

Елагин Вадим Вячеславович

**ОПТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ МЕЛАНОЦИТАРНЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЙ**

1.5.2 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена на базе научной лаборатории оптической спектроскопии и микроскопии научно-исследовательского института экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Загайнова Елена Вадимовна**
доктор медицинских наук, член-корреспондент Российской академии наук
ректор ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты: **Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна**
доктор биологических наук, доцент
заведующий кафедрой Физиологии человека и животных ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Горин Дмитрий Александрович
доктор химических наук, профессор
Профессор Центра фотоники и квантовых материалов автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского и на сайте <https://diss.unn.ru/files/2022/1238/diss-Elagin-1238.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В течение последних трех десятилетий наблюдалось активное развитие оптических методов визуализации, что позволило им перейти от стадии экспериментальных установок к стадии внедрения в клиническую практику. Методы флуоресцентной микроскопии получили широкое распространение в *in vitro* исследованиях монослойных культур эукариотических клеток. Использование лазерных источников ближнего инфракрасного диапазона (700-1000 нм) с длительностью импульсов до нескольких сотен фемтосекунд позволило значительно увеличить глубину исследования (*Sordillo et al, 2014; Zhang et al, 2016*) при проведении исследований тканей, а также реализовать новый подход, основанный на регистрации времени жизни флуоресценции. На основе регистрации двухфотонной флуоресценции таких эндогенных флуорофоров, как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), флавинадениндинуклеотид (ФАД), меланин, реализуется прижизненная визуализация морфологических особенностей клеточного компонента тканей (*König et al, 2020*). Проведение флуоресцентного микроскопического исследования с временным разрешением (FLIM) позволяет разделять эндогенные флуорофоры по времени жизни их флуоресценции (*Gadella et al, 1993*) и, как следствие, оценивать метаболический статус клеток (*Skala et al, 2007*).

Оптическая когерентная томография (ОКТ), получающая информацию о структуре ткани на основе регистрации рассеянного обратного зондирующего излучения, используется в клинической практике только в офтальмологии (*Zysk et al, 2007*). На сегодняшний день, благодаря развитию технической базы, появилась возможность в режиме реального времени получать информацию о трехмерной структуре сосудистого русла и упругих свойствах ткани с использованием оптической когерентной ангиографии (ОКА) и оптической когерентной эластографии (ОКЭ). Приборы ОКТ сочетающие в себе эти режимы открывают новые возможности для проведения прижизненных исследований и диагностики заболеваний кожных покровов и слизистых оболочек.

Одним из наиболее перспективных направлений использования современных неинвазивных оптических методов является изучение злокачественных новообразований. Поиск прижизненных критериев малигнизации особенно актуален в случае меланоцитарных новообразований. Чувствительность и специфичность традиционно используемого метода дерматоскопии составляет 89% и 79%, соответственно (*Kittler et al, 2002*). Стоит отметить, что до 80% меланоцитарных новообразований могут вызывать трудности при клинической и дерматоскопической диагностике, поскольку не имеют четких признаков злокачественности (*Braun et al, 2012*). Согласно литературным данным, специфичность дерматоскопического исследования сомнительных новообразований составляет не более 49% (*Alarcon et al, 2014*). Диспластические невусы,

относящиеся к доброкачественным новообразованиям, имеют как клинические, так и морфологические признаки атипии и являются главными «симуляторами» меланомы (*Elder, 2006; Bsirini, Smoller, 2018*). Таким образом, доля ложноположительных ошибок в диагностике меланомы может составлять от 5,5% (*Ng et al, 2010*) до 23% (*Carli et al, 2003*), а в ряде случаев до 41% (*Osborne et al, 2003*). В связи с этим «золотым стандартом» исследования меланоцитарных новообразований до сих пор остается гистологический анализ. Однако в ряде случаев по тем или иным причинам забор биопсии не проводится или проводится слишком поздно.

Использование комплексного подхода к исследованию меланоцитарных новообразований на основе неинвазивных оптических методов позволит выявить прижизненные критерии злокачественности, а также проводить динамическое исследование сомнительных новообразований, и в конечном итоге может стать альтернативой традиционной эксцизионной биопсии и снизить количество диагностических ошибок.

Цель работы и задачи исследования

Целью исследования являлось выявление признаков злокачественных меланоцитарных новообразований с использованием многофотонной флуоресцентной томографии, оптической когерентной ангиографии и время-разрешенной флуоресцентной микроскопии. Выявленные флуоресцентные, ангиографические и FLIM признаки в совокупности формируют «оптические признаки» злокачественности новообразований.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить признаки злокачественных меланоцитарных новообразований методом прижизненной МФТ. Разработать многофотонный микроскопический индекс (ММИ) для количественной оценки выделенных флуоресцентных признаков.
2. Изучить особенности организации сосудистых сетей меланоцитарных новообразований методом ОКА. Выполнить количественный анализ и выявить ангиографические признаки злокачественности.
3. Оценить способность комбинированного использования флуоресцентных и ангиографических признаков идентифицировать злокачественные меланоцитарные новообразования.
4. Изучить особенности меланоцитарных новообразований методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии. Выявить FLIM признаки, характерные для злокачественных меланоцитарных новообразований.

Научная новизна

Впервые разработан многофотонный микроскопический индекс, позволяющий проводить количественную оценку флуоресцентных признаков злокачественности, идентифицированных при

исследовании меланоцитарных новообразований методом МФТ. Значения ММИ позволяют достоверно разделить новообразования на доброкачественные и злокачественные.

Впервые проведен количественный анализ сосудистых сетей меланоцитарных новообразований, визуализируемых методом ОКА, и вычислены плотности сосудистых сетей и длины сосудов различного калибра. Показано, что плотность сосудистой сети является важным ангиографическим признаком: её значение для инвазивных меланом достоверно выше, чем для неинвазивных или доброкачественных новообразований.

Впервые показано, что комбинированное использование флуоресцентных и ангиографических признаков, выявляемых с использованием МФТ и ОКА, позволяет разделить дерматоскопически сомнительные новообразования не только на доброкачественные и злокачественные, но и определить наличие или отсутствие инвазии.

Впервые установлено, что меланоцитарные новообразования характеризуются гетерогенностью клеток по времени жизни флуоресценции. В новообразованиях присутствуют две популяции клеток: с короткими временами жизни флуоресценции и с временами, характерными для НАДН. В случае меланомы для клеток второй популяции специфичны более низкие значения среднего времени жизни флуоресценции и вклада длинной компоненты.

Научно-практическая значимость

Результаты диссертационного исследования имеют фундаментальное значение для развития новых подходов к диагностике новообразований кожи и могут быть использованы в клинике для решения задач диагностики опухолей.

Полученные в диссертационном исследовании данные могут быть использованы для поиска новых диагностических критериев, а также для понимания механизмов формирования опухолевого узла.

Основные результаты исследования могут быть включены в соответствующие разделы спецкурсов и лекций по биофизике, биомедицине и патофизиологии человека.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный ММИ на основе флуоресцентных признаков злокачественности, выявленных на изображениях МФТ, позволяет отделить меланомы от доброкачественных меланоцитарных новообразований.
2. Плотность сосудистой сети инвазивной меланомы кожи выше, чем у меланомы *in situ*.
3. Дерматоскопически сомнительные меланоцитарные новообразования могут быть разделены на доброкачественные, меланомы *in situ* и инвазивные меланомы при комбинированном использовании флуоресцентных и ангиографических признаков.
4. Для клеток меланоцитарных новообразований характерна гетерогенность времени жизни флуоресценции.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 22 работы, из них 7 статей в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК.

