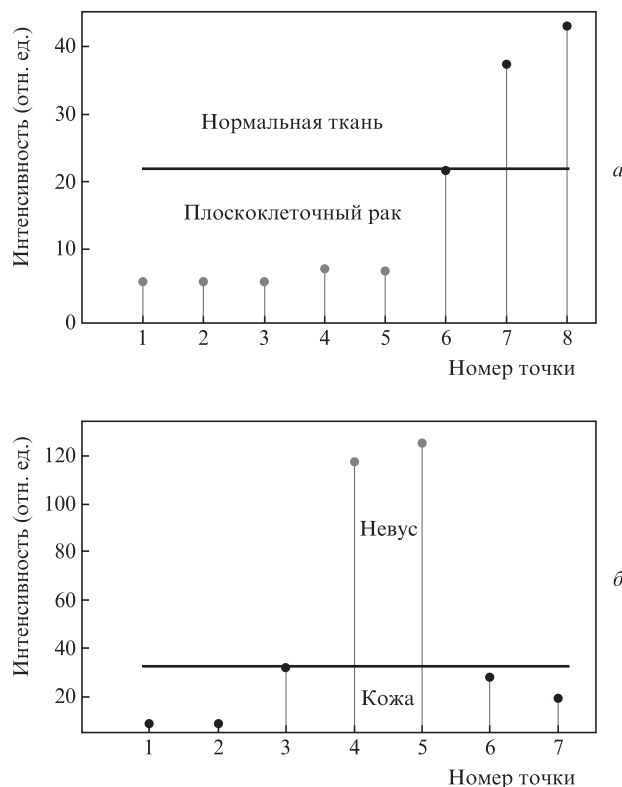


Рис.8. Интенсивности АФ плоскоклеточного рака в ткани легкого (а) и невуса в коже (б), последовательно зарегистрированные в контрольных точках на образцах, расположенных на расстоянии 2.5 мм друг от друга.

На рис.8,б точки 4,5 соответствуют невусу, а точки 1–3 и 6,7 – нормальной коже. Данные результаты подтверждают возможность успешного применения АФ для установления границ опухоли в ткани. Точность определения границ новообразований в данном случае зависит только от диаметра лазерного пучка, который возбуждает АФ биоткани. В настоящей работе диаметр лазерного пучка составлял 1 мм.

Совместное использование спектроскопии АФ и КР позволит быстро определять наличие патологии и ее границы, а при необходимости и тип новообразования в конкретной точке, что, в свою очередь, снизит время диагностики и повысит ее точность.

4. Заключение

Первые результаты исследования разрешающей способности комбинированного метода спектроскопии КР и ОКТ с фазовым анализом полученных параметров показывают его высокую эффективность для диагностики опухолевых тканей легкого и меланомы кожи. Безопасность и быстрота проведения исследования свидетельствуют о больших потенциальных возможностях метода. Для дальнейшего увеличения точности диагностики потребуются усложнение алгоритма анализа данных о спектрах КР новообразований.

Эффективность анализа новообразований также можно повысить, используя данные об АФ биоткани. Привлечение этих данных в среднем увеличивает точность определения типа новообразований на 5%–8%. Кроме того, достоинством АФ-исследования является быстрота проводимого анализа. Разработанная экспериментальная уста-

новка позволяет быстро сканировать большие площади биоткани с использованием спектроскопии АФ, а дальнейший трехмерный анализ подозрительных областей для установления границ патологии нужно проводить с помощью более инерционной, но имеющей микронное пространственное разрешение ОКТ-технологии. Для окончательного определения типа опухоли необходим учет данных о спектрах КР новообразования. При этом каждый метод диагностики может применяться независимо от других методов, что позволяет врачу использовать преимущества того или иного подхода, ориентируясь на конкретного пациента. Рассматриваемый комбинированный метод может стать мощным инструментом для врача-онколога благодаря автоматическому определению типа опухоли, быстрому сканированию органов и получению высокоточной картины расположения новообразования в здоровой ткани.

Другим достоинством предложенного метода является его инвариантность к размерам опухоли: точность диагностики не снижается при анализе малых новообразований (диаметром менее 5 мм), в то время как при визуальном осмотре врачом малый размер новообразования существенно затрудняет диагностику, и ее эффективность снижается до 40%.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ.

