Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Елагин Вадим Вячеславович

Оптические признаки злокачественных меланоцитарных новообразований

1.5.2 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: д.м.н., чл.-корр. РАН, Загайнова Елена Вадимовна

Нижний Новгород – 2022

оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	. 14
1.1. Оптические методы визуализации новообразований кожи	. 14
1.1.1. Многофотонная флуоресцентная микроскопия	. 14
1.1.2. Время-разрешенная флуоресцентная микроскопия	. 19
1.1.3. Оптическая когерентная ангиография	. 26
1.2. Особенности прогрессирования меланомы	. 29
1.3. Общепринятые подходы к диагностике меланомы	. 33
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	. 39
2.1. Объекты исследования	. 39
2.2. Методы и методики исследования	. 40
2.2.1. Многофотонная томография	. 40
2.2.2. Многофотонный микроскопический индекс	. 42
2.2.3. Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением	. 44
2.2.4. Оптическая когерентная ангиография	. 47
2.2.5. Количественный анализ ОКА-изображений	. 49
2.3. Статистическая обработка данных	. 49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	. 52
3.1. Выявление флуоресцентных признаков злокачественн	łЫХ
меланоцитарных новообразований	. 52
3.2. Изучение флуоресцентных особенностей дерматоскопиче	ски
сомнительных меланоцитарных новообразований	. 65
3.3. Количественный анализ флуоресцентных призна	ков
злокачественности	. 74
3.4. Выявление ангиографических признаков злокачественн	łЫХ
меланоцитарных новообразований методом оптической когеренти	ной
ангиографии	. 78

3.5.	Оценка	BO3M	южностей	комб	инированного]	исполь	зования
флуој	ресцентных	И	ангиографич	еских	признаков	для	опре;	деления
злока	чественных і	новос	бразований	•••••				
3.6.	Исследовани	ие м	еланоцитарни	ых ноі	зообразований	і ме	годом	время-
разре	шенной флус	оресц	ентной микро	скопии		•••••		
ЗАКЈ	ІЮЧЕНИЕ			•••••				
выв	ОДЫ			•••••				102
СПИ	СОК ЦИТИР	OBA	ННОЙ ЛИТЕ	РАТУР	Ы			104

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГВГ – генерация второй гармоники

ММИ – многофотонный микроскопический индекс

МФТ – многофотонная флуоресцентная томография

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид

ОДИ – общий дерматоскопический индекс

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОКА – оптическая когерентная ангиография

 $\Phi A \Pi - \phi$ лавинадениндинуклеотид

ФМН – флавин мононуклеотид

CI – confidence interval – доверительный интервал

FLIM – fluorescence lifetime imaging – флуоресцентная микроскопия с временным разрешением

OR - odds ratio - отношение шансов

TCSPC – time-correlated single photon counting – время-коррелированный счёт единичных фотонов

введение

Актуальность 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. Во время получения оптических изображений свет взаимодействует с биологическими тканями, что сопровождается рядом фотофизических явлений, таких как пропускание или поглощение, отражение, рассеяние и флуоресценция. Каждое из этих явлений может быть использовано для получения информации о биохимических процессах и морфологических особенностях объекта исследования [1]. В случае визуализации основанной на поглощении света, изображение формируется за счет отличий коэффициентов поглощения у разных молекул или структур исследуемого объекта. Зондирующее излучение может поглощаться как эндогенными, так и экзогенными хромофорами [2]. Поглощенный свет может рассеиваться в окружающие ткани в виде тепла, что лежит в основе оптоакустической томографии [3]. Кроме того, часть поглощенного света может быть излучена с большей длиной волны, чем у зондирующего. На основе этого эффекта реализована флуоресцентная визуализация [4]. Флуоресценция получила широкое распространение при проведении фундаментальных и прикладных исследований в области биологии и медицины. В дополнение к предыдущим двум механизмам взаимодействия света с объектом, падающий свет может рассеиваться в гетерогенных средах, таких как биологические ткани. характер светорассеяния морфологических Поскольку зависит OT особенностей ткани, то данный подход позволяет получать информацию о ее структуре. На этом принципе основана оптическая когерентная томография (ОКТ)[5]. Регистрация отраженного света лежит в основе отражательной конфокальной микроскопии. В этом случае контрастность изображения достигается за счет отличия коэффициентов преломления у разных клеточных и тканевых структур [6].

Методы флуоресцентной микроскопии получили широкое распространение В in vitro исследованиях монослойных культур эукариотических клеток. Большое разнообразие флуоресцентных маркеров обеспечивает возможность селективного мечения различных клеточных органелл с целью их изучения. Появление лазерных источников ближнего инфракрасного диапазона с длительностью импульсов до нескольких сотен фемтосекунд позволило реализовать новый подход, основанный на регистрации времени жизни флуоресценции, и открыло новые возможности для оптической микроскопии. Кроме того, в ближнем ИК-диапазоне (700-1000 нм) лежит окно оптической прозрачности биологических тканей, для которого характерно наименьшее поглощение света, что позволяет значительно увеличить глубину исследования [7, 8]. На основе источников ближнего ИКдиапазона были разработаны микроскопы для проведения прижизненного исследования кожных покровов [9]. Современные методы нелинейной оптической микроскопии позволяют проводить прижизненное исследование поверхностных тканей с высоким пространственным разрешением и сопоставимое с гистологическим исследованием, но требующее не применения дополнительного окрашивания. Ha основе регистрации двухфотонной флуоресценции эндогенных флуорофоров (НАДН), (никотинамидадениндинуклеотид флавинадениндинуклеотид (ФАД), меланин) визуализируются морфологические особенности клеточного компонента тканей. Для оценки состояния стромы используется режим генерации второй гармоники, визуализирующий волокна коллагенов I и II типа [10]. Таким образом, данный метод позволяет получать информацию о трехмерной структуре ткани. Кроме того, возможно проведение флуоресцентного микроскопического исследования С временным разрешением (FLIM), позволяющего разделять эндогенные флуорофоры по времени жизни их флуоресценции [11], и, как следствие, оценивать метаболический статус клеток [12].

ОКТ на сегодняшний день используется в клинической практике только офтальмологии [13]. Появление подходящей технической базы и В высокопроизводительных компьютеров стало новым толчком в развитии данной технологии. Появилась возможность получать информацию о трехмерной структуре сосудистого русла и упругих свойствах ткани в режиме реального времени с использованием оптической когерентной ангиографии (ОКА) и оптической когерентной эластографии (ОКЭ). На сегодняшний день ряд научных групп И производственных компаний изготавливают мультимодальные ОКТ приборы, совмещающие в себе несколько или сразу все функции (структурная ОКТ, поляризационно-чувствительная ОКТ, ОКА и ОКЭ) [14]. Такие приборы 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. Традиционными первичному подходами К исследованию таких новообразований являются визуальный осмотр и дерматоскопическое исследование. Чувствительность только клинического осмотра не превышает 70% даже у опытных дерматологов, применение дерматоскопии позволяет повысить чувствительность и специфичность до 89% и 79%, соответственно [15]. Однако, существует большая группа дерматоскопически сомнительных новообразований, не имеющих четких признаков злокачественности. Согласно литературным данным специфичность дерматоскопического исследования сомнительных новообразований составляет не более 49% [16]. Важно отметить, что до 80% меланоцитарных новообразований могут вызывать трудности при клинической и дерматоскопической диагностике [17]. С другой стороны, хорошо известно, что доброкачественные невусы на способны некоторых участках имитировать меланому [18]. тела

Диспластические невусы, формально относящиеся к доброкачественным, имеют как клинические, так и морфологические признаки атипии и являются главными «симуляторами меланомы» [19, 20]. Таким образом, доля ложноположительных ошибок в диагностике меланомы может составлять от 5,5% [21] до 23% [22], а в ряде случаев до 41% [23].

В связи с этим, «золотым стандартом» исследования меланоцитарных новообразований до сих пор остается гистологический анализ. Однако, в ряде случаев, обусловленных локализацией новообразования и/или психоэмоциональным состоянием пациента, проведение эксцизионной биопсии и постановка диагноза происходят на более поздних стадиях заболевания. Таким образом, становится понятно, что потребность в проведении гистологического исследования возникает намного чаще, чем оно проводится.

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 (МФТ), FLIM и ОКА. 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.

 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, ее значение для инвазивных меланом достоверно выше, чем для неинвазивных или доброкачественных новообразований.

Впервые что комбинированное показано, использование ангиографических флуоресцентных признаков, И выявляемых С использованием МФТ и ОКА, позволяет разделить дерматоскопически новообразования не сомнительные доброкачественные только на 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

Работа демонстрирует перспективность прижизненного изучения меланоцитарных новообразований с использованием таких неинвазивных методов, как МФТ и ОКА. Предложенный подход может быть использован для диагностики злокачественных новообразований кожи, в качестве дополнительного. Разработанный ММИ может быть адаптирован для количественной оценки признаков злокачественности новообразований кожи различной природы.

Результаты ОКА дают новую информацию о перестройках сосудистого русла происходящих при малигнизации, а также в процессе инвазивного роста. Количественный анализ сосудистых сетей может быть использован при изучении для любых процессов, происходящих в коже или слизистой оболочке.

Результаты FLIM-исследования имеют важное значение для понимания изменений метаболических процессов, происходящих при малигнизации. Полученные фундаментальные данные о гетерогенности клеток меланоцитарных новообразований могут быть использованы для поиска новых диагностических критериев, а также для понимания механизмов формирования опухолевого узла.

Результаты диссертационного исследования имеют фундаментальное значение для развития новых подходов к диагностике новообразований кожи. Поскольку используемые в исследовании методы не требуют

дополнительного окрашивания клеток и тканей, полученные результаты потенциально могут быть использованы в клинике для решения задач диагностики опухолей.

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

Основные 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.

Личный вклад автора

Автором лично проведены экспериментальные исследования И выполнен полученных данных. Разработан многофотонный анализ микроскопический индекс для количественного анализа флуоресцентных признаков злокачественности на изображениях многофотонной томографии. В случае количественной обработки сосудистых сетей на изображениях оптической когерентной ангиографии исследование выполнено совместно с разработчиками алгоритма обработки. Принято непосредственное участие в обсуждении полученных результатов и подготовке научных статьей и докладов на научных конференциях.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов обусловлена надежностью используемых экспериментальных методов исследования и подтверждена воспроизводимостью экспериментальных данных, а также качественным и количественным согласием с теоретическими выводами и обоснованиями.

Апробация работы

были Основные результаты диссертационного исследования 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.), Х 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.).

Публикации

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

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Оптические методы визуализации новообразований кожи

1.1.1. Многофотонная флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия является широко распространенным методом, используемым для исследования морфологических И физиологических особенностей биологических тканей. Существует несколько разновидностей флуоресцентной микроскопии таких как широкопольная, однофотонная лазерная многофотонная сканирующая И лазерная сканирующая. Благодаря технологическим достижениям И снижению стоимости оборудования в последнее время все более популярной становится многофотонная лазерная сканирующая микроскопия. Обычно при возбуждении источником света электрон атома флуорофора поглощает только один фотон и переходит в возбужденное состояние, то есть на орбиталь с более высокой энергией. В этом состоянии он находится очень короткий промежуток времени порядка 0,5-20 нс, после чего высвобождает энергию, испуская один фотон, и возвращается в исходное (основное) состояние. Стоит что энергия излучаемого фотона, другими словами, цвет отметить, флуоресценции определяется только характеристиками флуорофора (то есть типом флуорофора, химической структурой и т. д.). Период времени, в течение которого электрон остается в возбужденном состоянии, называется временем жизни флуоресценции, а механизм такого возбуждения называется однофотонным возбуждением. Двухфотонное возбуждение – это возбуждение флуорофора двумя фотонами, но с меньшей энергией (то есть меньшей частотой и большей длиной волны), чем требуется при однофотонном возбуждении (рис. 1.1 А). При двухфотонном возбуждении каждый фотон несет половину энергии, необходимой для возбуждения флуорофора, поэтому длина волны возбуждения примерно в два раза больше длины волны, используемой при однофотонном возбуждении. Например, одновременное поглощение двух квантов света с длиной волны 750 нм, соответствует по энергии поглощению кванта света с диной волны 375 нм. Для достижения

двухфотонного возбуждения необходимо одновременное поглощение двух фотонов, что достигается при потоке $10^{20}-10^{30}$ фотонов/(см²×с). Понятие двухфотонного возбуждения было впервые введено Мария Гёпперт-Майер в 1931 году, а впервые реализовано на практике только в 1990 году после появления субпикосекундных лазеров с синхронизацией мод [24].



Рисунок 1.1. Отличия процессов однофотонного и двухфотонного возбуждения флуоресценции. Диаграммы Яблонского, описывающие процессы однофотонного (слева) и двухфотонного (справа) возбуждения флуоресценции (А). Двухфотонное возбуждение флуоресценции происходит в результате одновременного поглощения двух фотонов, каждый из которых имеет половину энергии от однофотонного поглощения. Объем образца, в котором происходит возбуждение в случае однофотонной (слева) и многофотонной (справа) флуоресценции (Б).

Эффективность поглощения зависит от физических свойств флуорофора, так называемого сечения двухфотонного поглощения, и от длины

волны возбуждающего света. Единица, используемая для измерения этого явления, называется Гёпперт-Майер (GM), где 1 GM соответствует 10⁻⁵⁰ см⁴×с×фотон⁻¹. Эндогенные молекулы, такие как НАДН, характеризуются небольшими поперечными сечениями (<10⁻⁴ GM), в то время как обычные флуоресцентные красители имеют значения поперечного сечения поглощения в диапазоне 1-300 GM.

На сегодняшний день для достижения высокой интенсивности светового потока и реализации двухфотонного возбуждения используются импульснопериодические лазеры с длительностью импульса около 100 фемтосекунд и частотой следования 80-100 МГц. Такие лазеры характеризуются высокой пиковой мощностью, но при этом средняя мощность невелика и сопоставима с однофотонными лазерами. Другим механизмом повышения интенсивности светового потока является фокусировка луча в пятно размером несколько микрон. Достигается это за счет использования объективов с высокой числовой апертурой.

Поскольку спектры однофотонного возбуждения большинства флуорофоров лежат в диапазоне 400-600 нм, то для двухфотонного возбуждения используют источники ближнего инфракрасного диапазона 700-1200 нм. Использование света ближнего инфракрасного диапазона обладает рядом преимуществ, по сравнению с видимым светом. В первую очередь, значительно увеличивается глубина проникновения в биологические ткани. При оптимальных настройках глубина визуализации биологических тканей составляет не менее 100 мкм [25]. Поскольку большинство тканей не обладают ЭТОМ диапазоне поглощением В длин, то значительно снижается фотоповреждение объекта исследования. В следствие того, что вероятность одновременного поглощения двух фотонов высока только в фокусной плоскости, то уровень фона от сигнала из внефокусных плоскостей значительно снижается по сравнению с однофотонным возбуждением (рис. 1.1 Б). При двухфотонном возбуждении более 80% всей интенсивности флуоресценции излучается из области размерами 700-1000 нм вокруг фокуса.

Благодаря этому увеличивается пространственное разрешение по оси Z и отпадает необходимость в использовании конфокальной диафрагмы.

В ряде исследований было показано, что в фокальном объеме могут происходить реакции фотоповреждения, протекающие по трем основным Во-первых, окислительное фотоповреждение, вызванное механизмам. многофотонным возбуждением эндогенных или экзогенных флуорофоров, которое развивается аналогично таковому при УФ-облучении [26]. Фотоактивация этих флуорофоров приводит к образованию активных форм запускают последующий каскад кислорода, которые биохимических повреждений в клетках. Установлено, что степень фотоповреждения имеет квадратичную зависимость от мощности возбуждения и подтверждает, что двухфотонное поглощение является основным механизмом повреждения [27]. При этом чем короче длина волны возбуждения и больше длина импульса, тем выше эффект фотоповреждения [28, 29]. Вторым механизмом является термическое повреждение, возникающее в результате двухфотонного поглощения. Тепловой эффект, возникающий при поглощении водой излучения с типичными для визуализации биологических объектов энергиями, составляет около 1 мК. Однако, в присутствии сильного поглотителя в ИКдиапазоне, такого как меланин, может возникать значительный нагрев [30]. Третий механизм фотоповреждения обусловлен высокой пиковой мощностью импульсных лазеров и связан с пробоем диэлектрика [27]. Однако, этот механизм требует уточнения. Эффекты фотоповреждения могут быть минимизированы за счет оптимизации мощности возбуждающего излучения и длительности получения изображения.

Известно, что некоторые биологические молекулы и тканевые структуры обладают собственной флуоресценцией, которая может быть индуцирована при двухфотонном возбуждении. К ним относятся такие биологические молекулы, как НАДН, ФАД, кератин, меланин, а также волокна эластина [31]. Среди структурных компонентов ткани особенно выделяются коллагены I и II типов благодаря своей способности генерировать вторую

оптическую гармонику. В связи с чем они являются наиболее подходящими особенностей агентами ДЛЯ визуализации организации стромального компонента ткани [32, 33]. Используя, флуоресценцию эндогенных флуорофоров и сигнал второй гармоники можно проводить исследование биологических объектов без дополнительного их окрашивания. В дополнение к этому, большая глубина проникновения зондирующего излучения и низкий уровень фона делают многофотонную флуоресцентную микроскопию перспективным инструментом для проведения прижизненных исследований на лабораторных животных и пациентах.