Апробация работы

Основные результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на «2ой Международной школе ADFLIM» (Санкт-Петербург, 2017 г.), Международной конференции «SPIE Photonics West BIOS» (Сан-Франциско, 2018 г.), Международном конгрессе «OSA Biophotonics Congress: Biomedical Optics» (Голливуд, 2018 г.), Международной конференции «Laser Applications in Life Sciences (LALS)» (Израиль, Бар-Илан, 2018 г.), Международной конференции «SPIE Photonics West, BIOS» (Сан-Франциско, 2019 г.), VI Съезде биохимиков России (Дагомыс, 2019 г.), Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics» (Нижний Новгород-Углич-Нижний Новгород, 2019 г.), X Съезде онкологов России (Нижний Новгород, 2019 г.), IV Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы дерматологии и онкодерматологии» (Нижний Новгород, 2019 г.), Международной конференции «SPIE Photonics West, BIOS» (Сан-Франциско, 2020 г.), XXIV Ежегодной международной конференции «Saratov fall meeting 2020» (Саратов, 2020 г.), Вебинар Melanoma Colloquium "Клиническая и инструментальная неинвазивная диагностика меланоцитарных опухолей" (онлайн, 2022 г.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста и содержит 30 рисунков, 9 таблиц и 11 уравнений. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы содержит 195 источников, в том числе 189 англоязычных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: многофотонная флуоресцентная микроскопия, флуоресцентная микроскопия с временным разрешением, оптическая когерентная ангиография, особенности прогрессирования меланомы кожи и основные подходы к ее диагностике.

В **главе 2** перечислены использованные в работе объекты исследования, оборудование и описаны методики исследования.

Меланоцитарные новообразования пациентов, проходящих лечение в Университетской клинике ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России. Критериями исключения пациентов были наличие эрозивных или язвенных дефектов на поверхности новообразований, узловая форма меланомы, а также возраст младше 18 лет. Для всех новообразований было проведено стандартное дермоскопическое исследование с расчетом общего

дерматоскопического индекса (ОДИ) (*Nachbar et al, 1994*). Согласно значениям ОДИ все исследованные новообразования были разделены на 3 группы:

- доброкачественные меланоцитарные новообразования ($n=10$) с $\text{ОДИ} \leq 4,75$;
- инвазивные меланомы ($n=31$) с $\text{ОДИ} > 5,45$;
- сомнительные меланоцитарные новообразования ($n=18$) с $4,75 < \text{ОДИ} < 5,45$.

Все новообразования были исследованы с помощью многофотонной флуоресцентной томографии, флуоресцентной микроскопии с временным разрешением и оптической когерентной ангиографии. Постановка окончательного диагноза была основана на согласии двух патоморфологов и дерматолога.

Патоморфологическое исследование выявило 4 внутридермальных, 4 смешанных и 2 эпидермальных невуса в группе «доброкачественных новообразований», 11 поверхностно распространяющихся, 10 лентиги меланом и 10 узловых меланом в группе «меланомы». Узловые меланомы были исключены из исследования в связи с их морфологическими особенностями и характером прогрессирования. В группе «сомнительных новообразований» было выявлено 6 доброкачественных новообразований (2 простых лентиги и 4 диспластических невуса), 6 меланом *in situ* и 6 инвазивных меланом (4 лентиги меланомы и 2 поверхностно распространяющиеся меланомы).

Многофотонная томография. Прижизненное микроскопическое исследование выполнено с использованием многофотонного флуоресцентного томографа MPTflex™. Прибор оснащен титан-сапфировым фемтосекундным лазером (Mai Tai; Spectra Physics, США), перестраиваемой длиной волны, подвижным оптическим путем и сканирующим модулем. Регистрация обратного сигнала осуществляется параллельно двумя детекторами в диапазонах 373 – 387 нм (сигнал второй гармоники) и 409 – 660 нм (сигнал флуоресценции). Исследование проводили с использованием длины волны возбуждения 750 нм, позволяющей визуализировать эндогенную флуоресценцию клеток и сигнал второй гармоники от коллагеновых волокон. Для каждого новообразования получали не менее 5 серий изображений (*z-stack*), ориентированных параллельно поверхности на глубину до 150 мкм с шагом между фокальными плоскостями 10 мкм. Полученные МФТ-изображения подвергались визуальной оценке с целью выявления флуоресцентных признаков злокачественности. Кроме того, был разработан ММИ для количественного анализа флуоресцентных признаков злокачественности.

Многофотонный микроскопический индекс. Индекс основан на суммировании выявленных признаков злокачественности, умноженных на их весовые коэффициенты (уравнение 1). В качестве флуоресцентных признаков злокачественности выбраны полиморфные клетки (ПК), дендритные структуры (ДС), педжетоидные клетки (ПдК), поскольку они чаще встречались в меланомах, чем в доброкачественных невусах. Новообразованию присваивалось значение равное 1 для любого

признака, если он присутствовал хотя бы на одном изображении. В случае отсутствия какого-либо признака, новообразованию присваивалось значение этого признака равное 0.

$$\text{ММИ} = \text{ПК} \times \varphi_{\text{ПК}} + \text{ДС} \times \varphi_{\text{ДС}} + \text{ПдК} \times \varphi_{\text{ПдК}}, \quad (1)$$

где $\varphi_{\text{ПК}}$, $\varphi_{\text{ДС}}$, $\varphi_{\text{ПдК}}$ – коэффициенты ассоциации соответствующего признака с меланомой. Значения коэффициентов φ вычислялись с использованием таблиц 2×2 (таблица 1) и уравнений (2, 3 и 4).

Таблица 1. Пример заполнения таблицы сопряженности для флуоресцентных признаков злокачественности.

	Признак		n_{i*}
	Есть	Нет	
Меланома	n_{11}	n_{12}	n_{1*}
Невус	n_{21}	n_{22}	n_{2*}
n_{*j}	n_{*1}	n_{*2}	$n_{**} = n$

$$\varphi = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}} \quad (2)$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(n_{ij} - n_{ij}^*)^2}{n_{ij}^*} \quad (3)$$

$$n_{ij}^* = \frac{n_{i*} n_{*j}}{n}, \quad (4)$$

где – n_{ij} – наблюдаемые частоты; n_{ij}^* – теоретические частоты.

МФТ-изображения меланом и доброкачественных невусов были проанализированы на наличие выбранных признаков. Число новообразований, имеющих или не имеющих данные признаки, заносили в соответствующие поля таблицы 2. Далее согласно формуле 4 был проведен расчет теоретических частот данных признаков в новообразованиях (указаны в скобках в таблице 2). По полученным данным вычислили статистику χ^2 для каждого признака: $\chi_{\text{ПК}}^2 = 23,373$; $\chi_{\text{ДС}}^2 = 12,15$; $\chi_{\text{ПдК}}^2 = 13,83$.

Таблица 2. Таблица распределения наблюдаемых и (теоретических) частот флуоресцентных признаков в меланомах и доброкачественных невусах.

	ПК		n_{i*}	ДС		n_{i*}	ПдК		n_{i*}
	Есть	Нет		Есть	Нет		Есть	Нет	
Меланома	19(12,87)	2(8,13)	21	14(9,48)	7(11,52)	21	15(10,16)	6(10,84)	21
Невус	0(6,13)	10(3,87)	10	0(4,52)	10(5,48)	10	0(4,84)	10(5,16)	10
n_{*j}	19	12	31	14	17	31	15	16	31

Вычислены следующие значения коэффициентов ассоциации: $\varphi_{\text{ПК}} = 0,86$, $\varphi_{\text{ДС}} = 0,62$, $\varphi_{\text{ПдК}} = 0,66$.

Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением. Для проведения прижизненного исследования времени жизни флуоресценции НАДН использовали многофотонный

флуоресцентный томограф MPTflex™, оснащенный системой TCSPC SPC 150 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Возбуждение флуоресценции осуществляли на длине волны 750 нм, эмиссию регистрировали в диапазоне 409 – 660 нм через широкополосный фильтр, предустановленный в системе. С целью уменьшения шумового фона и связанных с ним артефактов измерений исследования проводились в затемненном помещении.

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения SPCLImage 7.4 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Кривая затухания флуоресценции для каждого пикселя изображения аппроксимировалась моделью биэкспоненциального затухания (уравнение 5) для получения значений короткой и длинной компонент времени жизни τ_1 , τ_2 , а также значений их относительных вкладов a_1 , a_2 :

$$f(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2}, \text{ где } a_1 + a_2 = 100\% \quad (5)$$

Кроме того, рассчитывались значения среднего времени жизни автофлуоресценции (уравнение 6):

$$\tau_m = a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2 \quad (6)$$

Расчет значений времени жизни флуоресценции проводили в цитоплазме клеток путем выделения областей интереса. Для получения 5000 фотонов для профиля затухания использовали пространственное объединение пикселей. Качество аппроксимации оценивали по значению χ^2 , которое должно составлять 0,8-1,4. В первом приближении для НАДН короткая (τ_1) компонента обусловлена не связанными с белками молекулами (свободная форма), а длинная (τ_2) компонента – молекулами НАДН связанными с белками. Типичные параметры времени жизни флуоресценции НАДН составляют: $a_1 \sim 75\%$, $\tau_1 \sim 400$ пс, $a_2 \sim 25\%$, $\tau_2 \sim 2200$ пс. В случае меланинсодержащих участков значения короткой компоненты времени жизни флуоресценции составляют около 100 пс, а ее вклада достигают 100%. При анализе состояния молекул НАДН такие участки не брались в расчет. Для наглядности строили изображения, окрашенные в псевдоцвета: красным – для диапазона значений a_1 от 0 до 90%, синим – для a_1 от 90 до 100%.