- Mathers C.D., Loncar D. *PLoS Med.*, **3**, 2011 (2006).
- Boyle P., Levin B., in *World Cancer Report 2008* (Lyon: IARC Press, 2008).
- Ferlay J., Bray F., Pisani P., in *Cancer Incidence in Five Continents* (Lyon: IARC Press, 2004).
- Friedman R. *Arch. Dermatol.*, **4**, 554 (2008).
- Mogensen M., Thrane L., Jorgensen T.M., Andersen P.E., Jemec G.B.E. *J. Biophoton.*, **2**, 442 (2009).
- Myakinin O.O., Kornilin D.V., Bratchenko I.A., Zakharov V.P., Khranov A.G. *J. Innov. Opt. Heal. Sci.*, **6**, 19 (2013).
- Mogensen M., Nürnberg B.M., Forman J.L., Thomsen J.B., Thrane L., Jemec G.B.E. *British J. Dermatol.*, **160**, 1026 (2009).
- Захаров В.П., Ларин К., Братченко И.А. *Вестник СГАУ*, **26**, 232 (2011).
- Huang Z., McWilliams A., Lui H., David I., McLean D.I. *Int. J. Cancer*, **107**, 1047 (2003).
- Haka A.S., Shenk R., Dasari R.R., et al. *J. Biomed. Opt.*, **14**, 054023 (2009).
- Mavarani L., Petersen D., El-Mashtoly S.F., Mosig A., Tannapfel A., Kötting C., Gerwert K. *Analyst*, **138**, 4035 (2013).
- Захаров В.П., Братченко И.А., Артемьев Д.Н., Мякиннин О.О., Ларин К.В., Козлов С.В., Морятов А.А., Христофова Ю.А. *Физика волновых процессов и радиотехнические системы*, **16**, 73 (2013).
- Захаров В.П., Братченко И.А., Христофорова Ю.А., Корнилин Д.В. *Оптика и спектроскопия*, **115**, 179 (2013).
- Zhao J., Lui H., McLean D.I., Zeng H. *Cancer Res.*, **72**, 2492 (2012).
- Forsea A. *J. Med. Life*, **3**, 381 (2010).
- Zhao J., Lui H., McLean D.I., Zeng H. *New Develop. Biomed. Eng.*, **24**, 455 (2010).
- Manoharan R., Wang Y., Dasari R.P., Singer S.S., Rava R.P., Feld M.S. *Laser Life Sci.*, **6**, 1 (1995).
- Vargis E., Mahadevan-Jansen A., in *Using Raman Spectroscopy to Detect Malignant Changes in vivo* (Princeton: Princeton Instruments, 2011).
- Martin A., Carter R.A., Oliveira Nunes L., Arisawa E.L., Junior L.S. *Biomedical Vibrational Spectroscopy/Biohazard Detection Technologies* (Bellingham, WA: SPIE, 2004).
- Hanlon E.B., Manoharan R., Koo T.W., Shafer K.E., Motz J.T., Fitzmaurice M., Kramer J.R., Itzkan I., Dasari R.R., Feld M.S. *Phys. Med. Biol.*, **45**, R1 (2000).
- Gniadecka M., Philipsen P.A., Sigurdsson S., Wessel S., Nielsen O.F., Christensen D.H., Hercogova J., Rossen K., Thomsen H.K., Gniadecki R., Hansen L.K., Wulf H.C. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 443 (2004).
- Mogensen M., Jemec G.B. *Dermatol. Surg.*, **33**, 1158 (2007).
- Sterenberg H.J.C.M., Motamedi M., Wagner R.F., Thomsen S., Jacques S.L. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2324**, 32 (1994).
- Sterenberg H.J.C.M., Motamedi M., Wagner R.F., Duvic M., Thomsen S., Jacques S.L. *Laser. Med. Sci.*, **9**, 191 (1994).
- Andersson-Engels S., Canti G., Cubeddu R., Eker C., af Klinteberg C., Pifferi A., Svanberg K., Svanberg S., Taroni P., Valentini G., Wang I. *Laser. Med. Sci.*, **26**, 76 (2000).
- Borisova E.G., Troyanova P.P., Stoyanova V.P., Avramov L.A. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5830**, 399 (2005).
- Borisova E., Dogandjiiska D., Bliznakova I., Avramov L., Pavlova E., Troyanova P. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **7368**, 24 (2009).
- Борисова Е., Троянова П., Павлова П., Аврамов Л. *Квантовая электроника*, **38**, 597 (2008).
- Wang S., Zhao J., Lui H., He Q., Zeng H. *Skin. Res. Technol.*, **19**, 20 (2013).
- Lauridsen R.K., Everland H., Nielsen L.F., Engelsen S.B., Nørgaard L. *Skin. Res. Technol.*, **9**, 137 (2003).
- Al-Salhi M., Masilamani V., Vijmasi T., Al-Nachawati H., Vijaya-Raghavan A.P. *J. Fluoresc.*, **21**, 637 (2011).
- Bigio I.J., Mourant J.R., in *Encyclopedia of Optical Engineering* (New York: Marcel Dekker, 2003).
- Otsu N. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, **9**, 62 (1979).