С использованием двухфотонной флуоресцентной микроскопии было проведено исследование послеоперационного материала кожи человека с целью поиска опухолевых маркеров [34, 35]. Dimitrow и соавторы провели скрининг меланоцитарных новообразований кожи с целью определения специфических особенностей меланомы [36]. Исследователями были особенности, визуализируемые двухфотонной выделены четыре флуоресцентной микроскопией, среди них нарушение архитектуры эпидермиса, плохо визуализируемые границы кератиноцитов, наличие дендритных и плеоморфных клеток (рис. 1.2). При использовании данных критериев для диагностики меланомы на послеоперационных образцах диагностическая точность составила 97%. Также был показан потенциал комбинированного двухфотонной флуоресцентной использования микроскопии и флуоресцентной микроскопии с временным разрешением для дифференцировки здоровой и малигнизированной кожи [35]. Warren с коллегами продемонстрировали перспективы комбинации двухфотонной флуоресцентной микроскопии с методом *ритр-probe* для определения типа меланина [37, 38]. Наряду со структурной информацией, полученной методом двухфотонной микроскопии, авторы смогли отличить эумеланин OT феомеланина и отличить меланомы от доброкачественных невусов по содержанию эумеланина [39].



Рисунок 1.2. Двухфотонная флуоресцентная микроскопия меланомы человека: роговой (а), зернистый (б), шиповатый (в, г) слои. При исследовании были выявлены четыре маркера: нарушение структуры эпидермиса (а, меланоциты с высоким уровнем флуоресценции, белые стрелки), плохо визуализируемые границы кератиноцитов (б, в, г), плеоморфные и дендритные клетки (в, г, звездочка и стрелки, соответственно). Масштабная линейка 40 мкм [36].

В целом двухфотонная флуоресцентная микроскопия является полезным инструментом для широкого круга приложений, от экспериментальных исследований опухолей на животных моделях до прижизненного неинвазивного исследования новообразований у пациентов.

1.1.2. Время-разрешенная флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением находит широкое применение в таких областях науки, как химия, биология и медицина,

что обусловлено несколькими причинами. Во-первых, данный метод позволяет оценивать не только структурное состояние объекта, но и биохимические, молекулярные и физико-химические процессы, протекающие в нем. Во-вторых, метод является минимально инвазивным при оптимально подобранных параметрах получения данных. В-третьих, существует приборная реализация метода, позволяющая проводить прижизненные исследования [40].

Метод FLIM основан на таком свойстве флуоресценции, как время ее затухания (жизни). Когда молекула флуорофора, находящаяся в основном состоянии (обозначена как S0 на рис.1.3), поглощает фотон с энергией, равной или большей, чем энергия более высоких энергетических уровней (S1, S2,... Sn), электрон на короткий период времени переходит на один из подуровней этого энергетического уровня.



Рисунок 1.3. Диаграмма Яблонского, иллюстрирующая процессы флуоресценции и фосфоресценции [41].

Затем часть энергии электрона расходуется в результате колебательных нижний релаксаций при переходе на энергетический подуровень возбужденного состояния (обозначен как S1). Из такого состояния молекула может вернуться в основное состояние за счет испускания кванта света или безызлучательного процесса. На рисунке 1.3 представлены различные явления люминесценции, происходящие на этих уровнях. Масштаб времени за который происходит возврат молекулы в основное состояние составляет порядка 10⁻⁹ с. При этом излучение кванта флуоресценции происходит всегда с нижнего подуровня электронного уровня (S1), что гарантирует неизменность спектра флуоресценции от длины волны возбуждения. Энергия испускаемого фотона флуоресценции ниже (т.е. излучение происходит на большей длине волны, чем возбуждение) из-за потери энергии при колебательной релаксации и внутренних преобразований. Этот сдвиг длины волны излучения называется стоксовым сдвигом.

Обычно мы определяем время жизни флуоресценции τ как среднее время, в течение которого флуорофор остается в возбужденном состоянии. В этом временном интервале интенсивность флуоресценции снижается до 1/eили до 36,8% от исходного значения. Интенсивность затухания в момент времени t определяется уравнением (1):

$$I(t) = \sum_{i} a_i e^{-t/\tau_i},\tag{1}$$

где *а* - предэкспоненциальный множитель или амплитуда экспоненциальной функции. Среднее время жизни (тm) многоэкспоненциальной смеси образцов представляет собой сумму времен жизни каждого образца (τ_i), с учетом относительного вклада каждого образца (2).

$$\tau_m = \sum_i \tau_i a_i \tag{2}$$

Время флуоресценции может быть жизни измерено как с использованием временного подхода, так и частотного. В случае временного подхода, для измерения времени жизни флуоресценции используют короткий импульс возбуждающего света (короткий по сравнению со временем жизни флуоресценции образца), а затем записывают экспоненциальный распад флуоресценции молекул [42, 43]. В случае частотного подхода, возбуждение осуществляется непрерывно с модуляцией амплитуды во времени в виде синусоиды. Сигнал флуоресценции сдвигается по фазе и амплитуде относительно волны возбуждения. Фазовая задержка и амплитудная флуорофора визуализируются путем построения графиков модуляция фазовых изменений в диапазоне частот модуляции. Результирующий синусоидальный сигнал флуоресценции может быть демодулирован в частотной области для количественной оценки задержки, вызванной экспоненциальным затуханием интенсивности флуоресценции [44, 45].

Наиболее распространенная реализация время разрешенного флуоресцентного анализа – это быстрый электронный метод, называемый время коррелированный подсчет единичных фотонов (time-correlated single photon counting, TCSPC). В данном методе детектирование фотонов происходит со скоростью значительно меньшей, чем частота следования импульсов возбуждения. При этом на детекторе формируется сигнал в виде последовательности электрических импульсов, распределения которых относительно импульса возбуждения представляет собой кривую затухания флуоресценции. В данном методе происходит измерение времени между импульсом возбуждения и прибытием фотона флуоресценции на детектор. Каждый последующий импульс приводит к накоплению все большего числа фотонов по результатам которого строится статистическая диаграмма распределения фотонов [46]. Метод TCSPC является очень эффективным, поскольку все зарегистрированные фотоны используются для построения распределения. В данном случае временная точность ограничена только временными характеристиками детектора. FLIM на основе TCSPC позволяет

обрабатывать кривые со сложным (многоэкспонентным) характером затухания флуоресценции. Кроме того, регистрируемые параметры времени жизни флуоресценции не зависят от интенсивности возбуждающего излучения. Однако существенным моментом является сильная зависимость данного метода от количества зарегистрированных фотонов. Чем более сложными экспоненциальными законами описываются кривые затухания, тем большее количество фотонов необходимо зарегистрировать для проведения корректного анализа времени жизни.

Скорость регистрации фотонов в ТСЅРС ограничена «мертвым» временем электроники и эффектами накопления [46]. «Мертвое» время обусловлено ограничением скорости обработки сигналов и сводится к тому, что детектор в течении определенного времени (от десяти до сотни зарегистрировать следующий наносекунд) не может фотон после предыдущего. Эффект накопления заключается в том, что при облучении образца излучением с высокой мощностью возрастает скорость эмиссии фотонов флуоресценции и возрастает вероятность прихода на детектор нескольких фотонов в течении одного лазерного импульса, при этом регистрируется только первый фотон. Чтобы избежать этого эффекта, скорость излучения фотонов флуоресценции не должна превышать 10% от частоты повторения лазерных импульсов.

Биологические системы содержат большое количество эндогенных флуорофоров, которые могут быть использованы для время разрешенной флуоресцентной визуализации. Кроме того, данные флуорофоры являются хорошими маркерами, поскольку параметры их флуоресценции связаны с микроокружением. Параметры флуоресценции наиболее часто исследуемых эндогенных флуорофоров приведены в таблице 1.

Особый интерес представляет время-разрешенная флуоресцентная микроскопия метаболических кофакторов: восстановленного НАДН и окисленного ФАД, которые участвуют в процессах электронного транспорта и энергетического метаболизма в клетках [47]. НАДН является донором

электронов в электрон-транспортной цепи митохондрий и способен к флуоресценции только в восстановленной форме. ФАД, напротив, является акцептором электронов и флуоресцирует только в окисленной форме.

Флуорофор	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны эмиссии, нм	Время жизни флуоресценции, нс	Источник
Билирубин	350-520	480-650	0,02-0,09; 1-2	[48]
Кератин	277	382	1,4	[49]
Коллаген	280-350	370-440	0,2-0,4 0,4-2,5	[10, 50]
Меланин	300-800	440; 520; 575	0,1-0,2; 0,5-1,8; 7,9	[50, 51]
НАДН	340	470	0,4 (свободный) 1-5 (связанный)	[52, 53]
Ретинол	327	510	1,8; 5 (свободный) 0,7; 3,6; 12 (связанный)	[51]
Рибофлавин	420-450	520-750	4,12	[50]
ФАД	450	535	2,3-2,9 (свободный) <0,1 (связанный)	[54, 55]
ФМН	444	558	4,27-4,67	[50, 56]
Эластин	300-370	420-460	0,2-0,4 0,4-2,5	[10, 50]
Эумеланин	355	520	0,058; 0,51; 2,9; 7	[57]

Таблица 1. Параметры флуоресценции эндогенных флуорофоров

Важным свойством флуоресценции ЭТИХ кофакторов является зависимость времени жизни от их взаимодействия с белками. Затухание флуоресценции имеет биэкспоненциальный характер для обоих флуорофоров. Для НАДН короткая компонента времени жизни соответствует свободной форме, длинная компонента – форме, связанной с белками [52, 58]. Существует зависимость времени жизни длинной компоненты от того белка, с которым он связан [53]. В случае с ФАД короткая компонента отвечает за связанное с белком состояние и обусловлена тушением флуоресценции флавина адениновым кольцом [59]. Также стоит отметить, что существует зависимость между отношением вкладов короткой и длинной компонент затухания флуоресценции каждого из кофакторов и метаболическим статусом клеток [12, 60, 61].

В ряде исследований показана возможность применения времяразрешенной флуоресцентной микроскопии для диагностики меланоцитарных новообразований [62, 63]. Авторы показали значительные различия во времени жизни флуоресценции кератиноцитов и меланоцитов. Меланоциты характеризовались более короткими временами жизни и преобладанием относительного вклада короткой компоненты. При этом значения времени жизни флуоресценции коррелируют с внутриклеточным количеством меланина [62]. Меланома характеризуется наличием атипичных клеток, имеющих очень короткие времена жизни флуоресценции [63].

На депарафинированных образцах лимфатических узлов пациентов с меланомой кожи была исследована возможность применения времяразрешенной флуоресцентной микроскопии для выявления метастазов [64]. Данный метод позволил выявить наличие метастатических клеток на фоне лимфоцитов и эритроцитов.

На модели подкожно привитой меланомы показано, что прогрессирование опухоли сопровождается увеличением соотношения относительных вкладов свободной и связанной форм НАДН, при этом сами времена жизни оставались неизменными [65].

Анализ времени жизни флуоресценции меланина в коже добровольцев показал, что короткая компонента у людей африканского происхождения имеет значения 120-140 пс, тогда как у людей азиатского происхождения 150 – 220 пс. При этом значения длинной компоненты не отличались [51].

Таким образом, FLIM может стать полезным инструментом для исследования меланоцитарных новообразований и окружающих тканей с целью выявления малигнизации.

1.1.3. Оптическая когерентная ангиография

ОКА еще находится на стадии разработки, но уже зарекомендовала себя перспективный инструмент, позволяющий неинвазивно получать как изображения сосудистой сети в режиме реального времени И С беспрецедентным разрешением [66]. ОКА – это функциональное расширение оптической когерентной томографии, структурной реализованное посредством повторяющегося В-сканирования, позволяющего обнаружить движение пикселей и таким образом получить контрастное изображение сосудистой сети. Стационарные объекты, в отличие от движущихся, не изменяются на соседних изображениях. Традиционная структурная ОКТвизуализация позволяет получить трехмерный объем изображений путем выполнения последовательных В-сканирований в различных местах объекта. Для обнаружения движения и создания сосудистого изображения необходимо несколько раз визуализировать одну и ту же область объекта. Для этого выполняются многократные повторные В-сканирования в одном и том же месте объекта, а затем структурные изображения сравниваются попиксельно, чтобы обнаружить изменения сигнала, связанные перемещением С эритроцитов. Для получения объемных данных по области объекта выполняются повторные В-сканирования с последовательным смещением. ОКА обеспечивает получение трехмерной структуры сосудистого русла и может быть представлена в виде проецированных en-face изображений сосудов из различных слоев. ОКА визуализирует сосудистую сеть с хорошим

разрешением по глубине. Кроме того, в отличии от флуоресцентных методов исследования сосудов, она не требует введения экзогенного контраста и позволяет проводить исследования неоднократно в течение любого времени, поскольку не происходит перераспределения контрастного агента. С клинической точки зрения ОКА позволяет выявить такие сосудистые проявления заболеваний как неоваскуляризация, аномальная геометрия сосудов (расширенные сосуды, аневризмы, извитость) или отсутствие кровотока. Полученные данные могут быть использованы для расчета количественных показателей, таких как плотность сосудистой сети, количество сосудов разного диаметра, степень извитости сосудов [67].

Однако у данного метода есть ряд ограничений. Поскольку визуализация сосудов происходит за счет контраста движения, то любые движения объекта вносят значительные артефакты [68]. Для их минимизации используют приборы с высокой частотой получения А-сканов, а также уменьшают размер области сканирования [69]. Также ОКА не позволяет оценить проницаемость сосудов. Стоит отметить, что на сегодняшний день существует несколько ОКА приборов и алгоритмов обработки сигналов, поэтому при сравнении данных, полученных разными группами требуется внимательность к исходным параметрам приборов. Тем не менее, при понимании основ и правильной интерпретации ОКА позволит получить как новые знания о процессах патогенеза различных заболеваний, так и выявить новые маркеры, позволяющие проводить диагностику И оценку прогрессирования.

В предыдущих исследованиях методом ОКА были выявлены особенности сосудистого русла характерные для различных заболеваний кожи [70, 71]. Так при актиническом кератозе сосуды слегка утолщены и располагаются в виде ретикулярной сети. Сосудистая сеть в случае болезни Боуэна состоит из точек, пятен и слабо изогнутых, неорганизованных в сеть сосудов. При инвазии плоскоклеточного рака сосудистая сеть нерегулярная и диффузно организованная сосудами различного диаметра. Поверхностные

невусы характеризуются регулярно расположенными сосудами в виде точек. При глубоком расположении невуса появляется сетчатая структура. В случае меланомы в поверхностной дерме расположены сосуды в виде точек и капель, при увеличении глубины сосуды становятся линейными, нерегулярного размера с разветвленной архитектурой. Известно, что при прогрессировании и инвазии меланома приобретает богатую сосудистую сеть. Показано, что количество опухолевых сосудов внутри новообразования увеличивается в ряду от обычного невуса к диспластическому (умеренная, выраженная и тяжелая дисплазия) и к меланоме более чем в 3 раза [72].

Сотрудниками Института прикладной физики Российской академии наук (ИПФ РАН, г. Нижний Новгород) разработан метод картирования микроциркуляции биологических объектов в реальном времени на основе временной фильтрации полного (комплекснозначного) ОКТ сигнала, сочетающего преимущества амплитудных и фазовых методов визуализации кровотока без использования контрастных агентов за счет естественного движения рассеивающих частиц в крови. Для каждого элемента разрешения в такой процессе фильтрации производится устранение постоянной составляющей изменений И низкочастотных В сигнале. Медленно изменяющиеся во времени элементы не визуализируются, т.к. для них большая часть сигнала приходится на отфильтровываемую низкочастотную часть. В итоге визуализируются только те элементы, в которых сигнал быстро рассеивателей. изменяется достаточно из-за движения Преимуществом метода поэлементной временной фильтрации сигнала является получаемое высокое разрешение при визуализации микроциркуляции, которое соответствует разрешению ОКТ-системы (в отличие от корреляционного подхода, для которого разрешение ухудшается из-за конечного размера корреляционного окна на изображении) [73].

С использованием ОКТ прибора и алгоритмов получения и обработки данных, разработанных в ИПФ РАН, был проведен ряд экспериментальных и клинических исследований. Так на экспериментальной модели опухоли

мышей были определены ранние критерии эффективности фотодинамической терапии, связанные с изменениями сосудистой сети. Так исчезновение сосудов на ОКА изображениях, связанное с тромбозом и прекращением кровотока, является основным фактором определяющим успех терапии [74]. Для более прогнозирования опухолевого ответа разработан точного критерий отражающий плотность перфузированных сосудов в опухоли и окружающей ткани [75]. Проведенные клинические исследования показали, что ОКА по структуре сосудистого русла позволяет дифференцировать несколько подтипов базальноклеточного рака с диагностической точностью 78%. Кроме того, оценка состояния сосудов в опухоли после фотодинамической терапии позволяет прогнозировать ответ опухоли на лечение, а анализ сосудов в окружающей опухоль ткани – прогнозировать тип рубца, который будет сформирован [76]. Количественный анализ изменения плотности сосудов слизистой оболочки полости рта при лучевой терапии позволяет выявить ранние проявления мукозита еще до появления визуальных признаков или клинических симптомов [77].

Таким образом, оптическая когерентная ангиография может стать полезным инструментом для выявления сосудистых критериев малигнизации и инвазивного роста меланоцитарных новообразований.

1.2. Особенности прогрессирования меланомы

Злокачественная меланома кожи – одна из наиболее агрессивных форм рака кожи, возникающая в результате злокачественной трансформации меланоцитов. На сегодняшний день меланома составляет около 4% от всех случаев рака кожи [78], но при этом 90% всех летальных исходов от рака кожи связано с меланомой [79]. Кроме того, заболеваемость меланомой среди европеоидного населения увеличивается на 3-7% в год [80]. Наиболее распространенным фенотипическим фактором риска является кожа первого фототипа. Еще одним фактором риска, обусловленным генотипически, является наличие большого количества обычных невусов, врожденных

невусов большого размера, а также множественных диспластических невусов [81]. Известно, что 5-10% меланом имеют наследственный характер и появляются у людей, члены семей которых имели данное заболевание [82]. Наиболее важным экзогенным фактором является воздействие УФ-излучения, особенно периодического воздействия солнца [83].