Оптическая когерентная ангиография. Исследование особенностей сосудистых сетей меланоцитарных новообразований выполнено с использованием скоростного спектрального многофункционального оптического когерентного томографа, разработанного в ИПФ РАН (г. Нижний Новгород). Получение данных основано на спектральном принципе приема сигнала со скоростью до 20 000 А-сканов (профиль интенсивности обратно рассеянного света по глубине ткани) в секунду. В качестве зондирующего излучения используется поляризованный свет с длиной волны 1310 нм, генерируемый суперлюминесцентным диодом. Мощность излучения на объекте составляет 5 мВт. Поперечное разрешение в биологической ткани составляет 25 мкм, разрешение по глубине – 15 мкм. Для получения данных проводится непрерывное сканирование по полю зрения размером 2,4х2,4 мм. Вдоль быстрой оси сканирования регистрируются 256 А-сканов, еще 256 А-

сканов рассчитываются программно, и формируют В-скан. Вдоль медленной оси сканирования регистрируются 1024 В-скана. В совокупности все сканы дают трехмерное изображение. В используемой методике получения ангиографических данных не происходит сканирования одного и того же участка дважды. Контрастирование сосудов осуществляется с использованием высокочастотного фильтра с конечной импульсной характеристикой в области сигнала вместо высокочастотного фильтра прямоугольной формы в частотной области, что позволяет получить один ангиографический В-скан из каждых $2N+1$ структурных В-сканов. Таким образом, каждый последующий ангиографический В-скан может быть заново вычислен во время получения следующего структурного В-скана. Получаемое ангиографическое изображение представляет собой *en face* проекцию максимальной интенсивности ОКТ-сигнала от движущихся объектов.

Количественный анализ ОКА-изображений. Для количественного анализа каждое двумерное изображение было бинаризовано и скелетизировано (Reif et al, 2012). Скелетизированный сосуд представляет собой совокупность пикселей, последовательно расположенных на линии скелета. Для поиска ближайшего соседнего пикселя на скелете сосуда использовался алгоритм *k-d деревьев* (Friedman et al, 1977). Одним из вычисляемых показателей была плотность сосудов, которая рассчитывается как отношение общего количества скелетизированных пикселей (т.е. относящихся к сосуду) в анализируемой области изображения к общему количеству пикселей в этой области. Также вычислялись суммарные длины тонких (диаметром меньше 15 мкм) и толстых (диаметром больше 50 мкм) сосудов. Толщина сосудов рассчитывалась как двукратное расстояние между границами сосуда на бинаризованном и скелетизированном изображениях. Сосуды, у которых эти границы перекрывались, имели толщину 1 пиксель. С учетом латерального разрешения сканера ОКТ, один пиксель соответствует диаметру сосудов менее 15 мкм.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Statistica версия 10 (StatSoft, Inc., USA). Полученные данные для каждой группы представляли как медиана и процентильный интервал (25%;75%). Достоверность отличий значений ММИ, плотности сосудистой сети, суммарной длины тонких и толстых сосудов между подгруппами доброкачественных новообразований, меланом *in situ* и инвазивных меланом в группе сомнительных новообразований рассчитывали с использованием критерия Краскела-Уоллеса. Далее было проведено попарное сравнение всех подгрупп по критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Также для каждого флуоресцентного признака рассчитывались отношения шансов (OR), 95% доверительный интервал (CI) и р-значения. Согласие между оценками, сделанными двумя наблюдателями по наличию злокачественных признаков (межэкспертная надежность), оценивалось с использованием статистики Каппа Коэна с 95% доверительным интервалом. Для определения наиболее значимых критериев (ММИ, плотность сосудистой сети, суммарная длина тонких и толстых сосудов),

позволяющих достоверно разделить на подгруппы дерматоскопически сомнительные меланоцитарные новообразования, был проведен дискриминантный анализ. В ходе которого происходило решение линейного уравнения (7):

$$d = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n, \quad (7)$$

где a – константа, b_1, b_2, b_n – коэффициенты регрессии, x_1, x_2, x_n – значения переменных.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

1. Выявление флуоресцентных признаков злокачественных меланоцитарных новообразований

Данные гистологических исследований свидетельствуют о том, что возникновение и прогрессирование меланоцитарных новообразований кожи связано с нарушениями нормальной структуры эпидермиса и дермы. В эпидермисе появляются атипичные по форме клетки, расположенные поодиночке или формирующие группы. Также данные клетки могут располагаться в дерме. Для некоторых новообразований характерно формирование гнезд клеток, окруженных коллагеном. Характерной чертой меланоцитарных новообразований является увеличение количества меланоцитов и клеток, содержащих меланин в следствии усиления его синтеза. Наличие в клетках эндогенных флуорофоров таких, как НАДН, кератогиалин и меланин, позволяет неинвазивно визуализировать их морфологию с использованием многофотонной томографии. Благодаря способности коллагенов I и II типов формировать сигнал ГВГ, изучение структуры дермы может также проводиться неинвазивно с помощью МФТ.

Флуоресцентные признаки злокачественных новообразований на МФТ-изображениях

На основании проведенного визуального анализа МФТ-изображений были выбраны 6 признаков злокачественных новообразований (рис. 1), характерных для эпидермиса (полиморфные клетки, дендритные структуры, педжетоидные клетки) и дермо-эпидермального перехода (гнезда, неоконтуренные сосочки дермы и отсутствие сосочков дермы). МФТ-изображения 21 меланомы и 10 доброкачественных образований были проанализированы двумя независимыми исследователями на предмет наличия данных признаков. Для каждого признака были оценены частота их встречаемости, коэффициент ассоциации с меланомой, отношения шансов и доверительный интервал (таблица 3). Полиморфные клетки – это крупные клетки причудливой формы с высоким уровнем флуоресценции, которые могут располагаться во всех слоях эпидермиса, а ранее были обнаружены при гистологических исследованиях (*Banerjee, Harris, 2000; Blessing et al, 2000*). Дендритные структуры представлены клетками овальной или звездчатой формы с длинными отростками и высоким уровнем флуоресценции. Данные отростки могут распространяться во все слои эпидермиса, что также подтверждено с помощью конфокальной микроскопии (*Paul, Illig, 1976; Waddell et al, 2018*).

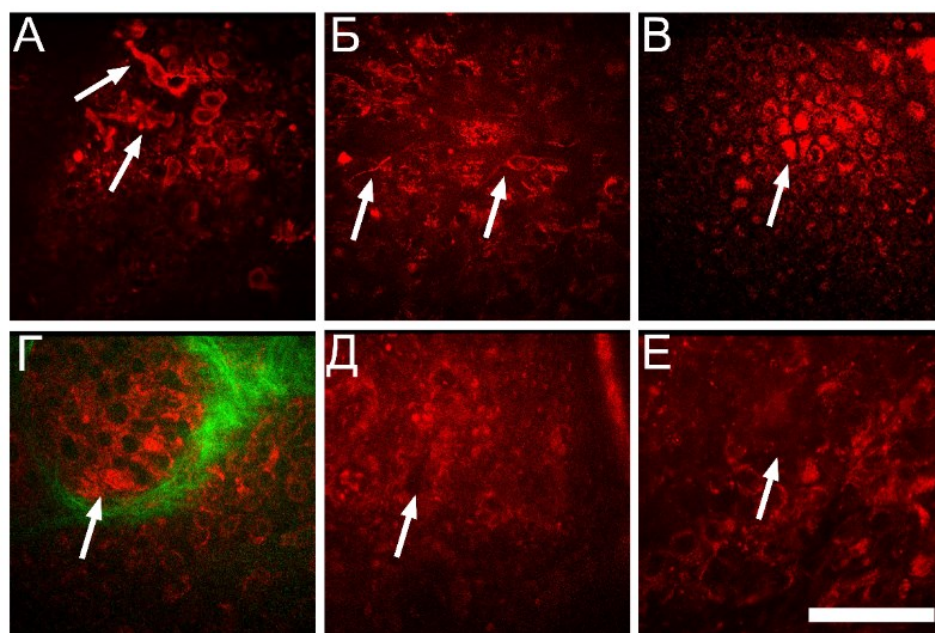


Рис. 1. Флуоресцентные признаки злокачественных новообразований на МФТ-изображениях: полиморфные клетки (А), дендритные структуры (Б), педжетоидные клетки (В), гнезда (Г), неоконтуренные сосочки дермы (Д) и отсутствие сосочков дермы (Е). Масштабная линейка 100 мкм. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

