

Мультивариативный анализ АФ и КР спектральных признаков новообразований кожи

Ю.А. Христофорова¹, И.А. Братченко¹, Д.Н. Артемьев¹, О.О. Мякинни¹, О.И. Каганов², А.А. Морятов², С.В. Козлов², В.П. Захаров¹

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

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

Аннотация. В работе проведено исследование новообразований кожи с помощью независимого применения АФ и КР методов, а также их комбинации. Анализ спектров новообразований кожи осуществлялся с использованием мультивариативного анализа данных PLS-DA. Для дифференциации спектров меланомы от других патологий кожи были рассчитаны значения PLS предсказателей на основании построенной PLS модели. Точность дифференциации меланомы от других новообразований на основании АФ особенностей составила 75,4%, с помощью КР признаков – 87,7%. Полученные результаты продемонстрировали, что совместный анализ АФ и КР методов позволяет повысить точность дифференциации исследуемых новообразований кожи до 91,1%.

1. Введение

Диагностика онкологических заболеваний кожи является одной из важнейших задач современной медицины. Оптические методы контроля позволяют неинвазивно получать информацию о биохимическом составе новообразования, что дает возможность установить тип исследуемой опухоли без забора биологического материала. Метод комбинационного рассеяния (КР) [1], основанный на изменении длины волны зондирующего излучения после взаимодействия с молекулами исследуемого объекта, позволяет с высокой точностью определять наличие химических соединений в исследуемом образце, а это значит, что при исследовании биоткани возможно обнаружение и идентификация различных образований кожи. За счет того, что сигнал КР регистрируется совместно с автофлуоресцентным (АФ) откликом [2] при возбуждении биоткани лазерным источником в ближней инфракрасной области, совместное применение данных подходов позволяет с высокой точностью исследовать особенности различных типов опухолей [3].

Однако данные методы также применяются независимо друг от друга для исследования биоткани. Например, метод АФ анализа в ближней инфракрасной области за счет того, что меланин является основным флуоресцирующим веществом в данной области, является эффективным инструментом для диагностики пигментных новообразований [4]. В других работах [5] АФ составляющую удаляют как неинформативную часть зарегистрированного сигнала, анализируя для диагностики различных типов онкологических заболеваний только полосы КР.

В данной работе для дифференциации меланомы от других новообразований кожи предложено провести независимый анализ с помощью методов АФ и КР, а также установить, позволит ли совместное применение данных методов повысить точность дифференциации исследуемых патологий кожи.

2. Материалы и методы

2.1. Экспериментальная установка и исследуемые новообразования

In vivo исследование новообразований кожи проводилось с использованием экспериментального оборудования, которое включает в себя термостабилизированный полупроводниковый лазерный модуль LML-785.0RB-04 (центральная длина волны $785 \pm 0,1$ нм, 150 мВт), портативный спектрометр QE6500, включающий матричный ПЗС-детектор с термоэлектрическим охлаждением до -15°C , оптический пробник inPhotonics. Подробное описание установки представлено в работе [6].

Лазерное излучение с помощью подводящей оптоволоконной системы (100 мкм, 0.22 NA) передается на оптический пробник. Оптический КР пробник представляет собой компактное устройство с особой системой фильтрации, которая позволяет выделить рассеянный сигнал, включающий КР и АФ отклики исследуемой биоткани, из общего потока излучения. С помощью собирающей оптоволоконной системы (200 мкм, 0.22 NA) сигнал передается на спектрометр.

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

В данной работе были исследованы 37 злокачественных новообразований (19 меланом, 18 базальноклеточного рака) и 19 доброкачественных образований. Проводимые экспериментальные исследования были одобрены этическим комитетом Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ).

2.2. Методы анализа спектральных данных

Зарегистрированные спектры новообразований представляют собой сочетание КР и АФ сигналов и шумовые эффекты. Анализ спектральных данных проводился в диапазоне 800-914 нм. Предварительная обработка зарегистрированных спектров включает в себя нормировку данных с использованием стандартной нормировки данных SNV и метода центрирования. Для избавления от случайных шумов применялся метод сглаживания данных Савицкого-Голея.