Меланома кожи классифицируется как меланома *in situ*, если распространение неопластических меланоцитов происходит в пределах эпидермиса, или как инвазивная меланома, если наблюдается проникновение меланоцитов через базальную мембрану в подлежащую дерму [84]. Согласно клиническим и гистологическим признакам выделяют четыре подтипа меланом [85, 86]:

- поверхностно-распространяющаяся меланома. Развитие данного подтипа начинается с горизонтальной или радиальной фазы роста внутри эпидермиса. Вначале появляется как пятно, которое затем медленно превращается в бляшку с множеством цветов и бледными участками регресса. Характерной гистологической особенностью является наличие латерального эпидермального компонента с педжетоидным распространением злокачественных меланоцитов по всему эпидермису;

- узловая меланома, напротив, представляет собой преимущественно экзофитное коричнево-черное образование, часто с эродированной или кровоточащей поверхностью. Данный подтип меланомы характеризуется агрессивной вертикальной фазой роста, при этом горизонтальная фаза отсутствует или имеет очень короткий период. Таким образом, раннее выявление на внутриэпидермальной стадии практически невозможно;

- лентиго меланома возникает на поврежденных солнцем участках тела и часто перерождается из злокачественного лентиго (меланома *in situ*). Данный подтип характеризуется лентигинозным разрастанием атипичных меланоцитов в области дермо-эпидермального перехода и наличием гистологических особенностей солнечного эластоза;

- акральная лентигинозная меланома локализуется в ладонноподошвенной или подногтевой областях. В начальной внутриэпидермальной фазе (которая может быть длительной) наблюдается нерегулярная, плохо ограниченная пигментация, позже появляется узелковая область, соответствующая инвазивной фазе роста.

В прогрессировании меланом (кроме меланом узлового типа) можно выделить две фазы роста: радиальную и вертикальную. Во время фазы радиального роста происходит медленное, но прогрессивное распространение клеток меланомы, ограниченное эпидермисом (*in situ*) или способное к локальной инвазии в сосочковый слой дермы (микроинвазия), но без формирования опухолевого узла [87]. На этой стадии признаки атипии, характерные для большинства злокачественных новообразований, не ярко выражены. Меланоцитарные клетки преимущественно располагаются над базальной мембраной, однако могут распространяться вдоль придатков кожи. Наблюдаются участки педжетоидного распространения неопластических меланоцитов в верхние слои эпидермиса, включая роговой, с формированием фокусов педжетоидного роста. Также происходит формирование различных по размеру и форме гнезд. Как правило, на данной фазе роста, клетки меланомы не отличаются полиморфизмом и имеют единообразную форму. В цитоплазме клеток содержатся пылевидные включения меланина. При инвазии в дерму клетки меланомы, как правило, располагаются по одиночке или формируют гнезда небольшого размера [88].

В ходе дальнейшего прогрессирования происходит смена фазы радиального роста на фазу вертикального роста, сопровождающейся глубокой инвазией всех слоев дермы и нижележащих тканей (рис. 1.4). Происходит формирование отчетливого опухолевого узла, запускается процесс метастазирования. Для меланом на поздних стадиях развития характерно наличие крупных эпителиоидных и веретеновидных клеток. На этой фазе роста меланомы четко выявляется цитологическая атипия и полиморфизм опухолевых клеток. Неопластические меланоциты выявляются во всех слоях

эпидермиса. Размеры гнезд опухолевых клеток в дерме превышают размеры гнезд в эпидермисе. Не происходит «созревания» клеток в глубине дермы, то есть не наблюдается уменьшения их размера, как это происходит в случае доброкачественных невусов с внутридермальным компонентом. Неопластические меланоциты, локализованные в дерме имеют неравномерную пигментацию [89, 90].



стадия 0 стадия I стадия II стадия III стадия IV Рисунок 1.4. Стадии прогрессирования меланомы.

Известно, что при меланоме происходят изменения как клеток эпидермиса, так и его структуры. Толщина эпидермиса уменьшается за счет рогового и зернистого слоев, однако, при этом количество рядов клеток шиповатого слоя увеличивается и развивается акантоз. Клетки эпидермиса, расположенные непосредственно над новообразованием, характеризуются полиморфизмом и изменчивостью размеров. Также встречаются полинуклеарные кератиноциты с различным ядерно-цитоплазматическим соотношением. Происходит нарушение дермоэпидермального перехода с потерей сосочковой структуры. В подлежащей дерме наблюдаются скопления меланофагов [91].

Для пациентов с первичными опухолями без признаков метастазирования 10-летняя выживаемость составляет 75-95%. На основании недавних исследований было выделено несколько наиболее важных гистологических прогностических факторов первичной меланомы без метастазов. Во-первых, вертикальная толщина опухоли (глубина по Бреслоу),

измеренная на гистологическом образце с помощью оптической микрометрической шкалы и определяемая, как гистологическая глубина опухоли от зернистого слоя эпидермиса до самой глубокой точки инвазии. Вовторых, наличие изъязвления, определяемого гистологически, как сочетание следующих признаков: дефект эпидермиса на всю толщину (отсутствие рогового слоя и базальной мембраны), отложение фибрина, наличие нейтрофилов и истончение или реактивная гиперплазия окружающего эпидермиса [92]. В-третьих, митотический индекс, то есть количество митозов в одном квадратном миллиметре [93].

Стоит отметить, что при наличии метастазов 10-летняя выживаемость значительно снижается и составляет 30-50% для пациентов с сателлитными и транзитными метастазами, 69-75% для пациентов с микрометастазами лимфатических узлов и 40-60% для пациентов с клинически очевидными метастазами в регионарные лимфатические узлы [94]. Наличие отдаленных метастазов имеет очень плохой прогноз со средней выживаемостью пациентов 6-9 месяцев.

Таким образом, становится очевидным, что ранняя диагностика меланомы, особенно на стадии *in situ* или ранней инвазии позволит повысить общую выживаемость пациентов.

1.3. Общепринятые подходы к диагностике меланомы

Традиционно диагностика меланомы включает в себя несколько этапов. В первую очередь это клинический визуальный осмотр. Типичными признаками меланомы являются асимметричная форма новообразования, неровные границы, вариабельность окраски, диаметр более 5 мм, узловой характер роста и наличие участков регресса. Чувствительность клинического диагноза, поставленного опытными дерматологами, составляет около 70% [95].

Для уточнения клинического диагноза проводят дерматоскопическое исследование. Одним из первых алгоритмов, разработанных для проведения

дифференциальной диагностики меланоцитарных новообразований, является дерматоскопическое правило ABCD, позволяющее рассчитать общий дерматоскопический индекс (ОДИ) [96]. Данный индекс рассчитывается как сумма критериев (А – асимметрия новообразования, В – резкость пигментированной границы новообразования, С – количество цветов, D – наличие дерматоскопических структур) с учетом их весовых факторов. соответствуют Значения ОДИ меньше 4,75 доброкачественным новообразованиям, больше 5,45 – меланомам. Новообразования, имеющие значения индекса 4.75 5.45 являются ОТ ДО подозрительными (дерматоскопически сомнительными) и подлежат иссечению. Также применяется алгоритм 7 признаков, разработанный Ардженциано. Данный алгоритм основан на бальной оценке больших (атипичная пигментная сеть, бело-голубая вуаль, атипичный сосудистый рисунок) и малых (неравномерные полосы, неравномерная пигментация, неравномерные точки/глобулы, признаки спонтанной регрессии) признаков. Каждый большой признак оценивается в 2 балла, малый – в 1 балл. Если сумма составляет более 3 баллов, то новообразование считается злокачественным [97].

Согласно, проведенному мета-анализу 22 исследований, было установлено, что применение дерматоскопии позволяет повысить 89% диагностическую чувствительности точность И достигнуть И специфичности 79% при диагностике меланомы [15, 98]. Характерными признаками меланомы при дерматоскопическом исследовании являются атипичная пигментная сеть, нерегулярные коричнево-черные точки/глобулы, полоски и пигментация с асимметричным распределением нескольких цветов. В случае инвазивной меланомы также встречаются такие особенности, как и полиморфные сосуды [99, 100]. серо-голубая вуаль Меланомы, локализующиеся на лице имеют свои дерматоскопические особенности: паттерн, гиперпигментированные кольцевидно-гранулярный выходные отверстия волосяных фолликулов, ромбовидные структуры и атипичную [101]. Кроме псевдосеть того, могут проявляться дополнительные

особенности, связанные с индуцированной неоваскуляризацией, такие как, увеличение сосудистой сети и появление красных ромбовидных структур [102].

Однако, существует большая группа сомнительных новообразований для которых чувствительность дерматоскопического исследования составляет 49% [103]. При этом до 80% меланоцитарных новообразований кожи могут быть сомнительными и трудными для диагностики как клинически, так и дерматоскопически [17].

Согласно клиническим рекомендациям Евросоюза, в дополнение к дерматоскопии, в клинических условиях могут быть использованы другие неинвазивные методы, позволяющие повысить точность диагностики сомнительных новообразований [104]. Одним из таких методов является конфокальная отражательная микроскопия. Данный метод использует для построения изображения отраженный исследуемым объектом зондирующий свет. Контраст изображений достигается за счет различий в индексах преломления у органелл и других клеточных и тканевых структур, которые выглядят более светлыми на фоне темных подлежащих структур [105]. В времени изображения ориентированные режиме реального строятся параллельно поверхности исследуемого объекта с разрешением 1 мкм. Данный метод позволяет получать данные о состоянии эпидермиса и верхних слоев дермы на глубину до 350 мкм с разрешением по вертикальной оси 5 мкм [106]. Для получения изображений используется лазерное излучение с одной длиной волны (850 нм) или с несколькими длинами волн (488 нм, 658 нм и 785 нм) и мощностью не более 40 мВт [107, 108].

Получаемые изображения строятся в бело-серо-черной палитре. Структуры, содержащие такие вещества как меланин и кератин, характеризуются сильной способностью к отражению света, поэтому на изображениях имеют высокий уровень сигнала и выглядят ярко-белыми [109]. Напротив, жидкости неотражающие свет, окрашены в черный цвет. Меланин является наиболее эффективным эндогенным контрастным веществом. Таким

образом, диагностика меланоцитарных новообразований с использованием конфокальной отражательной микроскопии основана на свойстве меланина интенсивно отражать свет. Для достижения четкости изображений используется апертура, позволяющая отсечь фоновый свет, идущий из не фокальных плоскостей, и обеспечивающая попадание на детектор только света из фокусной плоскости. Поскольку данная технология является неинвазивной, наблюдение то позволяет проводить многократное новообразований в динамике.

Благодаря высокому разрешению метода можно проводить оценку клеток разных слоев эпидермиса, состояние сосочкового и сетчатого слоев дермы, капилляров и придатков кожи. Конфокальная отражательная микроскопия позволяет оценить размеры клеток, толщину эпидермальных слоев, нарушение стратификации, состояние отдельных волокон верхней части дермы, размеры сосудов [110, 111].

В ряде работ показано, что при доброкачественных меланоцитарных невусах сохраняется архитектоника эпидермальных слоев, а границы кератиноцитов четкие. Меланоциты на изображениях выглядят ярко-белыми и имеют округлые или овальные очертания. В дермальных сосочках, имеющих четкие границы, наблюдаются гнезда одинаковых по размеру и форме меланоцитов [112].

Диспластические меланоцитарные невусы демонстрируют, кроме признаков доброкачественных невусов, также признаки атипии: полиморфные меланоциты увеличенных размеров, гнезда меланоцитов имеют менее четкие границы, кератиноциты теряют контрастность границ [6].

В случае меланомы кожи наблюдается выраженное нарушение архитектуры эпидермиса. Кератиноциты шиповатого слоя теряют четкость границ и изменяются в размере, вследствие чего теряется характерная структура пчелиных сот. Также возможно появление меланоцитов с признаками атипии. Отмечаются гнезда меланоцитов или отдельно лежащие клетки, имеющие крупные дендритные отростки. Меланин в пределах
новообразования распределен неравномерно. Наличие ярких округлых, овальных или дендритных структур, соответствующих атипичным меланоцитам, является признаком инвазивного роста меланомы. Границы дермальных сосочков теряют четкость своих границ, а в их просвете могут обнаруживаться Появляются меланоциты. сосуды, ориентированные параллельно поверхности кожи, что может свидетельствовать об усилении ангиоматоза [113].

Проведенный мета-анализ, показал, что что при диагностике меланомы кожи с использованием конфокальной отражательной микроскопии чувствительность составляет 93%, а специфичность — 76% [114]. Также в ряде исследований было показано, что конфокальная отражательная микроскопия повышает специфичность диагностики дерматоскопических сомнительных меланоцитарных новообразований [115, 116].

Однако, на сегодняшний день гистопатологическое исследование остается «золотым стандартом» в диагностике меланоцитарных новообразований.

Таким образом, становится ясно, что дерматоскопия не в состоянии удовлетворить потребности клиницистов все при диагностике новообразований. меланоцитарных Дерматоскопически сомнительные новообразования, к которым относятся и меланомы на ранних стадиях требуют формирования, использования дополнительных методов исследования, основным из которых сейчас является гистологический анализ. Однако в ряде случаев, обусловленных психоэмоциональным состоянием пациента и локализацией новообразования на лице или в зоне декольте, врач заменяет проведение эксцизионной биопсии на мониторинг изменений новообразования, что может быть фатальным в случае меланомы. Для решения этой проблемы в ряде стран используется отражательная конфокальная микроскопия. Однако, некоторые новообразования (диспластические невусы) способны имитировать меланому, что приводит к ложноположительным ошибкам. Проведение комплексного исследования с

использованием флуоресцентной микроскопии, микроскопии с временным разрешением и оптической когерентной ангиографии позволило бы повысить точность диагностики сомнительных меланоцитарных новообразований.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Объекты исследования

В исследование были включены 59 пациентов с 59 меланоцитарными новообразованиями, проходящих лечение в Университетской клинике ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России. Критериями включения для этого исследования были возраст старше 18 лет, наличие пигментированных новообразований кожи. Критериями исключения были наличие эрозивных или язвенных дефектов на поверхности новообразований, узловая форма меланомы, а также возраст младше 18 лет. Проведенные исследования одобрены Этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Все пациенты, включенные в исследование, и/или их законные опекуны подписывали информированное согласие. Все проведенные исследования были выполнены в соответствии c существующими инструкциями и правилами. Для всех новообразований было проведено стандартное дермоскопическое исследование с расчетом ОДИ [96], согласно общепринятой формуле (3).

$$0ДИ = A \times 1,3 + B \times 0,1 + C \times 0,5 + D \times 0,5$$
(3)

где A – симметрия, B – четкость границ, C – количество цветов, D – количество дерматоскопических структур.

Согласно значениям ОДИ все исследованные новообразования были разделены на 3 группы: доброкачественные меланоцитарные новообразования (n=10) с ОДИ ≤4,75, инвазивные меланомы (n=31) с ОДИ>5,45 и сомнительные новообразования 4,75<ОДИ<5,45. меланоцитарные (n=18)с Bce новообразования были исследованы с помощью многофотонной флуоресцентной томографии, флуоресцентной микроскопии с временным разрешением и оптической когерентной ангиографии, после чего они подвергались эксцизионной биопсии с последующим патоморфологическим

исследованием. Постановка окончательного диагноза была основана на согласии двух сертифицированных патоморфологов и дерматолога.

патоморфологическое 4 Проведенное исследование выявило внутридермальных, 4 смешанных и 2 эпидермальных невуса в группе «доброкачественных новообразований», 11 поверхностно распространяющихся, 10 лентиго меланом и 10 узловых меланом в группе «меланомы». Доброкачественные новообразования располагались на Новообразования конечностях И плечах. ИЗ группы «меланомы» располагались на животе, груди, спине, плечах и конечностях. Медианное значение глубины по Бреслоу для данных меланом составляло 0,8 (0,5; 2,62) мм. Узловые меланомы были исключены из дальнейшего исследования в связи с их морфологическими особенностями и характером развития. В группе «сомнительных новообразований» было выявлено 6 доброкачественных новообразований (2 простых лентиго и 4 диспластических невуса), 6 меланом *in situ* и 6 инвазивных меланом (4 лентиго меланомы и 2 поверхностно распространяющиеся меланомы) с глубиной по Бреслоу 0,61 (0,5; 0,65) мм. Сомнительные новообразования располагались на лице, около молочных желез, в подмышечных впадинах и в поясничной области.

2.2. Методы и методики исследования

2.2.1. Многофотонная томография

микроскопическое Прижизненное исследование выполнено с использованием многофотонного флуоресцентного томографа MPTflex^{тм} (JenLab, Германия). Данный прибор имеет европейский сертификат медицинского оборудования. MPTflexTM оснащен титан-сапфировым фемтосекундным лазером (MaiTai; Spectra Physics, США), перестраиваемой длиной волны в диапазоне 710 – 920 нм, шарнирным держателем с ближней инфракрасной оптикой и сканирующим модулем. Регистрация оптического сигнала осуществляется параллельно ДВУМЯ фотоэлектронными умножителями в диапазонах 373 – 387 нм (сигнал второй гармоники) и 409 –

660 нм (сигнал флуоресценции). Фокусировка зондирующего излучения осуществляется с помощью масляно-иммерсионного объектива ЕС Plan-Neofluar (Carl Zeiss, Германия) 40-кратного увеличения. Размер получаемых изображений составляет 230×230 мкм с разрешением 512×512 пикселей. Время получения одного изображения около 6 секунд. Пространственное разрешение данного прибора составляет менее 1 мкм в латеральной плоскости и 2 мкм в аксиальной. Средняя мощность зондирующего излучения на объекте составляет менее 50 мВт. Для исследования новообразований была выбрана длина волны возбуждения 750 нм, обеспечивающая сильные сигналы эндогенной флуоресценции клеток и генерации второй гармоники от коллагеновых волокон. В ходе исследования получали серию изображений (zstack) параллельных поверхности новообразования на глубину до 150 мкм с шагом между фокальными плоскостями 10 мкм (рис. 2.1 а). Для каждого новообразования получали не менее 5 *z-stack*. Для улучшения восприятия изображения окрашивали псевдоцветами, где красный соответствует сигналу эндогенной флуоресценции, а зеленый – сигналу генерации второй гармоники. С целью минимизации артефактов, вызванных движением исследуемого образца, позиционирование объектива на новообразовании осуществляли с помощью магнитного адаптера с покровным стеклом (рис. 2.1 б). Данный адаптер одной стороной фиксировался на поверхности новообразования двухсторонней клейкой лентой, а другой стороной магнитился к корпусу сканирующей части томографа. Полученные МФТ-изображения подвергались визуальной оценке с целью выявления флуоресцентных особенностей тканей. Кроме того, проводился количественный анализ выделенных флуоресцентных признаков злокачественности с расчётом ММИ.