Педжетоидные клетки – это меланоциты округлой формы, расположенные в верхних слоях эпидермиса, включая роговой. Благодаря большому содержанию меланина, гомогенно распределенного по цитоплазме, клетки характеризуются высоким уровнем сигнала флуоресценции. Данные клетки имеют большое значение при диагностике меланомы (*Petricic-Rosic et al, 2004; Hurwitz, 2013*). Гнезда представлены скоплениями клеток, имеющих нетипичную морфологию, и отделенными капсулами из коллагена. Сосочки дермы, у которых отсутствует ободок из клеток с высоким уровнем сигнала флуоресценции, являются неоконтуренными. Отсутствие сосочков дермы обусловлено пролиферацией клеток в области дермо-эпидермального перехода, что приводит к замещению типичной папиллярной структуры. Как видно из таблицы 3, полиморфные клетки, дендритные структуры и педжетоидные клетки являются наиболее характерными флуоресцентными признаками меланом.

Таблица 3. Частота встречаемости признаков злокачественности при МФТ-исследовании доброкачественных невусов (n = 10) и инвазивных меланом (n = 21)

Признак	Доброкачественные N(%)	Меланомы N(%)	OR	95%CI	p	Интервал для Каппа Козна
Полиморфные клетки	0	19(90,4)	163,8	7,1772; 3738,2724	0,0014	0,007 – 1,000
Дендритные структуры	0	14(66,6)	40	2,0811; 792,0806	0,0145	0,541 – 1,000
Педжетоидные клетки	0	15(71,4)	50	2,5403; 987,1510	0,0101	0,195 – 0,981
Гнезда	5(50)	8(38,1)	0,615	0,1345; 2,8155	0,5315	0,558 – 1,000
Неоконтуренные сосочки дермы	7(70)	9(42,8)	0,3214	0,0646; 1,6002	0,1658	0,565 – 1,000
Отсутствие сосочков дермы	6(60)	13(61,9)	1,0833	0,2319; 5,0611	0,9189	0,281 – 0,947

2. Поиск флуоресцентных признаков злокачественности в дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразованиях

На МФТ-изображениях гистологически доброкачественных новообразований (простое лентиго, диспластический невус, внутридермальный невус с атипической пролиферацией меланоцитов) были обнаружены признаки, характерные для меланом (рис. 2). В шиповатом слое простого лентиго присутствовали яркие педжетоидные клетки. В некоторых участках дермо-эпидермального перехода присутствуют не окаймленные сосочки, а также вытянутые структуры, имеющими вид мозговых извилин. В эпидермисе диспластического невуса визуализируются яркие педжетоидные клетки. В области дермо-эпидермального перехода присутствуют гнезда клеток, окруженные коллагеном. На МФТ-изображениях базального слоя внутридермального невуса с атипической пролиферацией меланоцитов наблюдается разрастание атипичных ярких клеток. Дермо-эпидермальный переход представлен нерегулярными по форме и размерам неоконтуренными папиллярными выростами дермы.

МФТ-изображения меланом *in situ*, диагностированных гистологически, демонстрируют во всех слоях эпидермиса крупные педжетоидные клетки округлой формы с высоким уровнем флуоресценции, а также плеоморфные клетки. Некоторые клетки на изображениях имеют серповидную форму, обусловленную неравномерным распределением в цитоплазме меланина. Дермо-эпидермальный переход представлен плохо визуализируемыми папиллярными выростами дермы или неоконтуренными сосочками дермы.

Проведено исследование инвазивных форм лентиго меланомы и поверхностно-распространяющейся меланомы, которые были диагностированы гистологически. Данные новообразования имели те же флуоресцентные признаки, что и инвазивные меланомы, диагностированные с помощью дерматоскопии. Поскольку глубина инвазии была незначительной, то в дерме визуализировались меланофаги – крупные клетки неопределенной формы без видимого ядра с высоким уровнем флуоресценции. В эпидермисе присутствуют гнезда крупных клеток с четким ядром и гомогенной яркой цитоплазмой.

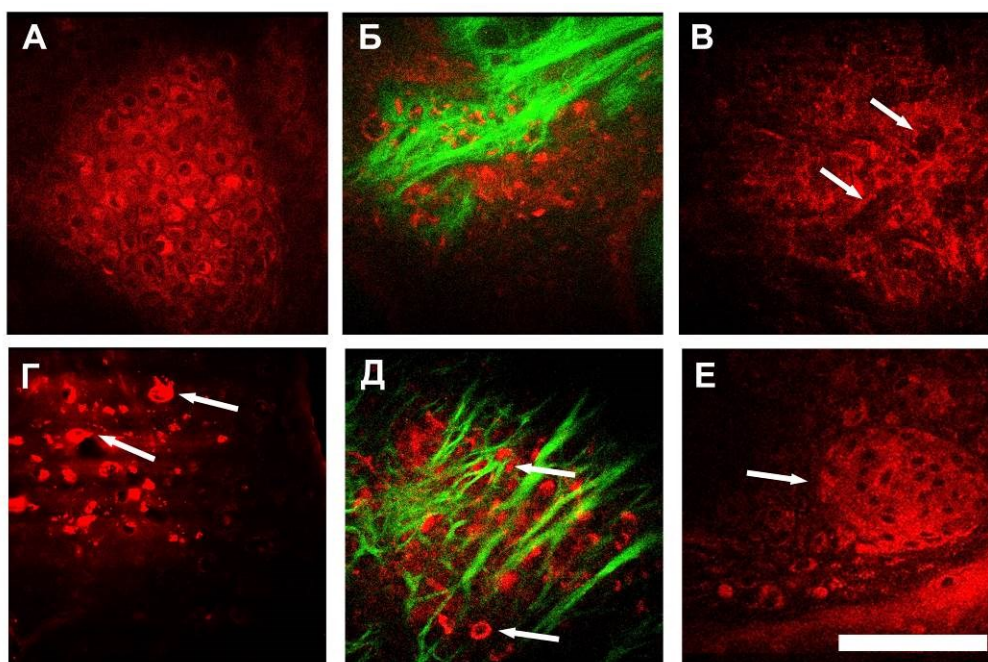


Рис. 2. Флуоресцентные признаки злокачественности на МФТ-изображениях дерматоскопически сомнительных новообразований. Педжетоидные клетки в шиповатом слое простого лентиго (А); гнезда клеток в папиллярной дерме диспластического невуса (Б); нерегулярные по форме и размерам неоконтуренные папиллярные выросты дермы внутридермального невуса с атипической пролиферацией меланоцитов (стрелки, В); педжетоидные клетки в роговом слое меланомы *in situ* (стрелки, Г); атипичные клетки в папиллярной дерме инвазивной лентиго меланомы (стрелки, Д); гнезда атипичных клеток в эпидермисе поверхностно-распространяющейся инвазивной меланомы (стрелка, Е). Масштабная линейка 100 мкм. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

Таким образом, было установлено, что в эпидермисе всех дерматоскопически сомнительных новообразований присутствуют флуоресцентные признаки меланом. Данная проблема также актуальна для гистологического исследования, поскольку все гистологические особенности меланомы могут быть обнаружены в доброкачественных новообразованиях (*Filosa, Filosa, 2018*). Кроме того, относительная значимость этих особенностей может меняться от одного случая к другому (*Thompson et al, 2004*). В связи с этим необходимо разработать алгоритм количественного анализа признаков злокачественности на МФТ-изображениях, позволяющий дифференцировать доброкачественные и злокачественные меланоцитарные новообразования.