В данной работе для классификации различных типов новообразований применялся статистический метод проекций на латентные структуры с линейным дискриминантным анализом PLS-DA. PLS-DA анализ позволяет создать проекционную модель, которая определяет принадлежность спектров к той или иной группе новообразований на основании выделенных спектральных различий. Наиболее информативные спектральные области, на основании которых осуществляется классификация спектров различных типов новообразований, выделяются с помощью анализа важности независимых переменных в проекции (VIP) [7]. Для определения итоговой точности классификации анализируемых групп были рассчитаны значения PLS предсказателей, представляющих собой численные значения диагнозов в построенной PLS модели. Подробное описание данного метода представлено в [8].

Дифференциация спектров меланомы и других образований кожи была выполнена на основании анализа спектральных данных в областях 800-866 нм, 866-914 нм, 800-914 нм. Диапазон 800-866 нм соответствует АФ особенностям, в области 866-915 нм наблюдаются полосы КР. В КР спектроскопии исторически сложилось, при построении спектров по оси абсцисс откладывать волновые числа в обратных сантиметрах (cm^{-1}) и обозначать эту величину сдвиг КР. Таким образом, область 866-914 нм соответствует $1200-1800 \text{ cm}^{-1}$, 800-914 нм – $284-1800 \text{ cm}^{-1}$.

Результаты дифференциации меланомы и остальных новообразований кожи были представлены с помощью диаграммы размаха, по оси ординат которой откладывалось значение

PLS предсказателя, и кривой ошибок (receiving operating curve, ROC). ROC анализ представляет собой диагностическую эффективность классификационной модели, который отображает соотношение между верно классифицированными и ошибочно классифицированными объектами. Для количественного анализа ROC кривых используется значение площади под кривой (area under ROC curve, ROC AUC).

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

3. Результаты

3.1. АФ анализ

Исследование АФ спектров различных новообразований кожи с помощью PLS осуществлялся в спектральном диапазоне 800-866 нм. Анализ VIP АФ составляющей (рисунок 1) показал, что наибольшие различия между спектрами меланомы и других новообразований кожи наблюдаются в полосах 803, 815-820, 840-850, 858 нм. Максимальный вклад в дифференциацию данных классов вносят спектральные различия в полосе 803 нм, что связано с различной концентрацией меланина в меланоме и других исследуемых патологиях.

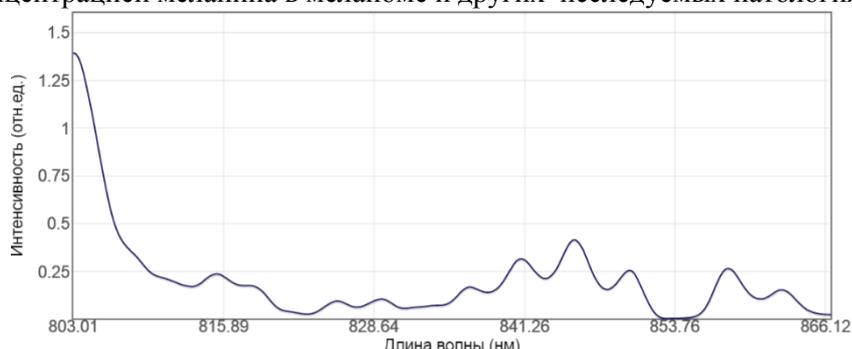


Рисунок 1. VIP анализ спектров в диапазоне 800-866 нм.

На рисунке 4а представлена диаграмма разброса значений PLS предсказателей на основании выделенных АФ особенностей. При пороговом критерии 0,3-0,33 точность дифференциации меланомы против других образований составила 75,4% (75%-75,7%). ROC AUC для данной модели дифференциации составила 0,862 (рисунок 5).