Рисунок 2.1. Проведение исследования методом многофотонной томографии. Пример получаемого *z-stack* (А) и позиционирование МФТ на поверхности новообразования (Б). Размерная линейка 50 мкм.

2.2.2. Многофотонный микроскопический индекс

Для количественного анализа флуоресцентных признаков злокачественности, выявленных на МФТ-изображениях, был разработан многофотонный микроскопический индекс (ММИ). Индекс основан на суммировании выявленных признаков злокачественности, умноженных на их весовые коэффициенты (уравнение 4). В качестве флуоресцентных признаков злокачественности выбраны полиморфные клетки (ПК), дендритные (ДС), (ПдК), поскольку структуры педжетоидные клетки 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.

$$MMH = \Pi K \times \varphi_{\Pi K} + \mathcal{A}C \times \varphi_{\mathcal{A}C} + \Pi \mathcal{A}K \times \varphi_{\Pi \mathcal{A}K},$$
(4)

Значения коэффициентов ассоциации φ , используемых в качестве весовых факторов признаков, вычислялись с использованием таблиц 2×2 (таблица 2) и уравнений (5, 6, 7).

Таблица 2. Пример заполнения таблицы сопряженности для флуоресцентных признаков злокачественности.

	При	n.*	
	Есть	Нет	111*
Невус	n ₁₁	n ₁₂	$n_{1}*$
Меланома	n ₂₁	n ₂₂	n ₂ *
n*j	$n*_1$	n*2	n

$$\varphi = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}} \tag{5}$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(n_{ij} - n_{ij}^*)^2}{n_{ij}^*}$$
(6)

$$n_{ij}^* = \frac{n_{i*} \, n_{*j}}{n},\tag{7}$$

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 3). По полученным данным вычислили статистику χ^2 для каждого признака: $\chi^2_{\Pi K}$ =23,373; $\chi^2_{\Pi C}$ =12,15; $\chi^2_{\Pi A K}$ =13,83.

Таблица 3. Таблица распределения наблюдаемых и (теоретических) частот флуоресцентных признаков в меланомах и доброкачественных невусах.

	Π	K n:*		ДC		n:*	ПдК		n:*
	Есть	Нет	111	Есть	Нет	111.	Есть	Нет	111.
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: $\varphi_{\Pi K}$ =0,86; $\varphi_{\Lambda C}$ =0,62; $\varphi_{\Pi \Lambda K}$ =0,66.

Таким образом, итоговое уравнение для вычисления ММИ имеет следующий вид:

$$MMH = \Pi K \times 0,86 + \mathcal{A}C \times 0,62 + \Pi \mathcal{A}K \times 0,66$$
(8)

2.2.3. Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением

Для проведения прижизненного исследования времени жизни флуоресценции НАДН использовали многофотонный флуоресцентный томограф MPTflexTM, 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. Размер получаемых изображений составляет 230×230 мкм с разрешением 127×127 пикселей. Мощность возбуждающего излучения составляла не более 30 мВт. Количество детектированных фотонов в пикселе составляло не менее 5000. С целью уменьшения шумового фона и связанных с ним артефактов измерений исследования проводились в темном помещении.

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения SPCImage 7.4 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Кривая затухания флуоресценции для каждого пикселя изображения аппроксимировалась моделью биэкспоненциального затухания (уравнение 9) для получения значений короткой и длинной компонент времени жизни τ_1 , τ_2 , а также значений их относительных вкладов a_1 , a_2 :

$$f(t) = a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2}$$
, где $a_1 + a_2 = 100\%$ (9)

Кроме того, рассчитывались значения среднего времени жизни автофлуоресценции (10):

$$\tau_m = a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2 \tag{10}$$

Расчет значений времени жизни НАДН проводили в цитоплазме клеток путем выделения областей интереса. Отсутствие фотовыгорания было подтверждено мониторингом скорости счета фотонов во время получения Для получения 5000 фотонов для профиля изображения. затухания пространственное объединение пикселей. Качество использовали аппроксимации оценивали по значению χ^2 . Для анализа выбирали участки со значениями данного параметра 0,8-1,4. В первом приближении для НАДН короткая (т₁) компонента обусловлена не связанными с белками молекулами (свободная форма), а длинная (т₂) компонента – молекулами НАДН связанными с белком.

Конструктивно MPTflex^{тм} имеет очень широкий спектральный диапазон регистрации флуоресценции. Кроме того, меланин, содержащийся в клетках пигментированных новообразований, характеризуется спектром нелинейной флуоресценции, сильно перекрывающимся с диапазоном регистрации [117]. Таким образом, данные FLIM представляют собой комбинированный сигнал флуоресценции НАДН и меланина, что осложняет

анализ состояния молекул НАДН. В следствие неравномерного распределения меланина в клетках, при биэкспоненциальной аппроксимации значения времен жизни и их вкладов значительно отличаются в разных участках цитоплазмы клеток. Одни зоны характеризуются значениями типичными для НАДН, в других – значения короткой компоненты составляют около 100 пс, а ее вклад достигает 100%, что более характерно для меланина. Согласно меланинсодержащие литературным данным, клетки характеризуются укороченными временами жизни флуоресценции и значениями вклада короткой компоненты более 90% [33, 62, 65]. Таким образом, для анализа состояния молекул НАДН было необходимо отделить участки богатые биэкспоненциальной меланином. После выполнения аппроксимации, изображения анализировались по значениям вклада короткой компоненты (a_1) . Для наглядности строили изображения, окрашенные в псевдоцвета: красным – для диапазона значений a_1 от 0 до 90% и синим – для a_1 от 90 до 100% (рис. 2.2). Области, содержащие меланин и окрашенные в синий цвет, исключались из анализа.



Рисунок 2.2. Выделение областей, содержащих меланин, по значениям вклада короткой компоненты. Красный цвет соответствует значениям *a*₁ от 0 до 90%, синий – от 90 до 100%. Области, содержащие меланин, окрашены синим цветом.

2.2.4. Оптическая когерентная ангиография

особенностей Исследование сосудистых сетей меланоцитарных новообразований выполнено с использованием скоростного спектрального многофункционального оптического когерентного томографа (рис. 2.3), 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 [118, 119]. В качестве зондирующего излучения используется 1310 поляризованный свет с длиной волны HM, генерируемый суперлюминесцентым диодом. Мощность излучения на объекте составляет 5 мВт. Поперечное разрешение в биологической ткани составляет 25 мкм, разрешение по глубине – 15 мкм.



Рисунок 2.3. Проведение ОКА исследования. Позиционирование ОКА-зонда на пациенте (А) и пример получаемых изображений сосудистого русла (Б).

Прибор позволяет в режиме реального времени получать информацию о рассеивающих и поляризационных свойствах объекта, на основании которой строятся структурные и поляризационные изображения. Одновременно ОКТ позволяет получать информацию о структуре сосудистого русла. В диссертационной работе использованы ангиографические данные.

Для получения данных проводится непрерывное сканирование по полю зрения размером 2,4x2,4 MM. Вдоль быстрой оси сканирования еще 256 А-сканов регистрируются 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 отличие от большинства существующих подходов получения ангиографических данных на основе ОКТ, в данной методике не происходит сканирования одного и тоже участка дважды, что значительно сокращает время получения данных и упрощает управление сканером. В виду технических особенностей реализации использованного прибора, В построении ангиографического изображения участвует каждый второй Вскан.

Традиционно контрастирования для сосудов применяется высокочастотная фильтрация сигнала вдоль медленной оси. В результате этого области объекта, находящиеся в движении во время сканирования, будут иметь более высокую частоту после преобразования Фурье. Применение высокочастотного фильтра прямоугольной формы в частотной области комплексного ОКТ-сигнала позволяет отделить движущиеся области от статичного фона [120, 121]. В использованном приборе реализована другая схема обработки сигнала. Применение высокочастотного фильтра с конечной импульсной характеристикой в области сигнала вместо высокочастотного фильтра прямоугольной формы в частотной области 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. Процесс записи одного ангиографического изображения занимает 26 с, что позволяет оперативно отслеживать возникающие артефакты изображений и своевременно дублировать необходимые изображения.

2.2.5. Количественный анализ ОКА-изображений

В работе использованы алгоритмы, разработанные сотрудниками ИПФ РАН и написанные в среде MATLAB® (The MathWorks Inc., США). Для проведения визуального и количественного анализа сосудистых сетей, полученные с помощью ОКА трехмерные изображения преобразовывали в двухмерные. В качестве алгоритма преобразования использовали проекцию максимальной интенсивности сигнала со всей глубины визуализации. Для количественного анализа каждое двумерное изображение было бинаризовано и скелетизировано [122]. Скелетизированный сосуд представляет собой совокупность пикселей, последовательно расположенных на линии скелета. Для поиска ближайшего соседнего пикселя на скелете сосуда использовался алгоритм k-d деревьев [123]. 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, которых У эти границы перекрывались имели толщину 1 пиксель. С учетом латерального разрешения сканера ОКТ, один пиксель соответствует диаметру сосудов менее 15 мкм.

2.3. 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.

Для признаков злокачественности, выделенных на МФТ-изображениях, оценивалась частота встречаемости каждого признака в доброкачественных новообразованиях, меланомах и сомнительных меланоцитарных новообразованиях. Также для каждого 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. Для этого строится матрица общих дисперсий и ковариаций, а также матрица внутригрупповых дисперсий и ковариаций. С целью определения имеются ли значимые различия между группами (с точки зрения всех переменных) проводится сравнение данных матриц с помощью многомерного F-критерия и расчет значений лямбда-критерия Уилкса. Также при выполнении анализа определялись два независимых линейных дискриминанта (11). Максимальное число функций, используемых в анализе, определяется количеством разделяемых совокупностей за вычетом единицы или числом анализируемых переменных в зависимости от того, какое из этих чисел меньше.

$$d = a + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_n x_n, \tag{11}$$

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

Значения коэффициентов регрессии определяют вклад соответствующих переменных в дискриминацию совокупностей: чем больше

значение коэффициента, тем больше вклад данной переменной. Для работы дискриминантного строили график наглядности анализа анализируемых случаев их линейных распределения по значениям дискриминантов. Общим результатом в оценке качества текущей функции является матрица классификации. Данная матрица содержит число образцов, корректно классифицированных (на диагонали матрицы) и тех, которые попали не в свои совокупности (группы)[124].

Во всех проводимых анализах различия считались статистически значимыми при р <0,05.

Глава 3. Результаты

3.1. Выявление флуоресцентных признаков злокачественных меланоцитарных новообразований

Работа по исследованию меланоцитарных новообразований состояла из нескольких Ha первом проводился визуальный этапов. анализ флуоресцентных изображений неизмененной кожи, доброкачественных меланом. В ходе анализа на изображениях невусов и выделялись флуоресцентные признаки характерные для доброкачественных И новообразований. злокачественных В связи с ЭТИМ анализировали изображения только тех новообразований, которые были диагностированы клинически и не вызывали сомнений у дерматолога [125]. На втором этапе была оценена специфичность выбранных признаков злокачественности и разработан алгоритм их количественного анализа. На третьем этапе проводили визуальный анализ МФТ-изображений меланоцитарных новообразований, которые вызывали сомнения у дерматолога при постановке диагноза, а также количественную оценку признаков злокачественности.

Визуальный анализ МФТ-изображений неизмененной кожи

МФТ-исследование неизмененной кожи человека выявило следующие флуоресцентно-морфологические особенности. Эпидермис характеризуется четко выраженной стратификацией и можно выделить 4 клеточных слоя, начиная от поверхности: роговой, зернистый, шиповатый и базальный. При увеличении глубины визуализации размер клеток уменьшается, а ядерноцитоплазматическое соотношение увеличивается. Роговой слой представлен полигональными безъядерными клетками с гомогенным распределением сигнала автофлуоресценции по клетке (рис. 3.1 А). Для данного слоя также характерно наличие фибриллярных элементов, ориентированных вдоль клеток [126], которые на МФТ-изображениях представлены в виде ярких тяжей, имеющих более высокий сигнал флуоресценции, по сравнению с клетками. Толщина рогового слоя в проведенном исследовании составляла 20±10 мкм.



Рисунок 3.1. Структура неизмененной кожи. МФТ-изображения кератиноцитов рогового слоя (А), зернистого слоя (Б), шиповатого слоя (В), базального слоя (Г), структуры дермо-эпидермального перехода (Д) и соответствующее гистологическое изображение (Е). Масштабная линейка 100 мкм. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

Под роговым слоем располагаются кератиноциты зернистого слоя. На МФТ-изображениях клетки зернистого слоя имеют крупный размер и округлую или овальную форму с четкими границами (рис. 3.1 Б), в отличии от поперечного среза гистологического препарата, где эти клетки имеют веретенообразную форму [127]. Цитоплазма клеток содержит большое количество гранул кератогиалина, для которых характерен высокий уровень флуоресценции. Ядра клеток овальную форму сигнала имеют И характеризуются слабой флуоресценцией, в следствие чего выглядят темными. На глубине около 40 мкм располагаются меньшие по размеру клетки шиповатого слоя, имеющие полигональную форму (рис. 3.1 В). Вокруг темных ядер кератиноцитов шиповатого слоя присутствуют концентрические флуоресценции, структуры высоким сигналом сформированные С кератиновыми филаментами [126]. По всей остальной площади цитоплазмы клеток флуоресценция распределена равномерно. В шиповатом слое визуализируется межклеточное пространство, представленное как темное пространство с очень низким сигналом флуоресценции между яркими Толщина слоя отличается в зависимости от локализации клетками. исследуемого участка. Так над дермальными папиллами она составляет около 20 мкм, а в районе эпидермальных гребней – до 60 мкм. Ниже, на глубине 60-100 мкм, располагается слой базальных кератиноцитов, состоящий из двух групп клеток (рис. 3.1 Г). Клетки обоих групп имеют наименьшие среди кератиноцитов размеры и кубическую форму. Клетки первой групп имеют крупное темное ядро и тонкий ободок флуоресцирующей цитоплазмы. Ко второй группе относятся клетки, имеющие высокий уровень флуоресценции, гомогенно распределенной по клетке. Контуры ядер в таких клетках неразличимы. Высокий уровень флуоресценции клеток обусловлен большим содержанием кератиновых филаментов и меланосом. Данные клетки вероятнее всего являются стволовыми [126]. Кератиноциты, расположенные в пределах одного слоя, имели схожие размеры, форму и интенсивность флуоресценции. Дермо-эпидермальный переход представлен сосочками

дермы и эпидермальными тяжами. Сосочки дермы визуализируются, как области с низким уровнем флуоресценции и высоким уровнем сигнала второй гармоники, окруженные флуоресцирующими клетками (рис. 3.1 Д). Сосочки дермы имеют округлую или слегка овальную форму и увеличиваются в диаметре с глубиной. Дермальные сосочки разделены эпидермальными тяжами, представленными клетками шиповатого слоя. По периметру дермальных сосочков, а также на их вершинах присутствуют клетки с высоким сигналом флуоресценции и его гомогенным распределением. Данные клетки соответствуют кератиноцитам, содержащим меланин, и меланоцитам [128]. Дермальные сосочки, окруженные ободком ярких клеток, называются оконтуренными [129].

Визуальный анализ МФТ-изображений пограничного невуса

В верхних слоях эпидермиса пограничного невуса на ΜΦΤизображениях изменений не обнаружено. Кератиноциты зернистого и шиповатого слоев имеют типичную морфологию (рис. 3.2 А, Б). Однако у части клеток в цитоплазме присутствовали включения с высоким уровнем флуоресценции. В случае сильно пигментированных невусов происходит элиминация меланина через вышележащие слои клеток [130]. Поглощенный кератиноцитами меланин может локализоваться вокруг их ядра, формируя естественную защиту OT ультрафиолетового излучения [131, 132]. Наблюдается изменение дермо-эпидермального перехода, вызванное увеличением эпидермальных выростов. На МФТ-изображениях можно увидеть группы клеток кубической формы с высоким уровнем сигнала флуоресценции, окруженные тонкими тяжами коллагена, визуализируемого по сигналу второй гармоники (рис. 3.2 В). Для пограничных невусов характерно наличие невусных клеток, которые лежат четко очерченными гнездами либо распространяются вдоль нижнего слоя эпидермиса. В зависимости от степени пигментации клетки содержат различное количество

гранул меланина. Также может происходить разрастание эпидермальных выростов [133].



Рисунок 3.2. Структура пограничного невуса. МФТ-изображения кератиноцитов зернистого слоя (А), шиповатого слоя (Б), гнезд невусных клеток в базальном слое (В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм для МФТ и 250 мкм для гистологии. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

Визуальный анализ МФТ-изображений смешанного невуса

Структура зернистого и шиповатого слоев эпидермиса на МФТизображениях смешанного невуса выглядит без изменений. Кератиноциты имеют типичную для своих слоев морфологию (рис. 3.3 А, Б). Для клеток шиповатого слоя характерно наличие включений, имеющих высокий уровень флуоресценции (рис. 3.3 Б). В результате данные клетки имеют серповидную форму, что рядом авторов рассматривается как признак злокачественности [36]. В области дермо-эпидермального перехода визуализируются гнезда, сформированные крупными невусными клетками и окруженные коллагеновыми волокнами (рис. 3.3 Г). Смешанные невусы сочетают в себе признаки, характерные для пограничных и внутридермальных невусов [134]. Для невусных клеток характерно наличие большого темного ядра и тонкого ободка яркой цитоплазмы. Интенсивность флуоресценции невусных клеток определяется концентрацией меланина [135].