3. Количественный анализ флуоресцентных признаков злокачественности

Для определения является ли новообразование злокачественным был разработан ММИ. Использование различных индексов дает более объективный результат и позволяет повысить точность диагностики. При расчете ММИ оценивается наличие в новообразовании 3-х флуоресцентных признаков: полиморфных клеток, дендритных структур и педжетоидных клеток. Данные признаки были выбраны на основе результатов оценки межэкспертного согласия и коэффициентов ассоциации. Дерматоскопически доброкачественные невусы и меланомы имеют полярные значения 0(0;0) и 2,14(1,52;2,14), соответственно. Согласно значениям ММИ,

дерматоскопически сомнительные новообразования были разделены на две группы ($p=0,0013$), которые соответствовали гистологически доброкачественным новообразованиям и меланомам (рис. 3).

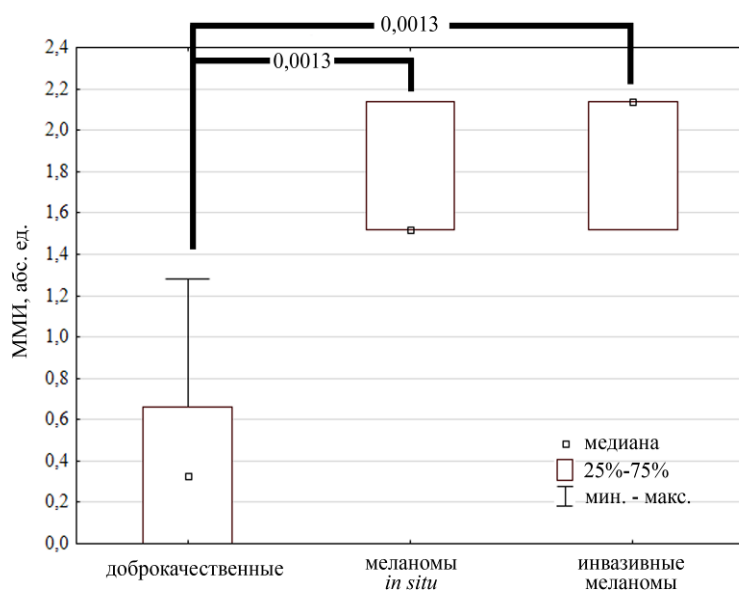


Рис. 3. Количественный анализ признаков злокачественных новообразований с использованием ММИ у дерматоскопически сомнительных новообразований. Данные представлены как медиана, межпроцентильный диапазон 25%-75% и минимум-максимум. Вероятность ошибки оценена с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения.

4. Выявление ангиографических признаков злокачественных меланоцитарных новообразований методом оптической когерентной ангиографии

Согласно имеющимся литературным данным, злокачественные новообразования запускают процессы неоангиогенеза, чтобы удовлетворить потребности в питательных веществах растущей клеточной массы. Поскольку формирующиеся сосуды являются неполноценными, то их структура отличается от сосудов неизменной кожи. Также вероятно, что формирование гнезд у доброкачественных невусов, особенно расположенных в дерме, должно стимулировать изменение архитектуры сосудистого русла. Подобного рода изменения сосудистого русла позволяет визуализировать ОКА.

При визуальном анализе сосудистых изображений доброкачественных невусов было установлено, что сосудистые сети состоят из прямолинейных сосудов, имеющих регулярный характер ветвления, а в случае внутридермальных невусов она меняется на структуру «точек» и «запятых». Также могут присутствовать сосуды змеевидной формы. Сосудистые сети меланом, диагностированных дерматоскопически, сформированы толстыми сосудами, имеющими извитую структуру (рис. 4). Плотность таких сетей высокая, а характер ветвления нерегулярный. Известно, что нерегулярные сосуды (*Argenziano et al, 2004*), а также сосуды в виде петель (*Kreusch, 2002*) и атипичные полиморфные сосуды (*Ayhan et al, 2015*), выявленные при дерматоскопическом исследовании, являются важным критерием, указывающим на наличие меланомы.

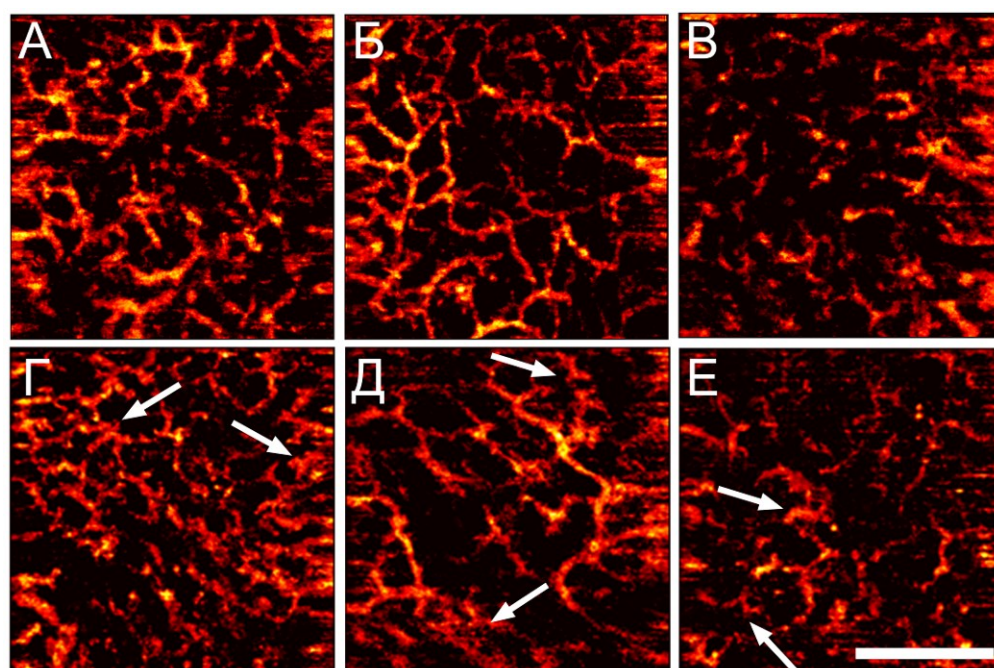


Рис. 4. ОКА-изображения микроциркуляторного русла меланоцитарных новообразований. Регулярные сосудистые сети пограничного (А) и смешанного невусов (Б), структура «точек» и «запятых» внутридермального невуса (В), плотная сосудистая сеть (Г), большое количество толстых сосудов (Д) и извитые сосуды (Е) инвазивных меланом. Масштабная линейка 1 мм.

Количественный анализ ОКА-изображений показал, что плотность сосудистой сети инвазивных меланом достоверно выше ($p=0,00009$), чем у доброкачественных новообразований (таблица 4). Также вычислено, что по сравнению с доброкачественными невусами суммарные длины тонких и толстых сосудов у меланом достоверно выше в 4,4 ($p=0,00075$) и 3,7 ($p=0,00173$) раза, соответственно.

Таблица 4. Результаты количественной обработки ОКА-изображений доброкачественных невусов и инвазивных меланом

Новообразования	Критерии		
	Плотность, абс. ед. медиана (25%; 75%)	Суммарная длина тонких сосудов, мкм медиана (25%; 75%)	Суммарная длина толстых сосудов, мкм медиана (25%; 75%)
Пограничный невус	0,02996 (0,02758; 0,03187)	952 (940; 956)	984 (914; 1070)
Смешанный невус	0,02006 (0,01972; 0,02118)	616 (614; 978)	624 (404; 788)
Внутридермальный невус	0,01379 (0,01314; 0,01420)	406 (373; 528)	580 (465; 609)
Инвазивная меланома	0,0512 (0,0435; 0,0528)	1792 (1772; 1968)	2152 (1784; 2848)
Уровень значимости p	0,00009	0,00075	0,00173

Визуальный анализ ОКА-изображений сомнительных новообразований показал, что новообразования с разным диагнозом имеют различную структуру сосудистой сети. Простое лентиго характеризуется регулярной сосудистой сетью, сформированной линейными сосудами. В

случае диспластического невуса сосудистая сеть представлена тонкими изогнутыми или сосулами в виде точек. Внутридермальный невус с атипической пролиферацией меланоцитов имеет плотную сосудистую сеть, образованную утолщенными извитыми сосулами. Неинвазивные меланомы характеризуются нерегулярной сосудистой сетью, состоящей из толстых и небольшого количества тонких извитых сосулов. ОКА-изображения инвазивных лентиго и поверхностно-распространяющихся меланом характеризуются нерегулярно разветвленной сосудистой сетью, состоящей из плотно расположенных толстых извитых сосулов.