3.2. КР анализ

Для исследования особенностей КР был проведен PLS анализ спектров новообразований в диапазоне 1200-1800 см^{-1} . Поскольку в диапазоне 1200-1800 см^{-1} наблюдается линейный спад АФ интенсивности для спектров всех новообразований, мы считаем, что АФ интенсивность в этой области не представляет диагностически важным признаком для дифференциации спектров. Согласно VIP анализу (рисунок 2), наибольшие различия интенсивностей КР наблюдаются в полосах 1246, 1284, 1350, 1396, 1440, 1530, 1600, 1647 см^{-1} . Стоит отметить, что данные полосы соответствуют характерным для биоткани КР пиками 1240-1290 (продольная мода $\text{C} = \text{N}$) (двойной пик), 1330-1360 (крутильные колебания, веерная мода изгибных колебаний CH_2), 1450 (CH_2 связь в протеинах и липидах), 1530-1550 (компоненты крови), 1650 (продольная мода $\text{C} = \text{O}$ Амида I) см^{-1} . При этом максимальный вклад в дифференциацию спектров злокачественных и доброкачественных образований вносят различия интенсивности в полосах 1529, 1647 см^{-1} .

Согласно диаграмме разброса значений PLS предсказателей, построенной на основании анализа интенсивностей КР (рисунок 4б), оптимальные значения порогового критерия составляют 0,41-0,46. При этом точность дифференциации спектров меланомы и других новообразований кожи составляет 87,7% (75%-95%). ROC AUC при классификации спектров в данном спектральном диапазоне составляет 0,928 (рисунок 5).

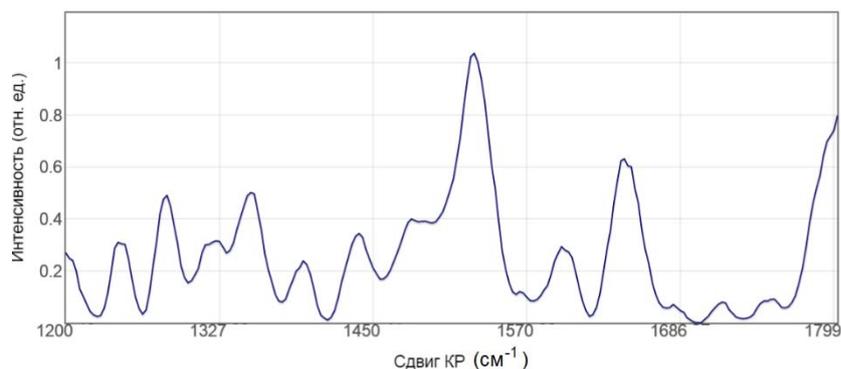


Рисунок 2. VIP анализ спектров 1200-1800 cm^{-1} .

3.3. Совместный КР и АФ анализ

Исследование спектров в диапазоне 283-1800 cm^{-1} подразумевает анализ на основании комбинации методов АФ и КР. Согласно VIP анализу (рисунок 3), дифференциация спектров, включающих АФ и КР сигналы, осуществлялась на основании спектральных различий в полосах 288, 401-526, 946, 1084, 1185, 1280, 1440, 1529, 1644 cm^{-1} . Стоит отметить, что спектральные различия интенсивности в данных полосах наблюдаются также при анализе разделенных спектров. При этом при анализе всего спектрального диапазона 283-1800 cm^{-1} вклад в дифференциацию спектров вносят изменения интенсивности в тех полосах, в которых при разделенном анализе наблюдаются максимальные различия. Данный результат подтверждает, что АФ и КР особенности дополняют друг друга, позволяя повысить точность дифференциации спектров меланомы и других новообразований до 91,1% (83,3%-94,7%). ROC AUC при данной классификации составляет 0,937.