Рисунок 3.3. Структура смешанного невуса. МФТ-изображения кератиноцитов зернистого слоя (А), шиповатого слоя (Б), гнезд невусных клеток в папиллярной дерме (В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм для МФТ и 250 мкм для гистологии. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

Визуальный анализ МФТ-изображений внутридермального невуса

Кератиноциты зернистого, шиповатого и базального слоев имеют не измененную морфологическую картину (рис. 3.4 А-В). В шиповатом и базальном слоях присутствуют клетки, имеющие вокруг ядер области с высоким уровнем флуоресценции, обусловленным скоплениями меланина. В следствие присутствия меланина в перинуклеарном пространстве, ядра клеток базального слоя выглядят менее контрастными по сравнению с клетками других слоев. Также среди клеток базального слоя визуализируются клетки, имеющие серповидную форму (рис. 3.4. B). Согласно данным гистологического анализа гнезда невусных клеток располагаются в глубоких слоях дермы (рис. 3.4 Г), что не позволяет визуализировать их с помощью МФТ, так как глубина визуализации ограничена 200 мкм [36].



Рисунок 3.4. Структура эпидермиса при внутридермальном невусе. МФТизображения кератиноцитов зернистого слоя (А), шиповатого слоя (Б),

базального слоя (В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм для МФТ и 250 мкм для гистологии. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом.

Визуальный анализ МФТ-изображений меланомы

При исследовании меланом, диагностированных с использованием дерматоскопии, обнаружены значительные изменения по всей толщине стратификации и эпидермиса. Наблюдается нарушение архитектуры эпидермиса. В роговом слое присутствуют клетки округлой формы, характеризующиеся высоким уровнем флуоресценции гомогенно распределенной по цитоплазме. На больших глубинах исследования (соответствующих зернистому и шиповатому слоям) визуализируются яркие полиморфные клетки неправильной формы. Характерной особенностью меланом является увеличенное межклеточное пространство, которое на изображениях представлено областями с низким уровнем флуоресценции (рис. 3.5 А, Б). Аналогичные изменения были обнаружены в предыдущих исследованиях с использованием конфокальной микроскопии [136] и многофотонной микроскопии [36]. По всей толщине эпидермиса распределены яркие округлые педжетоидные клетки, а также дендритные структуры – клетки с длинными ветвящимися отростками, имеющими высокий уровень сигнала флуоресценции. Данные клетки содержат большое количество меланина и являются типичными для лентиго меланом [137].



Рисунок 3.5. Структура эпидермиса при меланоме. МФТ-изображения атипичных клеток в зернистом слое (А), дендритных структур в шиповатом слое (Б), полиморфных клеток в базальном слое (В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм для МФТ и 250 мкм для гистологии. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом.

В результате нарушения архитектуры эпидермиса четко идентифицировать границы базального слоя невозможно. Кроме того, на глубине, соответствующей этому слою, присутствуют атипичные клетки (рис. 3.5 В). Нарушения также затрагивают дермо-эпидермальный переход. В тех местах, где можно визуализировать сосочки дермы, они окружены клетками, слабый сигнал флуоресценции. имеющими Внутри самого сосочка отсутствует сигнал ГВГ, характерный для коллагена и наблюдаемый в случае неизмененной кожи или доброкачественных невусов. В ряде случаев

дермальные сосочки отсутствуют совсем, что объясняется высокой пролиферативной активностью клеток меланомы, расположенных в эпидермисе, и особенно в дерме [138].

Флуоресцентные критерии злокачественных новообразований на МФТизображениях

Для поиска критериев злокачественности были проанализированы МФТ-изображения двух групп новообразований, которые по клиническим и дерматоскопическим признакам были классифицированы как доброкачественные невусы или меланомы. В качестве дополнительного контроля использовали изображения неизмененной кожи без выраженной пигментации. Качественный анализ проводили во всех слоях эпидермиса, дермо-эпидермальном переходе и папиллярной дерме. Стоит отметить, что на изображениях пигментированных новообразований присутствуют клетки, характеризующиеся высоким уровнем сигнала флуоресценции цитоплазмы в целом или ее отдельных участков. Это обусловлено особенностями синтеза меланина невусными клетками или клетками меланомы И его перераспределением в эпидермисе [139-141]. На основании проведенного анализа были выбраны 6 признаков злокачественности, выявленные в эпидермисе (полиморфные клетки, дендритные структуры, педжетоидные клетки) и дермо-эпидермальном переходе (гнезда, неоконтуренные сосочки дермы и отсутствие сосочков дермы). К полиморфным клеткам относились крупные клетки с высоким уровнем флуоресценции, расположенные в эпидермиса и имеющие причудливые различных слоях формы, не характерные для кератиноцитов (рис. 3.6 А). Согласно данным других подобные исследователей, структуры визуализировались время BO гистологического анализа [142, 143].

Дендритные структуры представлены клетками овальной или звездчатой формы, имеющими яркую цитоплазму и контрастное темное ядро, с ветвящимися отростками (рис. 3.6 Б). Отростки данных клеток могут иметь

как горизонтальное направление, т.е. располагаться внутри одного слоя клеток, так и вертикальное и распространять в вышележащие слои. В работах других исследовательских групп отмечается, что подобные структуры были визуализированы на гистологических изображениях и изображениях, полученных с помощью конфокальной микроскопии [136, 137].



Рисунок 3.6. Флуоресцентные признаки злокачественности. МФТизображения полиморфных клеток (А), дендритных структур (Б), педжетоидных клеток (В), гнезд (Г), неоконтуренных сосочков 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, присутствующие в верхних слоях эпидермиса, имеющие округлую форму и отличающиеся по размеру от кератиноцитов. Данные клетки, в виду большого содержания меланина, характеризуется высоким уровнем сигнала флуоресценции, гомогенно распределенного по цитоплазме. В ряде случаев наблюдается распределение флуорофора по всей площади оптического среза клетки, в результате чего невозможно идентифицировать ядро (рис. 3.6. В). Данные клетки могут присутствовать во всех слоях эпидермиса, включая роговой. Согласно ряду исследований, данные клетки имеют большое значение при диагностике меланомы [144, 145].

В области дермо-эпидермального перехода наблюдается наличие гнезд. Гнезда представлены скоплениями клеток, как правило, имеющих нетипичную морфологию, и отделенными от других клеток капсулой из коллагена (рис. 3.6. Г). Также характерной чертой меланом являлась неоднородная структура дермо-эпидермального перехода, состоящая из неравномерно распределенных сосочков дермы разной формы. Кроме того, у таких сосочков отсутствовал ободок из клеток с высоким уровнем сигнала флуоресценции (рис. 3.6. Д). Пролиферация клеток в области дермоэпидермального перехода приводит к замещению типичной папиллярной структуры и сглаживанию межсосочковых выступов эпителия. В результате на изображениях отсутствуют сосочки дермы (рис. 3.6. Е).

МФТ-изображения 21 меланомы и 10 доброкачественных образований были проанализированы двумя независимыми исследователями на предмет наличия выбранных признаков злокачественности. Для каждого признака рассчитывалась частота встречаемости в каждой группе, а также OR. Согласие

между оценками, сделанными двумя наблюдателями при обнаружении признаков злокачественных новообразований (межэкспертная надежность), было оценено с использованием статистики Каппа Коэна с 95% СІ (таблица 4).

Как видно из таблицы 4, выбранный нами признак «полиморфные клетки» встречается у 90% исследованных меланом и полностью отсутствует в группе доброкачественных невусов. Значение OR составляет 163,8, а значения CI лежат выше единицы, что позволяет говорить о наличии прямой связи данного признака с меланомой с высокой степенью достоверности. Более 71% исследованных меланом характеризуются наличием педжетоидных клеток. Вычисленные значения OR и CI также свидетельствуют о достоверной связи данного признака с наличием злокачественного новообразования.

Таблица 4. Частота встречаемости признаков злокачественности при МФТ-исследовании доброкачественных невусов (n = 10) и инвазивных меланом (n = 21)

Признак	Доброкаче ственные N(%)	Меланомы N(%)	OR	95%CI	р	Интервал для Каппа Коэна
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

Третьим признаком, необнаруженным в доброкачественных невусах и выявленном в 66% меланом, являются дендритные структуры. Данный признак также имеет достоверную связь с меланомой. Оставшиеся три признака (гнезда, неоконтуренные сосочки дермы и отсутствие сосочков

дермы) присутствуют в 50%, 70% и 60% доброкачественных новообразований, соответственно. Вычисленные значения OR и CI подтвердили отсутствие связи данных признаков с меланомами. По литературным данным, в случае меланом, возникающих на хронически поврежденных солнцем участках кожи, методом конфокальной микроскопии в эпидермисе были визуализированы педжетоидные клетки округлой формы и дендритные структуры во всех исследованных новообразованиях [146]. Появление дендритных структур связывают с хроническим воздействием УФ-излучения [147]. В 85% меланом, локализованных на хронически поврежденных солнцем участках кожи, обнаруживаются неоконтуренные сосочки дермы [146]. Они являются важным критерием, позволяющим отличить лентиго меланому от пигментных пятен. Однако площадь участков, содержащих неоконтуренные сосочки дермы, должна быть больше 10% от новообразования [136]. Кроме того, неоконтуренные сосочки дермы могут присутствовать у доброкачественных невусов [148].

3.2. Изучение флуоресцентных особенностей дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований

Эпилюминесцентная микроскопия (дерматоскопия) имеет важное дифференциальной значение диагностики ДЛЯ меланоцитарных новообразований, однако, ее диагностическая точность не достигает 100% [149]. Несмотря на множество разработанных дерматоскопических критериев, существует обширная группа новообразований, которые невозможно однозначно диагностировать. К таким новообразованиям относятся меланомы на начальных стадиях формирования, когда у них еще не проявились характерные признаки, а также диспластические невусы – доброкачественные новообразования, имеющие признаки меланом [104, 150]. Как правило, при исследовании таких случаев решающее значение имеет патоморфологический анализ. В связи с этим ведется поиск новых неивазивных методов исследования, которые позволили бы избежать необоснованных резекций. В

работе был проведен поиск флуоресцентных признаков злокачественности на МФТ-изображениях 18 дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований [151]. Для однозначной классификации данных новообразований использовали патоморфологическое исследование, в результате которого были поставлены следующие диагнозы: простое лентиго, диспластические невусы, неинвазивные меланомы, инвазивные лентиго меланомы и поверхностно распространяющиеся меланомы.

Визуальный анализ МФТ-изображений простого лентиго

На МФТ-изображениях простого лентиго клетки зернистого слоя выглядели неизмененными (рис. 3.7 А). В шиповатом слое присутствовали клетки с высоким уровнем флуоресценции в цитоплазме и контрастным темным ядром (рис. 3.7 Б). Данные клетки также располагались на вершинах дермальных сосочков и вокруг них. Для гистологической картины простого лентиго характерно увеличение количества меланоцитов в области дермоперехода. Увеличение количества эпидермального меланоцитов сопровождается усилением пигментации новообразования за счет накопления меланина в эпидермисе и роговом слое [152]. Дермо-эпидермальный переход представлен вытянутыми структурами, разделенными темными участками, имеющими вид мозговых извилин (рис. 3.7 В), что также характерно для гистологической картины простого лентиго [153]. В некоторых участках дермо-эпидермальный переход представлен не окаймленными сосочками.



Рисунок 3.7. МФТ-изображения простого лентиго. Клетки зернистого слоя (А); яркие ядросодержащие клетки в шиповатом слое (Б); дермоэпидермальный переход в виде мозговых извилин (В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм. На МФТизображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом.

Визуальный анализ МФТ-изображений диспластического невуса

МФТ-изображения диспластического невуса демонстрируют педжетоидный рост ярких округлых клеток в эпидермисе (рис. 3.8 А). Однако стоит отметить, что при гистологическом исследовании педжетоидные клетки выявляются в очень небольшом количестве и расположены локально [154, 155]. В нижних слоях эпидермиса и верхней дерме присутствуют небольшие гнезда вытянутой формы, окруженные коллагеном (рис. 3.8 Б).



Рисунок 3.8. МФТ-изображения диспластического невуса. Педжетоидные клетки в верхних слоях эпидермиса (А), гнезда вытянутой формы в нижних слоях эпидермиса (Б), гнезда в папиллярной дерме (В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

Дермо-эпидермальный переход представлен гомогенными эпидермальными тяжами с утолщениями. В пределах эпидермальных тяжей присутствуют клетки с высоким уровнем автофлуоресценции (рис. 3.8 В). В диспластических невусах отмечаются гнезда невусных клеток на вершинах эпидермальных гребней или их боковых сторонах. В ряде случаев они могут формировать «мостики» между соседними гребнями, что также отмечается в литературе [19, 156, 157]. Визуальный анализ МФТ-изображений внутридермального невуса с атипической пролиферацией меланоцитов

На МФТ-изображениях в верхних слоях эпидермиса данных невусов изменения отсутствовали (рис. 3.9 А). В отдельных участках присутствуют кератиноциты, содержащиеся в цитоплазме включения с высоким уровнем флуоресценции. В базальном слое отмечается разрастание атипичных ярких клеток (рис. 3.9 Б). В зависимости от типа невуса (пограничный, смешанный или внутридермальный) могут отличаться их гистологические признаки [158].



Рисунок 3.9. МФТ-изображения внутридермального невуса с атипической пролиферацией меланоцитов. Клетки шиповатого слоя без изменений (А), разрастание атипичных клеток (стрелки) в базальном слое (Б), нерегулярные по форме и размерам папиллярные выросты дермы (стрелки, В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка

100 мкм. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом.

С одной стороны, наблюдаются вариации в эпидермисе: наличие и степень дисплазии, расположение гнезд и гиперплазия меланоцитов [159]. С другой стороны, изменения затрагивают дермальный компонент, приводя к разрастанию эпидермальных гребней или их слиянию [154]. Дермоэпидермальный переход представлен нерегулярными по форме и размерам папиллярными выростами дермы (рис. 3.9 В). Сосочки дермы не окаймлены или разделены группами ярких клеток.

Визуальный анализ МФТ-изображений меланомы in situ

В ходе визуального анализа МФТ-изображений меланомы *in situ* была выявлена локальная потеря архитектуры эпидермиса. В роговом слое присутствуют яркие полиморфные включения. Для всех слоев кератиноцитов характерно увеличение межклеточного расстояния, а сами клетки имеют нечеткие границы. Крупные педжетоидные клетки округлой формы с четким ядром и высоким уровнем флуоресценции обнаружены в различных слоях эпидермиса (рис. 3.10 А). Кроме того, присутствуют клетки, содержащие в флуоресцентных цитоплазме меланин и имеющие на изображениях серповидную форму (рис. 3.10 Б). Плеоморфные клетки визуализируются во всех слоях эпидермиса. Дермо-эпидермальный переход представлен плохо визуализируемыми папиллярными выростами дермы или сосочками дермы, не имеющими кольца из ярких клеток (неоконтуренные сосочки) (рис. 3.10 В).



3.10. МФТ-изображения меланомы *in situ*. Рисунок Полиморфные включения (стрелка) в роговом слое (А), педжетоидные (желтая стрелка) и серповидные клетки (белая стрелка) в шиповатом слое (Б), неоконтуренные B) папиллярные выросты дермы (стрелки, И соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм. На МФТизображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

Визуальный анализ МФТ-изображений инвазивной лентиго меланомы

Проведено исследование двух форм инвазивных меланом – лентигинозной и поверхностно-распространяющейся. Лентигинозная форма имела те же особенности, что и неинвазивные меланомы. Кроме того, присутствовали клетки, имеющие дендритподобную морфологию (большие и плеоморфные клетки с длинными яркими отростками) (рис. 3.11 A). Новообразования имели неоднородную глубину инвазии. В тех участках, где глубина инвазии меньше глубины визуализации, можно оценить состояние папиллярной дермы (рис. 3.11 Б). В некоторых областях дермы присутствуют меланофаги – крупные клетки без видимого ядра с высоким уровнем флуоресценции (рис. 3.11 В). Также отмечается наличие гнезд в виде вытянутых скоплений плеоморфных меланоцитов.



Рисунок 3.11. МФТ-изображения инвазивной лентиго меланомы. Клетки, имеющие форму дендритов (стрелки) в шиповатом слое (А), атипичные клетки (стрелки) инвазирующие папиллярную дерму (Б), меланофаги (стрелки) в дерме (В) и соответствующее гистологическое изображение (Г). Масштабная линейка 100 мкм для МФТ и 200 мкм для гистологии. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.
Визуальный анализ МФТ-изображений инвазивной поверхностнораспространяющейся меланомы

Поверхностно-распространяющаяся меланома также характеризуется нарушением структуры эпидермиса. В нем присутствуют гнезда крупных клеток с четким ядром и гомогенной яркой цитоплазмой (рис. 3.12 Б). В некоторых участках толщина эпителия увеличена. Педжетоидные клетки имеют в основном округлую форму и располагаются по всей толщине эпидермиса (рис. 3.12 А). Дермо-эпидермальный переход в участках без инвазии характеризуется отсутствием папиллярных выростов дермы или неоконтуренными сосочками дермы. В папиллярной дерме присутствуют атипичные клетки (рис. 3.12 В).



Рисунок 3.12. МФТ-изображения поверхностно-распространяющейся инвазивной меланомы. Круглые педжетоидные клетки в шиповатом слое (стрелки, А), гнезда атипичных клеток в эпидермисе (стрелка, Б), атипичные

клетки в папиллярной дерме (стрелки, В). Масштабная линейка 100 мкм для МФТ и 200 мкм для гистологии. На МФТ-изображениях автофлуоресценция клеток показана красным цветом, сигнал ГВГ от коллагена – зеленым.