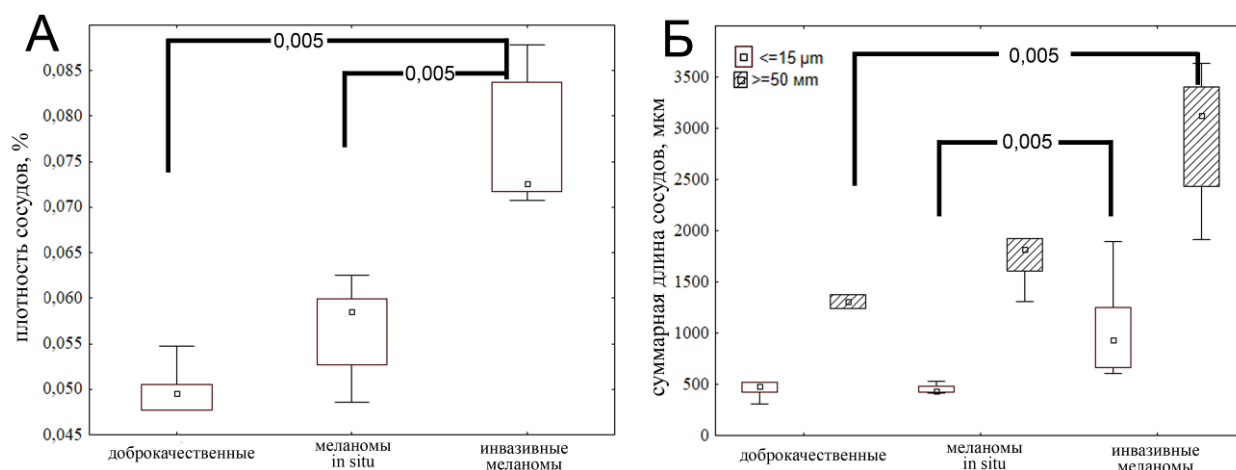


Рис. 5. Результаты количественной обработки ОКА-изображений дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований. Плотность сосулов (А) и суммарная длина тонких и толстых сосулов (Б) для доброкачественных новообразований, меланом *in situ* и инвазивных меланом. Данные представлены как медиана, межпроцентильный диапазон 25%-75% и минимум-максимум. Вероятность ошибки оценена с использованием критерия Краскела-Уоллиса.

Согласно результатам количественного анализа ОКА-изображений сомнительных новообразований (рис. 5.), входящие в них доброкачественные новообразования характеризовались наименьшими значениями плотности сосулов 0,0501 (0,0477;0,0505), и были сопоставимы с таковыми значениями для меланом *in situ* 0,0585 (0,05273;0,05989). Плотность сосулов инвазивных меланом была достоверно выше в 1,2 и 1,4 раза по сравнению с меланомой *in situ* ($p=0,005$) и доброкачественными новообразованиями ($p=0,005$), соответственно.

5. Комбинированное использование флуоресцентных и ангиографических признаков для определения злокачественных новообразований

Поскольку ММИ позволяет дифференцировать доброкачественные новообразования от меланом, а количественный анализ сосулов способен определить наличие инвазии, было предположено, что совместное использование этих критериев даст возможность дифференцировать сомнительные меланоцитарные новообразования на доброкачественные, меланомы *in situ* и инвазивные меланомы. Для этого был проведен дискриминантный анализ. По результатам анализа было установлено, что значение статистики Уилкса λ составляет 0,02524 при уровне

$p=0,00000$. Однако при анализе одиночного вклада (частная λ Уилкса) каждой из оцениваемых переменных было выявлено, что значения ММИ и плотности сосудистой сети обладают наибольшей мощностью.

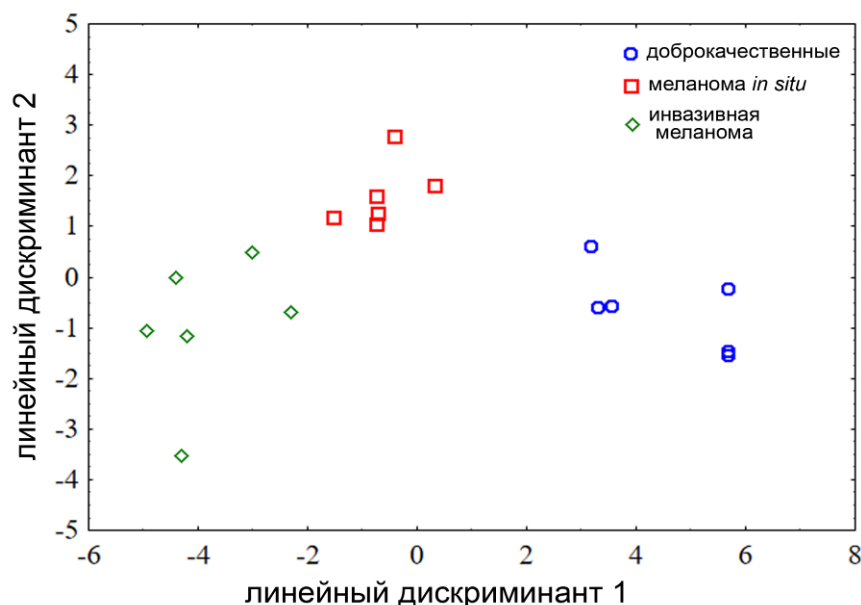


Рис. 6. Диаграмма распределения дерматоскопически сомнительных новообразований в соответствии с их индивидуальными значениями двух линейных дискриминант.

Для разделения трех подгрупп дерматоскопически сомнительных новообразований были определены два независимых линейных дискриминанта. Для каждой из функций были рассчитаны стандартизованные коэффициенты, которые показывают, что значения ММИ и плотности сосудистой сети вносят наибольший вклад в первую функцию, а значения суммарной длины тонких сосудов и ММИ – во вторую функцию. Диаграмма распределения индивидуальных значений сомнительных новообразований демонстрирует, что линейный дискриминант 1 отделяет доброкачественные новообразования от совокупности меланом *in situ* и инвазивных меланом (рис. 6). По оси линейного дискриминанта 2 имеется сдвиг точек меланом *in situ* относительно инвазивной меланомы и доброкачественных новообразований. Классификационная матрица демонстрирует, что все 18 сомнительных новообразований были правильно разделены между тремя подгруппами. Таким образом, комбинированное использование результатов количественной обработки данных многофотонной томографии и оптической когерентной ангиографии позволяет разделить дерматоскопически сомнительные меланоцитарные новообразования на подгруппы.

6. Исследование меланоцитарных новообразований методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии

Согласно литературным данным в опухолевых клетках энергетический метаболизм протекает преимущественно по гликолитическому пути. В отличие от окислительного фосфорилирования в гликолизе участвуют молекулы НАДН не связанные с белком. Ранее было установлено (*Skala et al, 2007*), что свободная форма НАДН характеризуется коротким (0,4 нс)

временем затухания флуоресценции, а связанная с белками форма – длинным (1-5 нс). С использованием время-разрешенной флуоресцентной микроскопии можно оценивать соотношение свободной и связанной формы НАДН в клетках и, таким образом, предполагать по какому пути идет энергетический метаболизм.

В ходе работы проводили анализ среднего времени жизни флуоресценции НАДН и относительный вклад длинной компоненты для клеток, расположенных в разных слоях эпидермиса новообразования. Обнаружено, что клетки меланоцитарных новообразований делятся на две группы в соответствии со значениями среднего времени жизни флуоресценции. В первой группе флуоресценция клеток имела низкие значения среднего времени жизни. Так в случае доброкачественных новообразований эти значения составляли от 156 ± 17 пс до 586 ± 268 пс, а в случае меланомы – от 285 ± 120 пс до 432 ± 86 пс. У доброкачественных новообразований эти клетки локализовались в базальном слое или в пределах невусных гнезд, а в меланомах были распределены по всем слоям эпидермиса и имели атипичную форму. Также было установлено, что для флуоресценции этих клеток характерны низкие значения относительного вклада длинной компоненты (от 4% до 13%). Такие особенности, в первую очередь, связаны с большим содержанием в этих клетках меланина. Вторая группа клеток характеризовалась значениями среднего времени жизни флуоресценции и относительного вклада длинной компоненты сопоставимыми с литературными данными для НАДН клеток кожи. В ходе дальнейшей работы проводили анализ параметров флуоресценции для клеток из второй группы.