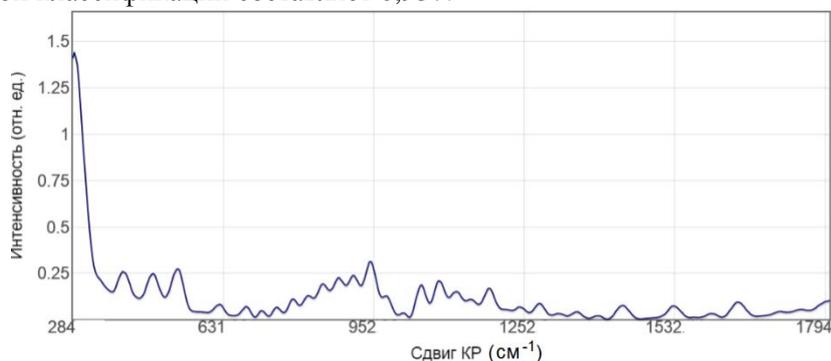


Рисунок 3. VIP анализ спектров 283-1800 cm^{-1} .

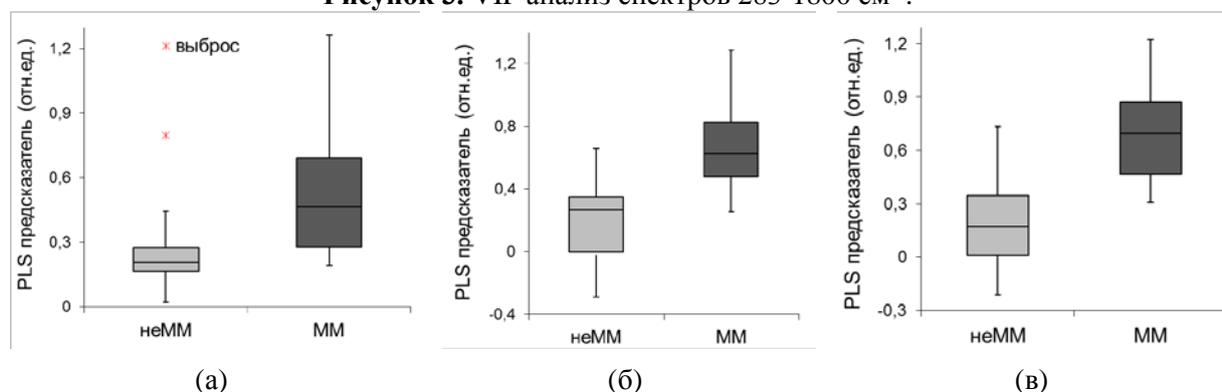


Рисунок 4. Диаграмма разброса значений PLS предсказателей: (а) – анализ АФ спектров, (б) – анализ КР спектров, (в) – совместный анализ АФ и КР особенностей.

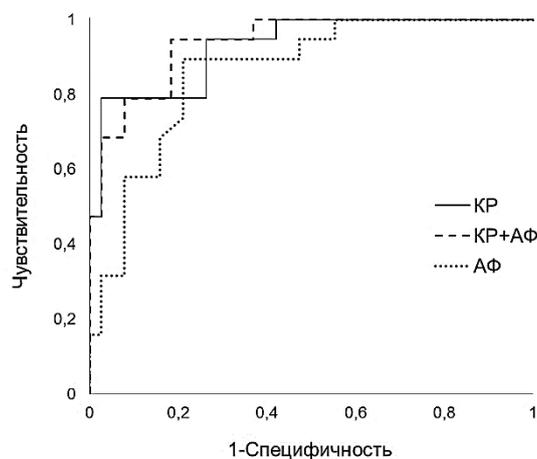


Рисунок 5. ROC анализ.

4. Обсуждения и выводы

Анализ, проведенный для спектрального диапазона $283\text{-}1800\text{ см}^{-1}$ продемонстрировал, что совместное применение методов АФ и КР позволяет повысить точность дифференциации меланомы против остальных патологий кожи более чем на 4% по сравнению с результатами, когда признаки КР и АФ анализируются отдельно. В работе [9] Zheng с соавторами при дифференциации спектров рака желудка и здоровой ткани с помощью PCA-LD наблюдают увеличение точности с 89,3% при анализе только особенностей КР до 91,5% при совместном анализе КР и АФ в ближней инфракрасной области. Результаты, полученные в данной работе, а также в работе [9] демонстрируют, что исследование новообразований кожи при возбуждении лазерным источником в ближней инфракрасной области 785 нм дает уникальную возможность одновременно использовать особенности биомолекулярной структуры биоткани с помощью КР, а также морфологической структуры и эндогенных флуорофоров за счет АФ анализа, что позволяет улучшить дифференциальную диагностику онкологических заболеваний.

5. Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ.

6. Литература

- [1] Lui, H. Real-time Raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis / H. Lui, J. Zhao, D. McLean, H. Zeng // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72(10). – P. 2491-2500.
- [2] Borisova, E.G. Endogenous and Exogenous Fluorescence Skin Cancer Diagnostics for Clinical Applications / E.G. Borisova, L.P. Angelova, E.P. Pavlova // *IEEE J of Selected Topics in Quantum Electronics.* – 2014. – Vol. 20(2). – P. 7100412.
- [3] Cicchi, R. Combined fluorescence-Raman spectroscopic setup for the diagnosis of melanocytic lesions / R. Cicchi, A. Cosci, S. Rossari, D. Kapsokalyvas, E. Baria, V. Maio, D. Massi, V. De Giorgi, N. Pimpinelli, F. S. Pavone // *Journal of Biophotonics.* – 2013. – Vol. 7(1-2). – P. 86-95.
- [4] Wang, S. *In vivo* Near-infrared Autofluorescence Imaging of Pigmented Skin Lesions: Methods, Technical Improvements and Preliminary Clinical Results / S. Wang, J. Zhao, H. Lui, Q. He, H. Zeng // *Skin Research and Technology.* – 2013. – Vol. 19. – P. 20-26.
- [5] Zhao, J. Automated autofluorescence background subtraction algorithm for biomedical Raman spectroscopy / J. Zhao, J. H. Lui, D.I. McLean, H. Zeng // *Society for applied spectroscopy.* – 2007. – Vol. 61(11). – P. 1225-1232.
- [6] Bratchenko, I. Combined Raman and autofluorescence ex vivo diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions / I. Bratchenko, D. Artemyev, O. Myakinin, Yu. Khristoforova, A. Moryatov, S. Kozlov, V. Zakharov // *JBO.* – 2017. – Vol. 22. – P. 027005.

- [7] Farrés, M. Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation / M. Farrés, S. Platikanov, S. Tsakovski, R. Tauler // *Journal of Chemometrics*. – 2015. – Vol. 29. – P. 528-536.
- [8] Frank, E. *Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic Regression, and Survival Analysis* / E. Frank. – New York: Springer, 2001. – 582 p.
- [9] Bergholt, M.S. Combining near-infrared-excited autofluorescence and Raman spectroscopy improves in vivo diagnosis of gastric cancer / M. S. Bergholt, W. Zheng, K. Lin, K. Y. Ho, M. Teh, K. G. Yeoh, J. B. Y. So, Z. Huang // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – Vol. 26(10). – P. 4104-4110.

Multivariate analysis of skin neoplasms AF and Raman spectroscopy features

Y.A. Khristoforova¹, I.A. Bratchenko¹, D.N. Artemyev¹, O.O. Myakinin¹, O.I. Kaganov², A.A. Moryatov², S.V. Kozlov², V.P. Zakharov¹

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

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

Abstract. In this paper study of the skin neoplasms using autofluorescence analysis and Raman spectroscopy alone and their combination was performed. The neoplasm spectra analysis using by multivariate analysis PLS-DA was carried out. The PLS predictors for the differentiation of the melanoma from other skin pathologies spectra based on the PLS model were calculated. The differentiation accuracy of the melanoma from other neoplasms based on the Raman spectroscopy was 75.4%, based on the autofluorescence analysis – 87.7%. Results of this work demonstrated that combination of the autofluorescence and Raman spectroscopy allows to advance of the total neoplasms differentiation accuracy to 91.1%.

Keywords: Raman spectroscopy, autofluorescence, PLS, melanoma.