В ходе проведенного исследования дерматоскопически сомнительных новообразований было установлено, что в эпидермисе присутствуют атипичные клетки как в гистологически злокачественных, так и в гистологически доброкачественных новообразованиях. Также нарушения в дермо-эпидермальном переходе были выявлены у всех новообразований. Данная проблема также актуальна для гистологического исследования: все гистологические особенности меланомы могут быть обнаружены и в доброкачественных новообразованиях. Таким образом, доброкачественные новообразования могут симулировать меланому и наоборот [160]. Кроме того, относительная значимость этих особенностей может меняться от одного случая к другому [161]. В связи с этим необходимо разработать алгоритм количественного анализа признаков злокачественности на ΜΦΤизображениях, позволяющий дифференцировать доброкачественные И злокачественные меланоцитарные новообразования.

3.3. Количественный анализ флуоресцентных признаков злокачественности

Как МФТ-исследование показало дерматоскопически доброкачественных новообразований и меланом, ни один из выбранных признаков не присутствовал в 100% исследованных меланом, а некоторые признаки также были обнаружены в доброкачественных невусах. Кроме того, коэффициенты межэкспертного согласия для всех признаков имели широкие диапазоны, но приближались к единице (таблица 4). В связи с этим для определения злокачественности новообразований был использован разработанный нами ММИ [162]. Формула для проведения расчета индекса приведена в разделе 2.2.2 главы Материалы и методы. Использование

различных индексов дает более объективный результат и позволяет повысить точность Наиболее широко известным является общий диагностики. дерматоскопический индекс [96]. Также разработан мультифотонный индекс меланомы, основанный на анализе сигналов автофлуоресценции и второй гармоники [163]. Авторы предполагают, что морфологические изменения, такие как атипия клеток, их педжетоидное распространение, наличие гнезд и нарушение дермо-эпидермального перехода, должны коррелировать с гомогенностью сигналов автофлуоресценции и второй гармоники. Однако, в случае пограничных невусов могут наблюдаться схожие изменения, связанные с возрастанием гомогенности сигнала ГВГ. Кроме того, клетки меланоцитарных новообразований синтезируют и экскретируют меланин неодинаково. В связи с этим он распределен в ткани неравномерно [164, 165], что может оказывать влияние на гомогенность сигнала автофлуоресценции. Для расчета разработанного нами индекса оценивается наличие В новообразованиях 3-х признаков: полиморфных клеток, дендритных структур и педжетоидных клеток. Данные признаки были выбраны на основе результатов оценки межэкспертного согласия, для них были вычислены наибольшие коэффициенты. Кроме того, коэффициенты ассоциации этих признаков с меланомой также имели высокие значения.

При выполнении расчета ММИ для дерматоскопически доброкачественных невусов и меланом были получены следующие значения 0(0;0) и 2,14(1,52;2,14), соответственно. Аналогично были проведены расчеты значений ММИ для дерматоскопически сомнительных новообразований (таблица 5).

При анализе рассчитанных значений ММИ была выделена группа из пяти новообразований (таблица 5), имеющих значения меньше единицы: три новообразования (2, 5 и 7) имели значения равные нулю, а два (3 и 9) – 0,66. Согласно гистопатологическому заключению, данные новообразования являлись доброкачественными – простым лентиго и диспластическими невусами. Также к доброкачественным относилось новообразование №13,

имеющее значение ММИ 1,28. Оставшиеся новообразования гистологически диагностированы как инвазивные или *in situ* меланомы, а их значения ММИ были больше 1,5.

N⁰	Признак злокачественности			Знанение
новообразо	полиморфные	дендритные	педжетоидные	мми
вания	клетки	структуры	клетки	IVIIVIII
1	1	1	1	2,14
2	0	0	0	0
3	0	0	1	0,66
4	1	1	1	2,14
5	0	0	0	0
6	1	0	1	1,52
7	0	0	0	0
8	1	0	1	1,52
9	0	0	1	0,66
10	1	1	1	2,14
11	1	1	1	2,14
12	1	0	1	1,52
13	0	1	1	1,28
14	1	1	1	2,14
15	1	0	1	1,52
16	1	0	1	1,52
17	1	1	1	2,14
18	1	0	1	1,52

Таблица 5. Наличие признаков злокачественности и значения ММИ дерматоскопически сомнительных новообразований.

При сравнении значений ММИ всех трех подгрупп сомнительных новообразований по критерию Краскела-Уоллеса было выявлено наличие

достоверных отличий (H=12,77, p=0,0017). Далее было проведено попарное сравнение всех подгрупп, в ходе которого было установлено следующее. Подгруппа доброкачественных новообразований достоверно отличается от подгруппы инвазивных меланом и меланом с инвазией (рис. 3.13). Однако, отличий между двумя подгруппами меланом выявлено не было.



Рисунок 3.13. Количественный признаков анализ злокачественных новообразований с использованием ММИ дерматоскопически y сомнительных новообразований. Данные представлены как медиана, межпроцентильный диапазон 25%-75% и минимум-максимум. Вероятность ошибки (р=0,0013) оценена с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения.

Таким образом, проведение МФТ-исследования с последующим количественным анализом признаков злокачественности позволяет достоверно отличить доброкачественные новообразования от меланом, как уже имеющих инвазию, так и располагающихся полностью над базальной

мембраной. Для определения наличия инвазии была применена оптическая когерентная ангиография.

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

Анализ сосудистого компонента является одним ИЗ ПУНКТОВ дерматоскопического исследования новообразований кожи [166]. При этом происходит оценка их морфологии [167] и характера организации [168]. существует Однако для дерматоскопии ограничение, связанное с гиперпигментацией новообразований, которая не позволяет визуализировать рисунок сосудистых сетей. Для решения этой проблемы может быть использована ОКА. Аналогично дерматоскопии, плоскость визуализации ОКА ориентирована параллельно поверхности кожи. В связи с этим сосуды, расположенные вдоль поверхности кожи, визуализируются в виде линий, а сосуды, расположенные перпендикулярно к ней, представлены в виде точек или узлов.

При проведении исследования методом ОКА на первом этапе были изучены особенности сосудистых сетей меланоцитарных новообразований, не вызывающих трудности при постановке диагноза с использованием дерматоскопии.

Визуальный и количественный анализ ангиографических изображений доброкачественных невусов

При визуальном анализе микроангиографических изображений доброкачественных невусов выявлены сосудистые сети, состоящие из равномерно ветвящихся сосудов, формирующих регулярные сети (рис. 3.14 А, Б). Сосуды в основном имеют прямолинейную структуру, только в случае внутридермальных невусов она меняется на структуру «точек» и «запятых» (рис. 3.14 В). В предыдущих исследованиях было показано, что сосуды в виде

«точек» и «запятых» встречались при внутридермальных невусах в 15% и 65% случаев, соответственно [167]. Также в случае внутридермальных невусов обнаружены крупные слегка изогнутые и незначительно ветвящиеся сосуды [169]. В ряде случаев врожденных невусов визуализируются сосуды змеевидной формы [170]. Аналогичные сосуды обнаружены нами на ОКА-изображениях пограничных и смешанных невусов (рис. 3.14 А, Б). Стоит отметить, что пограничный невус обладает удивительной особенностью – у него отсутствует дермальный компонент, но при этом очень высокая плотность сосудов. Данная особенность была отмечена и ранее при проведении исследований гистологических препаратов [171].



Рисунок 3.14. ОКА-изображения микроциркуляторного русла доброкачественных меланоцитарных новообразований. Регулярные сосудистые сети пограничный (А) и смешанный невусов (Б), и структура «точек» и «запятых» внутридермального невуса (В). Масштабная линейка 1 мм.

Результаты количественного анализа ОКА-изображений демонстрируют, что данные типы новообразований различаются по плотности сосудистых сетей: так наибольшая плотность отмечается в случае пограничных невусов, а наименьшая – внутридермальных невусов (таблица 6). Суммарные длины тонких (меньше 15 мкм) и толстых (больше 50 мкм) сосудов не отличаются между собой у каждого типа невуса. Проведение статистического анализа не выявило достоверных отличий между различными типами доброкачественных невусов по исследованным характеристикам сосудистых сетей.

Таблица 6. Результаты количественной обработки ОКА-изображений доброкачественных невусов и инвазивных меланом

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

Визуальный и количественный анализ ангиографических изображений инвазивных меланом

Визуальный анализ ОКА-изображений меланоцитарных новообразований, диагностированных дерматоскопически как меланомы, выявил следующие особенности сосудистого рисунка. Сосудистые сети сформированы толстыми сосудами, имеющими извитую структуру (рис. 3.15 А). Также сосуды меланомы характеризуются нерегулярным разветвлением с формированием атипичных сетей с высокой плотностью сосудов (рис. 3.15 Б).



Рисунок 3.15. ОКА-изображения микроциркуляторного русла инвазивных меланом. Плотная сосудистая сеть (А), большое количество толстых сосудов (Б) и извитые сосуды (В) показаны стрелками. Масштабная линейка 1 мм.

Известно, что нерегулярные линейные сосуды, выявленные при дерматоскопическом исследовании, является важным критерием, указывающим на наличие меланомы [167]. Также ряд авторов выделяет сосуды в виде петель [169] и атипичные полиморфные сосуды [172], как характерные для меланомы. Процесс формирования новой сосудистой сети из ранее существовавших кровеносных сосудов считается важным для обеспечения питательными веществами и кислородом быстрорастущих опухолей таких, как меланома, а также для формирования путей метастазирования опухолевых клеток [173]. Быстро протекающий ангиогенез случае меланомы является неблагоприятным фактором, поскольку В способствует прогрессированию новообразования и резко увеличивает риск летального исхода [174]. Ускоренный ангиогенез приводит к формированию сосудов с неполноценными стенками и с высокой степенью ветвления [175]. Меланома продуцирует ряд факторов, которые способны запускать процесс ангиогенеза [176], даже в случае имплантации кусочка опухоли человека в защечный мешок хомяка [177]. В исследованиях на пациентах, а также в экспериментах на животных было установлено, что плотность сосудистой сети увеличивается в процессе роста опухоли и формирования инвазии [178, 179].

Результаты количественного анализа ОКА-изображений демонстрируют, что плотность сосудистой сети инвазивных меланом достоверно выше (p=0,00009), чем у доброкачественных новообразований (таблица 6). 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.

Визуальный и количественный анализ ангиографических изображений дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований

Согласно гистологическому исследованию среди дерматоскопически новообразований сомнительных меланоцитарных присутствовали доброкачественные (простое лентиго, диспластический невус И внутридермальный невус с признаками атипии), меланомы in situ (лентиго меланома) и инвазивные меланомы (лентиго меланома и поверхностнораспространяющаяся меланома). Визуальный анализ ОКА-изображений сомнительных новообразований показал, что новообразования с разным диагнозом имеют различную структуру сосудистой сети [180]. Простое лентиго характеризуется регулярной сосудистой сетью, сформированной линейными сосудами (рис. 3.16 А). В случае диспластического невуса сосудистая сеть представлена тонкими изогнутыми или точечными сосудами (рис. 3.16 Б). Внутридермальный невус с атипической пролиферацией меланоцитов имеет плотную сосудистую сеть, образованную утолщенными извилистыми сосудами (рис. 3.16 **B**). Неинвазивные меланомы характеризуются нерегулярной сосудистой сетью, состоящей из толстых и небольшого количества тонких извилистых сосудов (рис. 3.16 Г). На ОКАизображениях инвазивная лентиго меланома характеризуется нерегулярно разветвленной сосудистой сетью, состоящей из плотно расположенных толстых извитых сосудов с высокой плотностью (рис. 3.16 Д). Схожий сосудистый рисунок инвазивной поверхностновыявлен У распространяющейся меланомы (рис. 3.16 Е).



3.16. ОКА-изображения Рисунок микроциркуляторного русла дерматоскопически сомнительных новообразований. Линейные сосуды простого лентиго (А), точечные сосуды диспластического невуса (Б), утолщенные сосуды внутридермального невуса с атипической пролиферацией меланоцитов (В), нерегулярная сосудистая сеть меланомы in situ (Γ), нерегулярно разветвленная сеть из толстых извитых сосудов инвазивных форм лентигинозной (Д) и поверхностно-распространяющейся (Е) меланом. Масштабная линейка 1 мм.

Согласно результатам других исследований, ангиографический рисунок диспластического невуса сходен с доброкачественными невусами - в нем преобладают сосуды в виде «точек» и «запятых» [167]. Ряд исследователей предполагает, что меланома может возникать из доброкачественных невусов проходя через последовательные стадии трансформации и, в конечном счете, формируя инвазивный компонент. В ходе такой трансформации происходит усиление ангиогенеза и, соответственно, увеличение плотности сосудов [174]. Дерматоскопически сомнительные новообразования были сгруппированы в

патоморфологическому подгруппы согласно три диагнозу: доброкачественные, меланомы in situ и инвазивные меланомы. Затем был проведен количественный анализ ОКА-изображений. Согласно полученным доброкачественные новообразования характеризовались результатам наименьшими значения плотности сосудистой сети 0,0501 (0,0477;0,0505), и были сопоставимы с таковыми значениями для меланом in situ 0,0585 (0,05273;0,05989).При проверке статистически значимых отличий С Краскела-Уоллиса использованием критерия значение достоверности составило р=0,005. Плотность сосудистой сети инвазивных меланом была достоверно выше в 1,2 и 1,4 раза по сравнению с меланомой *in situ* (p=0,005) и доброкачественными новообразованиями (р=0,005), соответственно (рис. 3.17 A).



Рисунок 3.17. Результаты количественной обработки ОКА-изображений дерматоскопически меланоцитарных новообразований. сомнительных Плотность сосудистой сети (А) и суммарная длина тонких и толстых сосудов (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 Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения.

Как видно из диаграммы (рис. 3.17 Б) увеличение плотности сосудов происходит за счет возрастания количества толстых сосудов. Достоверное увеличение суммарной длины толстых сосудов в 2,4 раза наблюдалось у инвазивных меланом по сравнению с доброкачественными новообразованиями (p=0,005). Увеличение количества толстых сосудов также наблюдается при меланомах *in situ*, однако данные изменения недостоверны. Кроме того, в случае инвазивных меланом происходит достоверное увеличение в 2 раза (p=0,005) суммарной длины тонких сосудов по сравнению с неинвазивными меланомами.

3.5. Оценка возможностей комбинированного использования флуоресцентных и ангиографических признаков для определения злокачественных новообразований

Поскольку ММИ позволяет дифференцировать доброкачественные новообразования от меланом, а количественный анализ сосудистых сетей способен определить наличие инвазии, то логично предположить, что совместное использование этих критериев даст возможность дифференцировать сомнительные меланоцитарные новообразования на доброкачественные, меланомы in situ и инвазивные меланомы. Для этого, а также с целью определения какой из использованных методов исследования вносит больший вклад в различение трех подгрупп дерматоскопически сомнительных новообразований, был проведен дискриминантный анализ. Статистика Уилкса лямбда является стандартом обозначения мощности дискриминации в используемой модели. Ее значения меняются от 0 (дискриминация в 100% случаев) до 1 (отсутствие дискриминации). По результатам анализа было установлено, что значение статистики Уилкса лямбда составляет 0,02524 при уровне р=0,00000. Затем была проведена оценка вкладов каждого из анализируемых параметров. Как видно из первого столбца таблицы 7, все оцениваемые параметры вносят существенный вклад в различение трех подгрупп дерматоскопически сомнительных

новообразований. Однако при анализе одиночного вклада (частная лямбда Уилкса) каждой из оцениваемых переменных было выявлено, что значения ММИ и плотности сосудистой сети обладают большей мощностью, что также подтверждается уровнем ошибки значительно меньшее 0,05 для этих переменных.

	Лямбда Уилкса	Частна я лямбда Уилкса	F- включи ть	р- уровень	Толера нтность	R- квадрат
ММИ	0,110663	0,228097	20,30462	0,000141	0,747529	0,252471
Плотность сосудов	0,042527	0,593549	4,10869	0,043726	0,653179	0,346821
Суммарная длина сосудов диаметром ≤15 мкм	0,038749	0,651425	3,21058	0,076416	0,528305	0,471695
Суммарная длина сосудов диаметром ≥50 мкм	0,031057	0,812762	1,38224	0,288257	0,884261	0,115739

Таблица 7. Итоги анализа дискриминантных функций.

Поскольку в исследовании необходимо разделить три группы дерматоскопически сомнительных новообразований, то для проведения их дискриминации были определены два независимых линейных дискриминанта. Для каждого из них были рассчитаны коэффициенты регрессии (таблица 8). Известно, что чем больше значение коэффициента регрессии, тем больше вклад переменной в дискриминацию исследуемых совокупностей.

Как видно из таблицы 8, наибольший вклад в первый линейный дискриминант вносят значения ММИ и плотности сосудистой сети. Второй линейный дискриминант определяется вкладами суммарной длины тонких

сосудов и значениями ММИ. Для наглядного представления о том, как две выбранные функции дискриминируют исследуемые группы, был построена диаграмма распределения индивидуальных значений (рис. 3.18).

	Линейный дискриминант 1	Линейный дискриминант 2
ММИ	-0,88784	0,693656
Плотность сосудов	-0,80591	-0,158156
Суммарная длина сосудов диаметром ≤15 мкм	0,48501	-0,845616
Суммарная длина сосудов диаметром ≥50 мкм	-0,30533	-0,450061
Собственное значение	14,23942	1,599616
Накопленный процент	0,89901	1,000000

Таблица 8. Коэффициенты регрессии линейных дискриминантов.

Как видно из диаграммы, линейный дискриминант 1, наилучшим образом дискриминирует доброкачественные новообразования от объединенных совокупностей меланом *in situ* и инвазивных меланом. Также по оси первой функции имеется небольшой сдвиг точек меланом *in situ* относительно инвазивных форм. По оси линейного дискриминанта 2 имеется сдвиг точек меланом *in situ* относительно инвазивных форм. И относительно инвазивной меланомы и доброкачественных новообразований.