При исследовании доброкачественных невусов, диагностированных дерматоскопически, было обнаружено, что значения среднего времени жизни флуоресценции снижаются при переходе от клеток зернистого слоя к клеткам базального. Значения вклада длинной компоненты либо снижались с глубиной исследования (смешанный невус), либо не изменялись (внутридермальный невус). В случае меланом, диагностированных с помощью дерматоскопии, также наблюдалось уменьшение значений среднего времени жизни флуоресценции, однако, абсолютные значения были достоверно ниже, чем в доброкачественных новообразованиях. Низкие значения среднего времени жизни флуоресценции обусловлены низкими значениями относительного вклада длинной компоненты. Таким образом, в результате исследования было установлено, что клетки меланомы характеризуются более низкими значениями среднего времени жизни флуоресценции и вклада длинной компоненты, по сравнению с доброкачественными новообразованиями.

При исследовании дерматоскопически сомнительных новообразований были выявлены схожие закономерности (рис. 7). Новообразования гистологически диагностированные как доброкачественные (простое лентиго, диспластический невус) имели значения среднего времени жизни флуоресценции и вклада длинной компоненты сопоставимые с таковыми для доброкачественных невусов из первой группы. Для сомнительных новообразований,

диагностированных как меланомы, все параметры времени жизни флуоресценции соответствовали параметрам, вычисленным для меланом, диагностированных с использованием дерматоскопии.

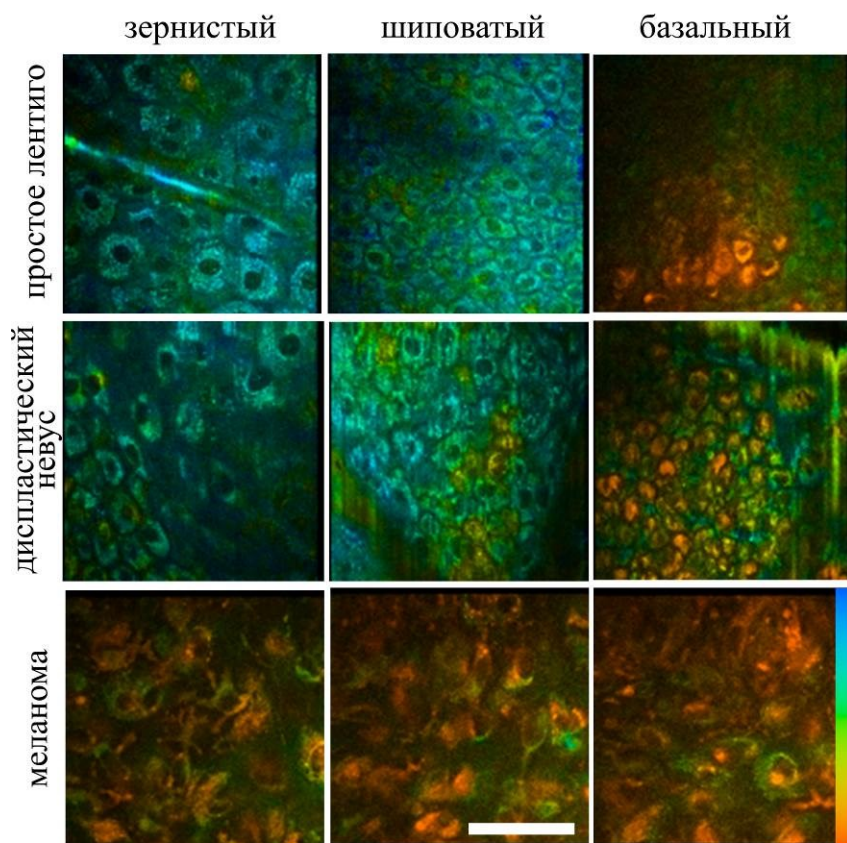


Рис. 7. FLIM-изображения, демонстрирующие распределение среднего времени жизни (tm) флуоресценции в клетках разных слоев эпидермиса дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований – простого лентиго, диспластического невуса и меланом. Масштабная линейка 100 мкм. Цветовой диапазон: 100 пс (красный) – 1600 пс (синий).

Таким образом, флуоресцентная микроскопия с временным разрешением позволяет идентифицировать меланомы. Для клеток меланомы характерны низкие значения среднего времени жизни флуоресценции около 760 пс и вклада длинной компоненты менее 20%. В случае инвазивных меланом такие клетки распространены по всем слоям эпидермиса.

Выводы:

1. Методом многофотонной флуоресцентной томографии были определены 6 флуоресцентных признаков злокачественности: в эпидермисе (полиморфные клетки, дендритные структуры, педжетоидные клетки) и дермо-эпидермальном переходе (гнезда, неоконтуренные сосочки дермы, отсутствие сосочков дермы). Для количественной оценки признаков злокачественности разработан многофотонный микроскопический индекс. ММИ позволяет разделить дерматоскопически сомнительные меланоцитарные новообразования на доброкачественные и меланомы. Доброкачественные новообразования имеют значения $\text{ММИ} \leq 1,28$, меланомы $> 1,28$.

2. Методом оптической когерентной ангиографии проведено изучение особенностей организации сосудистых сетей меланоцитарных новообразований. При визуальном анализе ОКА-

изображений выявлены следующие ангиографические признаки злокачественных меланоцитарных новообразований: нерегулярно ветвящиеся сосуды, высокая плотность сосудистой сети, большое количество извитых сосудов. Количественный анализ ОКА-изображений установил, что плотность сосудистой сети инвазивных меланом в 2,4 раза выше ($p=0.00009$) плотности сосудистой сети доброкачественных невусов. Суммарные длины тонких и толстых сосудов у меланом достоверно выше в 4,4 ($p=0.00075$) и 3,7 ($p=0.00173$) раза, соответственно. Количественный анализ ОКА-изображений дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований позволяет разделить меланомы *in situ* и инвазивные меланомы. Плотность сосудистой сети инвазивных меланом в 1,2 раза выше ($p=0.005$), чем у неинвазивных.

3. Посредством дискриминантного анализа оценена возможность комбинированного использования МФТ (ММИ) и ОКА (плотность сосудистой сети, длины тонких и толстых сосудов) для идентификации злокачественных меланоцитарных новообразований. Установлено, что комбинированный подход позволяет корректно разделить меланоцитарные новообразования на доброкачественные, меланомы *in situ* и инвазивные меланомы.

4. Методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии установлено, что клетки доброкачественных новообразований и меланом характеризуются гетерогенностью времен жизни флуоресценции. Во всех новообразованиях присутствуют клетки со значениями среднего времени жизни флуоресценции от 156 пс до 586 пс и вклада длинной компоненты от 87% до 96%. Клетки второй группы с временами жизни флуоресценции, характерными для НАДН, имели отличия между доброкачественными и злокачественными новообразованиями. Клетки меланомы характеризуются более низкими значениями среднего времени жизни флуоресценции (762 ± 109 пс) и вклада длинной компоненты ($20,4 \pm 1,1$ %), по сравнению с доброкачественными новообразованиями (991 ± 106 пс и $23,6 \pm 2,6$ %, соответственно). В случае дерматоскопически сомнительных меланом в эпидермисе также наблюдаются участки клеток, которые имеют параметры флуоресценции, характерные для кератиноцитов здоровой кожи.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. **Elagin V**, Gubarkova E, Garanina O, Davydova D, Orlinskaya N, Matveev L, Klemenova I, Shlivko I, Shirmanova M, Zagaynova E. In vivo multimodal optical imaging of dermoscopic equivocal melanocytic skin lesions // Scientific Reports. 2021. V. 11(1). P. 1405.
2. Gubarkova EV, **Elagin VV**, Dudenkova VV, Kuznetsov SS, Karabut MM, Potapov AL, Vorontsov DA, Vorontsov AY, Sirotkina MA, Zagaynova EV, Gladkova ND. Multiphoton tomography in differentiation of morphological and molecular subtypes of breast cancer: A quantitative analysis // Journal of Biophotonics. 2021. V. 14(5). P. e202000471.

3. Sirotkina MA, Gubarkova EV, Plekhanov AA, Sovetsky AA, **Elagin VV**, Matveyev AL, Matveev LA, Kuznetsov SS, Zagaynova EV, Gladkova ND, Zaitsev VY. In vivo assessment of functional and morphological alterations in tumors under treatment using OCT-angiography combined with OCT-elastography // *Biomedical Optics Express*. 2020. V. 11(3). P. 1365-1382.
4. Sirotkina MA, Moiseev AA, Matveev LA, Zaitsev VY, **Elagin VV**, Kuznetsov SS, Gelikonov GV, Ksenofontov SY, Zagaynova EV, Feldchtein FI, Gladkova ND, Vitkin A. Accurate early prediction of tumour response to PDT using optical coherence angiography // *Scientific Reports*. 2019. V. 9(1). P. 6492.
5. Garanina OE, **Elagin VV**, Davydova DA, Shlivko IL, Klemenova IA, Gubarkova EV, Orlinskaya NYu, Zagaynova EV. Modern non-invasive methods of diagnosis of melanocytic neoplasms of the facial skin // *Klinicheskaya Dermatologiya i Venerologiya*. 2019. V. 18(5). P. 608-615.
6. Moiseev A, Snopova L, Kuznetsov S, Buyanova N, **Elagin V**, Sirotkina M, Kiseleva E, Matveev L, Zaitsev V, Feldchtein F, Zagaynova E, Gelikonov V, Gladkova N, Vitkin A, Gelikonov G. Pixel classification method in optical coherence tomography for tumor segmentation and its complementary usage with OCT microangiography // *Journal of Biophotonics*. 2018. V. 11(4). P. e201700072.
7. Sirotkina MA, Matveev LA, Shirmanova MV, Zaitsev VY, Buyanova NL, **Elagin VV**, Gelikonov GV, Kuznetsov SS, Kiseleva EB, Moiseev AA, Gamayunov SV, Zagaynova EV, Feldchtein FI, Vitkin A, Gladkova ND. Photodynamic therapy monitoring with optical coherence angiography // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. P. 41506.

Тезисы конференций:

1. **Елагин ВВ**, Гаранина ОЕ, Дуденкова ВВ, Орлинская НЮ, Шливко ИЛ, Клеменова ИА, Загайнова ЕВ. Использование время-разрешенной флуоресцентной микроскопии для прижизненного исследования меланоцитарных новообразований // *Научные труды VII Съезда Биохимиков России 2021 г. Т. 2 С. 291*
2. **Elagin V**, Gubarkova E., Garanina O., Davydova D., Orlinskaya N., Matveev L., Klemenova I., Shlivko I., Zagaynova E. In vivo multimodal optical imaging of equivocal melanocytic skin lesions. The XXIV Annual conference Saratov Fall Meeting 2020.
3. Gubarkova EV, **Elagin VV**, Moiseev AA, Dudenkova VV, Kiseleva EB, Kuznetsov SS, Sirotkina MA, Vorontsov DA, Vorontsov AY, Zagaynova EV, Gladkova ND. Quantitative assessment of the breast tumor stroma using cross-polarization OCT and multiphoton tomography // *Proceedings of SPIE. Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging*. 2020. V. 11359. P. 113591O.
4. **Elagin V**, Gubarkova E, Garanina O, Orlinskaya N, Davydova D, Klemenova I, Shlivko I, Zagaynova E. Multimodal optical imaging for in vivo discrimination of equivocal melanocytic skin lesions // *Proceedings of SPIE. Progress in Biomedical Optics and Imaging*. 2020. V. 11211. P. 1121108.
5. Zagaynova EV, **Elagin V**, Gubarkova E, Garanina O, Orlinskaya N, Dudenkova VV, Shlivko I, Klemenova I, Davydova D. Multiphoton imaging and OCT MA for diagnosis of human melanocytic lesions // *Proceedings of SPIE. Progress in Biomedical Optics and Imaging*. 2019. V. 10882. P. 108820G.
6. Gladkova N., Moiseev A., Zagaynova E., Gubarkova E., Sirotkina M., Kiseleva E., Yashin K., Vorontsov D., Kuznetsov S., Plekhanov A., **Elagin V.**, Vitkin A., Gelikonov G., Shilyagin P., Ksenofontov S., Matveev L., Matveev A., Zaitsev V. Multimodal OCT for malignancy imaging and for predicting of

tumor response to treatment. Proceedings of International Symposium Topical problems of biophotonics 2019, Nizhny Novgorod, 2019, p. 123

7. **Elagin V.**, Gubarkova E., Garanina O., Orlinskaya N., Davydova D., Dudenkova V., Matveev L., Shlivko I., Klemenova I., Zagaynova E. Label-free multimodal optical imaging for diagnosis of human melanocytic lesions. Proceedings of International Symposium Topical problems of biophotonics 2019, Nizhny Novgorod, 2019, p. 110

8. **Елагин В.В.**, Губарькова Е.В., Дуденкова В.В., Гаранина О.Е., Давыдова Д.А., Орлинская Н.Ю., Шливко И.Л., Клеменова И.А., Загайнова Е.В. Использование FLIM микроскопии и оптической когерентной ангиографии для прижизненной диагностики тонких меланом. Научные Труды VI Съезда Биохимиков России. ActaNaturae 2019. Спецвыпуск, том 2, стр. 284.

9. **Елагин В.В.**, Губарькова Е.В., Дуденкова В.В., Гаранина О.Е., Давыдова Д.А., Орлинская Н.Ю., Шливко И.Л., Клеменова И.А., Загайнова Е.В. Использование мультимодального оптического имиджинга для прижизненной диагностики меланоцитарных образований человека. Тезисы X Съезда онкологов России 17-19 апреля 2019 г. Нижний Новгород, стр. 83-84.

10. **Elagin V.**, Gubarkova E., Garanina O., Orlinskaya N., Davydova D., Dudenkova V., Matveev L., Shlivko I., Zagaynova E. Differential diagnosis of melanocytic lesions by in vivo label-free multimodal optical imaging. Materials of International 2018 Conference on Laser Applications in Life Sciences (LALS'18). 18-20 Ноября, Бар-Илан, Израиль.

11. Zagaynova E, Shirmanova M, Lukina M, Dudenkova V, Ignatova N, **Elagin V**, Shlivko I, Scheslavsky V, Orlinskay N. Metabolic imaging of tumor for diagnosis and response for therapy // Proceedings of SPIE. Progress in Biomedical Optics and Imaging. 2018. V. 10498. V. 1049804.

12. **Elagin V**, Karabut M, Kiseleva E, Sirotkina M, Dudenkova V, Pavlova N, Kuznetsov S, Matveev L, Moiseev A, Shumilova A, Feldchtein F, Zagaynova E, Vitkin A, Gladkova N. Multiphoton tomography and multimodal OCT for in vivo visualization of oral malignancy in the hamster cheek pouch // Proceedings of SPIE. 2018. V. 10685. P. 106852T.

13. Zagaynova E, Shirmanova M, Lukina M, Dudenkova V, Shcheslavskiy V, **Elagin V**, Gubarkova E, Shlivko I. Time resolved imaging for tumor diagnosis and detection of chemotherapy response // Optics InfoBase Conference Papers, Part F91-TRANSLATIONAL 2018.

14. Сироткина М.А., Храмцова Е.В., Губарькова Е.В., **Елагин В.В.**, Павлова Н.П., Шумилова А.В., Кузнецов С.С., Моисеев А.А., Загайнова Е.В., Гладкова Н.Д. Новый способ оценки сосудистой реакции в ранний период после фотодинамической терапии экспериментальных опухолей. Материалы X съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти академика Н.Н. Трапезникова, 23-25 апреля 2018 Россия, Сочи. Евразийский онкологический журнал 2018. 6(1): 86.

15. Sirotkina M.A., Moiseev A.A., Kuznetsov S.S., Shirmanova M.V., Zaitsev V.Yu., **Elagin V.V.**, Gelikonov G.V., Zagaynova E.V., Vitkin A., Gladkova N.D. Monitoring of tumor treatment by multimodal optical coherence tomography. Topical problems of biophotonics-2017 p.104