Рисунок 3.18. Диаграмма распределения дерматоскопически сомнительных новообразований в соответствии с их индивидуальными значениями двух линейных дискриминантов.

Для проверки, как хорошо выбранные функции классифицируют дерматоскопически сомнительные новообразования, была построена матрица классификации (таблица 9).

Группа	Процент корректных	Доброкачест венные	Меланома <i>in situ</i>	Инвазивная меланома
Доброкачестве нные	100	6	0	0
Меланома <i>in situ</i>	100	0	6	0
Инвазивная меланома	100	0	0	6
Всего	100	6	6	6

Таблица 9. Матрица классификации дерматоскопически сомнительных новообразований (n=18).

Поскольку в каждой группе было по 6 новообразований, то априорные вероятности для каждой из них одинаковы и равны 0,33333. Как видно из таблицы, корректная классификация была выполнена для каждой группы в 100% случаев.

Таким образом, комбинированное использование многофотонной томографии и оптической когерентной ангиографии с последующим количественным анализом изображений для исследования дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований позволяет дискриминировать доброкачественные новообразования, меланомы *in situ* и инвазивные меланомы.

3.6. Исследование меланоцитарных новообразований методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии

Исследование доброкачественных невусов и меланом методом времяразрешенной флуоресцентной микроскопии

В работы проводили ходе анализ среднего времени жизни флуоресценции НАДН и относительный вклад длинной компоненты для клеток, расположенных в разных слоях эпидермиса, из пяти несмежных участков новообразования. Для анализа характеристики времени жизни флуоресценции выбирали участки, соответствующие цитоплазме клеток. Обнаружено, что клетки меланоцитарных новообразований делятся на две группы соответствии значениями В co среднего времени жизни флуоресценции. В первой группе флуоресценция клеток имела низкие значения среднего времени жизни. Так в случае доброкачественных новообразований для клеток зернистого, шиповатого и базального слоев были получены следующие значения: 553±158 пс, 586±268 пс и 156±17 пс. В случае меланомы, среднее время жизни флуоресценции было еще ниже и составляло 285 ± 120 пс для клеток зернистого слоя, 422 ± 143 пс для шиповатого и 432 ± 86 пс для базального слоя. В случае доброкачественных новообразований эти клетки локализовались в базальном слое или в пределах невусных гнезд.

Также в различных слоях эпидермиса были отмечены кератиноциты, содержащие в цитоплазме включения с характерными временами жизни флуоресценции. В случае меланом, такие клетки имели атипичную форму и были обнаружены во всех слоях эпидермиса. Клетки этой группы в отличие от клеток новообразования характеризовались других высоким уровнем интенсивности флуоресценции. Также было установлено, что флуоресценция клеток этой группы характеризовалась низкими значениями относительного вклада длинной компоненты. Клетки базального слоя доброкачественных новообразований и меланом имели значения от 4% до 13 %. Выявленные особенности данных клеток в первую очередь связаны с накоплением и синтезом в них меланина. Известно, что меланин в составе меланосом транспортируется из меланоцитов в окружающие кератиноциты [181-183], а также может секретироваться во внеклеточное пространство с последующим фагоцитозом эпителиальными клетками [184]. Флуоресценция меланина имеет короткие времена жизни и низкие значения относительного вклада длинной компоненты [185]. Вторая группа клеток характеризовалась значениями среднего времени жизни флуоресценции и относительного вклада длинной компоненты сопоставимыми с данными, описанными в литературе для НАДН клеток кожи [117]. В ходе дальнейшей работы проводили анализ параметров флуоресценции для клеток из второй группы.

При исследовании доброкачественных невусов (пограничного, смешанного и внутридермального), диагностированных дерматоскопически, были обнаружены следующие закономерности изменения параметров флуоресценции. Значения среднего времени жизни флуоресценции имеет тенденцию к снижению при переходе от клеток зернистого слоя к клеткам базального (рис. 3.19). Кроме того, наблюдалось незначительное снижение среднего времени жизни флуоресценции в зернистом и шиповатом слоях в зависимости от глубины локализации гнезд невусных клеток.



Рисунок 3.19. FLIM-изображения, демонстрирующие распределение среднего времени жизни (тт) флуоресценции в клетках разных слоев эпидермиса при доброкачественных невусах. Размерная линейка 100 мкм. Цветовой диапазон: 100 пс (красный) – 1600 пс (синий).

В случае пограничных невусов, клетки зернистого слоя эпидермиса имели наибольшие значения среднего времени жизни флуоресценции (1475±163 пс). При внутридермальных невусах значение было ЭТО и составляло 1010±90 пс (рис. 3.20 минимальным А). Изменения относительного вклада длинной компоненты носили разнонаправленный характер (рис. 3.20 Б). В случае пограничного невуса, для клеток зернистого слоя было зафиксировано значение вклада длинной компоненты меньше, чем

базального смешанного слоев. Для для клеток шиповатого И И наблюдалось внутридермального невусов снижение вклада длинной компоненты на 3% – 7% при увеличении глубины исследования. Также стоит отметить, что значения вклада длинной компоненты во всех слоях эпидермиса пограничных невусов были ниже по сравнению с аналогичными слоями других доброкачественных невусов.



Рисунок 3.20. Параметры времени жизни флуоресценции клеток в разных слоях эпидермиса при доброкачественных меланоцитарных новообразованиях. А – диаграмма изменения среднего времени жизни флуоресценции; Б – диаграмма изменения относительного вклада длинной компоненты.

При исследовании меланом, диагностированных дерматоскопически, наблюдались обширные участки нарушения морфологической структуры эпидермиса, а также присутствие атипичных клеток во всех его слоях. Было установлено, что среднее время жизни флуоресценции имело градиент значений по глубине новообразования, как и в случае доброкачественных невусов (рис 3.21). Однако, значения тт были значительно ниже в сравнении с таковыми для доброкачественных невусов и составляли 970±104 пс для клеток, расположенных на глубине зернистого слоя, 762±109 пс для клеток на уровне шиповатого слоя и 701±188 пс для клеток на глубине базального слоя (рис 3.21 Б). Снижение среднего времени жизни может быть обусловлено уменьшением относительного вклада длинной компоненты. Так в ходе анализа было обнаружено, что, в случае меланомы клетки всех слоев эпидермиса характеризуются более низкими значениями вклада длинной компоненты, по сравнению с аналогичными слоями доброкачественных невусов [186]. Так значения параметра а2 для клеток зернистого, шиповатого И базального слоев составляют 22,6±3,3%, 20,4±1,1% и 17,4±3,2%, соответственно. Таким образом, при увеличении глубины исследования происходит снижение относительного вклада длинной компоненты на 5% (рис 3.21 B).



Рисунок 3.21. Параметры времени жизни флуоресценции клеток в разных слоях эпидермиса при меланомах. А – изображения, демонстрирующие распределение среднего времени жизни (тт) флуоресценции; Б – диаграмма изменения среднего времени жизни флуоресценции; В – диаграмма изменения относительного вклада длинной компоненты. Размерная линейка 100 мкм. Цветовой диапазон: 100 пс (красный) – 1600 пс (синий).

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.

Исследование дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии

Согласно патоморфологическому исследованию дерматоскопически сомнительные новообразования были диагностированы как простое лентиго, диспластические невусы, меланомы *in situ* и инвазивные меланомы. В ходе исследования было установлено, что изменения значений среднего времени

жизни в зависимости от глубины исследования носили разнонаправленный характер (рис. 3.22).



Рисунок 3.22. FLIM-изображения, демонстрирующие распределение среднего времени жизни (тm) флуоресценции в клетках разных слоев эпидермиса дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований – простого лентиго и диспластического невуса. Размерная линейка 100 мкм. Цветовой диапазон: 100 пс (красный) – 1600 пс (синий).

В случае простого лентиго значения тт для зернистого и шиповатого слоев не отличались и составляли 1062 ± 152 пс и 1124 ± 53 пс, тогда как в базальном слое достоверно снижались до 739 ± 229 пс (рис. 3.23 A). Уменьшение среднего времени жизни флуоресценции происходит за счет снижения относительного вклада длинной компоненты с $30,6\pm1,1\%$ для шиповатого слоя до $21,4\pm6,7\%$ для базального слоя (рис. 3.23 Б). В случае простого лентиго происходит разрастание меланоцитов в базальном слое с тотальным замещением кератиноцитов [187]. В атипичных меланоцитах

нарушена система передачи синтезированного меланина окружающим клеткам, в результате чего происходит его накопление в меланоцитах [188]. Большое содержание меланина в клетках затрудняет проведение анализа времени жизни НАДН, поскольку время жизни короткой компоненты флуоресценции меланина составляет не более 200 пс [51] и сопоставимо с функцией отклика прибора. При этом интенсивность его флуоресценции имеет высокий уровень. Все это в конечном итоге приводит к снижению среднего времени жизни флуоресценции и снижению относительного вклада длинной компоненты.



Рисунок 3.23. Параметры времени жизни флуоресценции клеток в разных слоях эпидермиса дерматоскопически сомнительных меланоцитарных новообразований – простого лентиго и диспластического невуса. А – диаграмма изменения среднего времени жизни флуоресценции; Б – диаграмма изменения относительного вклада длинной компоненты.

Анализ данных для диспластического невуса показал, что значения среднего времени жизни флуоресценции не изменялись при увеличении глубины исследования и составляли 990±298 пс для клеток зернистого слоя, 991±106 пс – шиповатого слоя и 939±125 пс - базального слоя (рис. 3.23 А). Значения относительного вклада длинной компоненты возрастали с увеличением глубины исследования на 3,4% (рис. 3.23 Б).

В ходе исследования было установлено, что дерматоскопически сомнительные меланомы *in situ* и инвазивные меланомы имели значения измеряемых параметров времени жизни флуоресценции сходные с таковыми у меланом, диагностированных дерматоскопически.

Установлено, что у всех исследованных новообразований среднее время жизни флуоресценции клеток базального слоя имеет более низкие значения по сравнению с клетками других слоев эпидермиса. Данная особенность может быть обусловлена наличием меланоцитов в данном слое и их активным синтезом меланина. Поскольку флуоресценция меланина имеет короткие времена жизни, то его наличие приводит к снижению среднего времени жизни флуоресценции. Кроме того, ДЛЯ большинства исследованных новообразований наименьшее значение относительного вклада длинной компоненты было характерно для клеток базального слоя. В базальном слое эпителия кожи расположены способные к делению кератиноциты, которые поддерживают постоянное обновление и восстановление повреждений кожи. Из предыдущих исследований известно, что у активно пролиферирующих клеток происходит интенсификация гликолиза [189, 190]. Усиление гликолиза сопровождается возрастанием относительного вклада короткой компоненты и снижением вклада длинной [12, 191]. Согласно формуле расчета среднего времени жизни флуоресценции, снижение его значений происходит при снижении относительного вклада длинной компоненты. Исходя из этого сравнение исследованных новообразований по параметрам времени жизни флуоресценции клеток базального слоя может давать ложные результаты. Также стоит отметить, что клетки зернистого слоя в ходе жизненного цикла накапливают в своей цитоплазме большое количество гранул кератогиалина [192], который может быть источником артефактов при измерении параметров флуоресценции. Исходя из этого сравнение параметров времени жизни флуоресценции исследованных новообразований проводили в клетках шиповатого слоя. Установлено, что при меланоме клетки, расположенные на уровне шиповатого слоя, имеют значения среднего времени жизни

(762±109 флуоресценции достоверно ниже пс), чем клетки В доброкачественных новообразованиях (наименьшее значение 900±124 пс в случае пограничного невуса). Значения относительного вклада длинной компоненты также были ниже при меланоме (20,4±1,1%), чем при доброкачественных новообразованиях (22,4±2,4% в случае пограничного Низкие измеренных невуса). значения параметров времени жизни флуоресценции могут быть связаны с наличием активно делящихся клеток меланомы в шиповатом слое эпидермиса, а также с изменением метаболизма кератиноцитов. В фазе радиального роста меланомы происходит педжетоидное распространение неопластических меланоцитов в верхние слои эпидермиса [87]. Ранее было показано, что меланома способна индуцировать гиперплазию эпителия [193, 194]. Кроме того, в кератиноцитах изменяется экспрессия цитокератинов 8, 10, 14 и 19, и виментина, формирующих цитоскелет. Основную роль в воздействии клеток меланомы на кератиноциты отводят фактору роста фибробластов 2, хемокину CXCL1, интерликину 8 и фактору роста эндотелия сосудов А [195].

Поскольку дерматоскопически при сомнительных меланомах наблюдаются локальные нарушения эпидермиса, то неопластические меланоциты были обнаружены не во всех исследованных участках. В демонстрируют полях флуоресценции некоторых клетки параметры характерные для кератиноцитов здоровой кожи, в других – присутствуют среднего времени клетки меланомы с низкими значениями жизни флуоресценции и вклада длинной компоненты.

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. Установлено, что клетки меланоцитарных новообразований характеризуются гетерогенностью времени жизни флуоресценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени накоплено большое количество информации о возможности использования оптических методов для изучения и диагностики заболеваний кожи, включая меланоцитарные новообразования и меланому. При этом большая часть исследований основана на применении одного метода, а объектом изучения являются новообразования, не вызывающие трудностей диагностики при дерматоскопическом исследовании.

Данная диссертационная работа впервые демонстрирует возможность комбинированного использования методов многофотонной томографии, оптической когерентной ангиографии и флуоресцентной микроскопии с временным разрешением для качественного и количественного анализа признаков злокачественности меланоцитарных новообразований. С помощью МФТ было выделено 6 флуоресцентных признаков злокачественных новообразований в эпидермисе (полиморфные клетки, дендритные структуры, педжетоидные клетки) и в дермо-эпидермальном переходе (гнезда, неоконтуренные сосочки дермы, отсутствие сосочков дермы), которые согласуются с предыдущими исследованиями [36]. Однако, было установлено, что три из них (гнезда, неоконтуренные сосочки, отсутствие сосочков дермы) встречались также в доброкачественных новообразованиях и имели значения коэффициента ассоциации с меланомой ниже 0,25. Для других признаков (полиморфные клетки, дендритные структуры, педжетоидные клетки) значения коэффициентов ассоциации были больше 0,6, но не достигали единицы. Это означает, что они также встречаются в доброкачественных новообразованиях. Впервые для количественной оценки флуоресцентных злокачественности был разработан ММИ, признаков позволяющий объективизировать результаты. В отличии от индекса, разработанного ранее группой ученных под руководством М. Balu [163], ММИ не зависит от флуктуаций мощности лазерного излучения, используемого для получения изображений, а также от характера распределения флуорофоров в клетках и ткани. В отличии от предыдущих исследований, эффективность работы

выявленных флуоресцентных признаков и ММИ была протестирована на группе новообразований, которые имели трудности при диагностике с использованием дерматоскопии. Было показано, что для доброкачественных новообразований значения ММИ составляли ≤1,28, а для меланомы (*in situ* и инвазивные) >1,28.

Известно, что прогрессирование опухолей связано с усилением ангиогенеза. Поэтому в настоящей работе были проведены исследования структуры микроциркуляторного русла меланоцитарных новообразований пациентов с использованием ОКА. На ОКА-изображениях были выявлены качественные ангиографические признаки злокачественных новообразований. меланом было характерно наличие густой и нерегулярно Так для разветвленной сосудистой сети, состоящей из толстых извитых сосудов, что хорошо согласуется с предыдущими исследованиями [70, 71]. Впервые был проведен количественный анализ ОКА-изображений сосудистых сетей меланоцитарных новообразований пациентов и определены значения плотности сосудистой сети, а также суммарные длины тонких и толстых сосудов. Было установлено, что доброкачественные невусы имеют плотность сосудистой сети значительно меньше, чем инвазивные меланомы. Для меланом из группы дерматоскопически сомнительных новообразований было показано, что у инвазивных меланом плотность сосудистой сети в 1,2 раза выше, чем у меланом *in situ*.

С использованием дискриминантного анализа было впервые установлено, что комплексный подход с использованием флуоресцентных и ангиографических признаков, рассчитанных по ним значениям ММИ, а также плотности И длин сосудов, позволяет достоверно разделить дерматоскопически сомнительные меланоцитарные новообразования на доброкачественные, меланомы *in situ* и инвазивные меланомы.

Проведен анализ времен жизни флуоресценции клеток меланоцитарных новообразований. Установлено, что клетки новообразований характеризуются гетерогенностью времен жизни флуоресценции. В новообразованиях

присутствуют клетки с параметрами времени жизни флуоресценции характерными для НАДН, а также клетки с низкими значениями среднего времени жизни флуоресценции (порядка 700 пс) и высокими значениями вклада короткой компоненты (более 90%). Короткие времена жизни флуоресценции таких клеток определяются высоким содержанием в них меланина. В предыдущем исследовании с использованием FLIM основное диагностическим внимание уделялось ЭТИМ клеткам, как признакам злокачественных меланоцитарных новообразований [63]. В данной работе было показано, что клетки с короткими временами жизни флуоресценции присутствуют и в доброкачественных новообразованиях. При анализе клеток с временами жизни, характерными для НАДН, впервые было показано, что клетки меланом, как *in situ*, так и инвазивных, имели более низкие значения среднего времени жизни флуоресценции и вклада длинной компоненты, по сравнению с клетками доброкачественных новообразований. Полученные данные хорошо согласуются с данными для экспериментальных опухолей [12] и опухолей человека другого генеза [60] и связаны с изменениями метаболизма клеток [189]. Однако стоит отметить, что среди этих клеток в пределах опухоли наблюдалась значительная гетерогенность времени жизни флуоресценции, вызванная неравномерным распределение меланина в ткани, а также морфологическими особенностями меланомы.

В заключении, совокупность полученных в диссертационной работе результатов указывает на перспективность изучения структурного и функционального состояния меланоцитарных новообразований с применением комбинации неинвазивных оптических методов для решения задач ранней диагностики меланомы.

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, дермы). Для количественной оценки признаков отсутствие сосочков злокачественности разработан многофотонный микроскопический индекс. ММИ позволяет разделить дерматоскопически сомнительные меланоцитарные новообразования на доброкачественные и меланомы. Доброкачественные новообразования имеют значения $MMU \le 1,28$, 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 (р=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, ОКА-изображений Количественный соответственно. анализ меланоцитарных новообразований дерматоскопически сомнительных 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±1,1 %), по сравнению с доброкачественными новообразованиями (991±106 пс и 23,6±2,6 %, соответственно). В случае дерматоскопически сомнительных меланом в эпидермисе также наблюдаются участки клеток, которые имеют параметры флуоресценции, характерные для кератиноцитов здоровой кожи.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Tuchin, V. V. Tissue optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis / V.V. Tuchin. – 3. – Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Press, 2015of.
- Knappe, V. Principles of lasers and biophotonic effects / V. Knappe, F. Frank,
 E. Rohde // Photomed Laser Surg. 2004. Vol. 22, N. 5. P. 411-417.
- Attia, A. B. E. A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends / A.B.E. Attia, G. Balasundaram, M. Moothanchery, U.S. Dinish, R. Bi, V. Ntziachristos, M. Olivo // Photoacoustics. – 2019. – Vol. 16. – P. 100144.
- Ettinger, A. Fluorescence live cell imaging / A. Ettinger, T. Wittmann // Methods in cell biology. – 2014. – Vol. 123. – P. 77-94.
- Boppart, S. A. Optical coherence tomography: Principles applications and advances / S.A. Boppart // Minerva Biotecnologica. – 2004. – Vol. 16, N. 4. – P. 211.
- Levine, A. Introduction to reflectance confocal microscopy and its use in clinical practice / A. Levine, O. Markowitz // JAAD Case Reports. – 2018. – Vol. 4, N. 10. – P. 1014-1023.
- Sordillo, L. A. Deep optical imaging of tissue using the second and third nearinfrared spectral windows / L.A. Sordillo, Y. Pu, S. Pratavieira, Y. Budansky, R.R. Alfano // J Biomed Opt. – 2014. – Vol. 19, N. 5. – P. 056004.
- Zhang, H. Penetration depth of photons in biological tissues from hyperspectral imaging in shortwave infrared in transmission and reflection geometries / H. Zhang, D. Salo, D.M. Kim, S. Komarov, Y.C. Tai, M.Y. Berezin // J Biomed Opt. – 2016. – Vol. 21, N. 12. – P. 126006.
- König, K. Translation of two-photon microscopy to the clinic: multimodal multiphoton CARS tomography of in vivo human skin / K. König, H.G. Breunig, A. Batista, A. Schindele, M. Zieger, M. Kaatz // J Biomed Opt. – 2020. – Vol. 25, N. 1. – P. 1-12.

- König, K. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution / K. Konig, I. Riemann // J Biomed Opt. – 2003. – Vol. 8, N. 3. – P. 432-439.
- Gadella, T. W. J. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): Spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale / T.W.J. Gadella, T.M. Jovin, R.M. Clegg // Biophysical Chemistry. – 1993. – Vol. 48, N. 2. – P. 221-239.
- Skala, M. C. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia / M.C. Skala, K.M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, J.G. White, N. Ramanujam // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104, N. 49. – P. 19494-19499.
- Zysk, A. M. Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside / A.M. Zysk, F.T. Nguyen, A.L. Oldenburg, D.L. Marks, S.A. Boppart // J Biomed Opt. – 2007. – Vol. 12, N. 5. – P. 051403.
- Gelikonov, G. Multimodal OCT for Malignancy Imaging / G. Gelikonov, V. Gelikonov, A. Moiseev, P. Shilyagin, S. Ksenofontov, I. Kasatkina, D. Terpelov, L. Matveev, A. Matveyev, V. Zaitsev, A. Sovetsky, N. Gladkova, E.V. Zagaynova, M. Sirotkina, E. Gubarkova, E. Kiseleva, A. Plekhanov, V. Elagin, K. Yashin, D. Vorontsov, E. Sedova, A. Maslennikova, S. Kuznetsov, A. Vitkin // In: Multimodal Optical Diagnostics of Cancer / Edited by V.V. Tuchin, J. Popp, and V. Zakharov. Cham: Springer International Publishing, 2020. P. 425-464.
- Kittler, H. Diagnostic accuracy of dermoscopy / H. Kittler, H. Pehamberger, K. Wolff, M. Binder // Lancet Oncol. 2002. Vol. 3, N. 3. P. 159-165.
- Alarcon, I. Impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions / I. Alarcon, C. Carrera, J. Palou, L. Alos, J. Malvehy, S. Puig // British Journal of Dermatology. – 2014. – Vol. 170, N. 4. – P. 802-808.

- Braun, R. P. Agreement of dermatopathologists in the evaluation of clinically difficult melanocytic lesions: how golden is the 'gold standard'? / R.P. Braun, D. Gutkowicz-Krusin, H. Rabinovitz, A. Cognetta, R. Hofmann-Wellenhof, V. Ahlgrimm-Siess, D. Polsky, M. Oliviero, I. Kolm, P. Googe, R. King, V.G. Prieto, L. French, A. Marghoob, M. Mihm // Dermatology. 2012. Vol. 224, N. 1. P. 51-58.
- Ahn, C. S. Melanocytic Nevi of Special Sites / C.S. Ahn, A. Guerra, O.P. Sangueza // American Journal of Dermatopathology. 2016. Vol. 38, N. 12. P. 867-881.
- Elder, D. E. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites /
 D.E. Elder // Modern Pathology. 2006. Vol. 19. P. S4-S20.
- 20. Bsirini, C. Histologic mimics of malignant melanoma / C. Bsirini, B.R. Smoller
 // Singapore Medical Journal. 2018. Vol. 59, N. 11. P. 602-607.
- Ng, J. C. The Impact of Partial Biopsy on Histopathologic Diagnosis of Cutaneous Melanoma / J.C. Ng, S. Swain, J.P. Dowling, R. Wolfe, P. Simpson, J.W. Kelly // Archives of Dermatology. – 2010. – Vol. 146, N. 3. – P. 234-239.
- Carli, P. The problem of false-positive diagnosis in melanoma screening: the impact of dermoscopy / P. Carli, F. Mannone, V. de Giorgi, P. Nardini, A. Chiarugi, B. Giannotti // Melanoma Research. 2003. Vol. 13, N. 2. P. 179-182.
- Osborne, J. E. Comparison of diagnostic accuracy for cutaneous malignant melanoma between general dermatology, plastic surgery and pigmented lesion clinics / J.E. Osborne, T.A. Chave, P.E. Hutchinson // British Journal of Dermatology. – 2003. – Vol. 148, N. 2. – P. 252-258.
- Denk, W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy / W. Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb // Science. – 1990. – Vol. 248, N. 4951. – P. 73-76.
- Helmchen, F. Deep tissue two-photon microscopy / F. Helmchen, W. Denk // Nat Methods. – 2005. – Vol. 2, N. 12. – P. 932-940.
- 26. Keyse, S. M. Induction of the heme oxygenase gene in human skin fibroblasts by hydrogen peroxide and UVA (365 nm) radiation: evidence for the

involvement of the hydroxyl radical / S.M. Keyse, R.M. Tyrrell // Carcinogenesis. – 1990. – Vol. 11, N. 5. – P. 787-791.

- König, K. Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress / K. König, P.T. So, W.W. Mantulin, B.J. Tromberg, E. Gratton // J Microsc. – 1996. – Vol. 183, N. Pt 3. – P. 197-204.
- König, K. Pulse-length dependence of cellular response to intense near-infrared laser pulses in multiphoton microscopes / K. König, T.W. Becker, P. Fischer, I. Riemann, K.J. Halbhuber // Optics Letters. – 1999. – Vol. 24, N. 2. – P. 113-115.
- Saytashev, I. Pulse duration and energy dependence of photodamage and lethality induced by femtosecond near infrared laser pulses in Drosophila melanogaster / I. Saytashev, S.N. Arkhipov, N. Winkler, K. Zuraski, V.V. Lozovoy, M. Dantus // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2012. – Vol. 115. – P. 42-50.
- Pustovalov, V. K. Initiation of explosive boiling and optical breakdown as a result of the action of laser pulses on melanosome in pigmented biotissues / V.K. Pustovalov // Quantum Electronics. – 1995. – Vol. 25, N. 11. – P. 1055-1059.
- Liu, J. Two-photon microscopy in pre-clinical and clinical cancer research / J.
 Liu // Frontiers of Optoelectronics. 2015. Vol. 8, N. 2. P. 141-151.
- Perry, S. W. Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research / S.W. Perry, R.M. Burke, E.B. Brown // Ann Biomed Eng. – 2012. – Vol. 40, N. 2. – P. 277-291.
- Breunig, H. G. Multiphoton excitation characteristics of cellular fluorophores of human skin in vivo / H.G. Breunig, H. Studier, K. König // Opt Express. – 2010. – Vol. 18, N. 8. – P. 7857-7871.
- Koehler, M. J. Clinical application of multiphoton tomography in combination with confocal laser scanning microscopy for in vivo evaluation of skin diseases / M.J. Koehler, M. Speicher, S. Lange-Asschenfeldt, E. Stockfleth, S. Metz, P.

Elsner, M. Kaatz, K. Konig // Exp Dermatol. – 2011. – Vol. 20, N. 7. – P. 589-594.

- Paoli, J. Multiphoton laser scanning microscopy--a novel diagnostic method for superficial skin cancers / J. Paoli, M. Smedh, M.B. Ericson // Semin Cutan Med Surg. – 2009. – Vol. 28, N. 3. – P. 190-195.
- Dimitrow, E. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for in vivo and ex vivo diagnosis of malignant melanoma / E. Dimitrow, M. Ziemer, M.J. Koehler, J. Norgauer, K. Konig, P. Elsner, M. Kaatz // Journal of Investigative Dermatology. – 2009. – Vol. 129, N. 7. – P. 1752-1758.
- Piletic, I. R. Probing Near-Infrared Photorelaxation Pathways in Eumelanins and Pheomelanins / I.R. Piletic, T.E. Matthews, W.S. Warren // Journal of Physical Chemistry A. – 2010. – Vol. 114, N. 43. – P. 11483-11491.
- Matthews, T. E. Pump-Probe Imaging Differentiates Melanoma from Melanocytic Nevi / T.E. Matthews, I.R. Piletic, M.A. Selim, M.J. Simpson, W.S. Warren // Science Translational Medicine. – 2011. – Vol. 3, N. 71. – P. 71ra15.
- Matthews, T. E. In vivo and ex vivo epi-mode pump-probe imaging of melanin and microvasculature / T.E. Matthews, J.W. Wilson, S. Degan, M.J. Simpson, J.Y. Jin, J.Y. Zhang, W.S. Warren // Biomed Opt Express. – 2011. – Vol. 2, N. 6. – P. 1576-1583.
- 40. Suhling, K. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments / K. Suhling, L.M. Hirvonen, J.A. Levitt, P.-H. Chung, C. Tregidgo, A. Le Marois, D.A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Beg, S. Poland, S. Coelho, R. Henderson, N. Krstajic // Medical Photonics. 2015. Vol. 27. P. 3-40.
- 41. Datta, R. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications / R. Datta, T.M. Heaster, J.T. Sharick, A.A. Gillette, M.C. Skala // J Biomed Opt. 2020. Vol. 25, N. 7. P. 071203.
- Becker, W. Fluorescence lifetime imaging--techniques and applications / W. Becker // J Microsc. – 2012. – Vol. 247, N. 2. – P. 119-136.
- 43. de Grauw, C. J. Multiple time-gate module for fluorescence lifetime imaging / C.J. de Grauw, H.C. Gerritsen // Applied Spectroscopy. 2001. Vol. 55, N. 6. P. 670-678.
- Gratton, E. Fluorescence lifetime imaging for the two-photon microscope: time-domain and frequency-domain methods / E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, Q. Ruan, N. Barry // J Biomed Opt. – 2003. – Vol. 8, N. 3. – P. 381-390.
- Clegg, R. M. Fluorescence lifetime-resolved imaging: measuring lifetimes in an image / R.M. Clegg, O. Holub, C. Gohlke // Methods Enzymol. – 2003. – Vol. 360. – P. 509-542.
- Becker, W. Advanced time-correlated single photon counting techniques / W. Becker. – Berlin ; New York: Springer, 2005of.
- 47. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism / P. Mitchell // Nature. 1961. Vol. 191. P. 144-148.
- Zucker, S. D. Localization of bilirubin in phospholipid bilayers by parallax analysis of fluorescence quenching / S.D. Zucker, W. Goessling, E.J. Bootle, C. Sterritt // J Lipid Res. – 2001. – Vol. 42, N. 9. – P. 1377-1388.
- Pena, A. Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy: erratum / A. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, G. Godeau, M.C. Schanne-Klein // Opt Express. – 2005. – Vol. 13, N. 17. – P. 6667.
- Berezin, M. Y. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging / M.Y. Berezin, S. Achilefu // Chem Rev. – 2010. – Vol. 110, N. 5. – P. 2641-2684.
- Dancik, Y. Use of multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging to investigate skin pigmentation *in vivo* / Y. Dancik, A. Favre, C.J. Loy, A. Zvyagin, M. Roberts // J Biomed Opt. – 2013. – Vol. 18, N. 2. – P. 026022.

- Lakowicz, J. R. Fluorescence lifetime imaging / J.R. Lakowicz, H. Szmacinski, K. Nowaczyk, K.W. Berndt, M. Johnson // Anal Biochem. – 1992. – Vol. 202, N. 2. – P. 316-330.
- 53. Sharick, J. T. Protein-bound NAD(P) H Lifetime is Sensitive to Multiple Fates of Glucose Carbon / J.T. Sharick, P.F. Favreau, A.A. Gillette, S.M. Sdao, M.J. Merrins, M.C. Skala // Sci Rep. – 2018. – Vol. 8. – P. 5456.
- Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues / N. Ramanujam // Neoplasia. – 2000. – Vol. 2, N. 1-2. – P. 89-117.
- 55. Koziol, B. Riboflavin as a source of autofluorescence in Eisenia fetida coelomocytes / B. Koziol, M. Markowicz, J. Kruk, B. Plytycz // Photochem Photobiol. – 2006. – Vol. 82, N. 2. – P. 570-573.
- Leenders, R. Flavin dynamics in reduced flavodoxins. A time-resolved polarized fluorescence study / R. Leenders, M. Kooijman, A. van Hoek, C. Veeger, A.J. Visser // Eur J Biochem. 1993. Vol. 211, N. 1-2. P. 37-45.
- Liu, Y. Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy / Y. Liu, J.D. Simon // Pigment Cell Res. – 2003. – Vol. 16, N. 6. – P. 606-618.
- Paul, R. J. Oxygen concentration and the oxidation-reduction state of yeast: determination of free/bound NADH and flavins by time-resolved spectroscopy / R.J. Paul, H. Schneckenburger // Naturwissenschaften. – 1996. – Vol. 83, N. 1. – P. 32-35.
- van den Berg, P. A. W. Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the timeresolved fluorescence characteristics / P.A.W. van den Berg, K.A. Feenstra, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, A.J.W.G. Visser // Journal of Physical Chemistry B. – 2002. – Vol. 106, N. 34. – P. 8858-8869.
- 60. Lukina, M. M. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel / M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, I.N. Druzhkova, L.E. Shimolina, E.V. Zagaynova,

M.V. Shirmanova // Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects. – 2018.
– Vol. 1862, N. 8. – P. 1693-1700.

- Chorvat, D. Jr. Spectrally resolved time-correlated single photon counting: a novel approach for characterization of endogenous fluorescence in isolated cardiac myocytes / D. Chorvat, Jr., A. Chorvatova // Eur Biophys J. 2006. Vol. 36, N. 1. P. 73-83.
- Dimitrow, E. Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis / E. Dimitrow, I. Riemann, A. Ehlers, M.J. Koehler, J. Norgauer, P. Elsner, K. Konig, M. Kaatz // Exp Dermatol. – 2009. – Vol. 18, N. 6. – P. 509-515.
- Seidenari, S. Multiphoton Laser Tomography and Fluorescence Lifetime Imaging of Melanoma: Morphologic Features and Quantitative Data for Sensitive and Specific Non-Invasive Diagnostics / S. Seidenari, F. Arginelli, C. Dunsby, P.M.W. French, K. Konig, C. Magnoni, C. Talbot, G. Ponti // Plos One. – 2013. – Vol. 8, N. 7. – P. e70682.
- James, J. Report on fluorescence lifetime imaging using multiphoton laser scanning microscopy targeting sentinel lymph node diagnostics / J. James, D. Kantere, J. Enger, J. Siarov, A.M. Wennberg, M.B. Ericson // J Biomed Opt. – 2020. – Vol. 25, N. 7. – P. 071204.
- 65. Pastore, M. N. Non-invasive metabolic imaging of melanoma progression / M.N. Pastore, H. Studier, C.S. Bonder, M.S. Roberts // Exp Dermatol. 2017. Vol. 26, N. 7. P. 607-614.
- Spaide, R. F. Optical coherence tomography angiography / R.F. Spaide, J.G. Fujimoto, N.K. Waheed, S.R. Sadda, G. Staurenghi // Progress in Retinal and Eye Research. 2018. Vol. 64. P. 1-55.
- 67. Jia, Y. Quantitative OCT angiography of optic nerve head blood flow / Y. Jia, J.C. Morrison, J. Tokayer, O. Tan, L. Lombardi, B. Baumann, C.D. Lu, W. Choi, J.G. Fujimoto, D. Huang // Biomed Opt Express. 2012. Vol. 3, N. 12. P. 3127-3137.

- Huang, Y. Efficient method to suppress artifacts caused by tissue hyperreflections in optical microangiography of retina in vivo / Y. Huang, Q. Zhang, R.K. Wang // Biomed Opt Express. – 2015. – Vol. 6, N. 4. – P. 1195-1208.
- 69. Spaide, R. F. Image Artifacts in Optical Coherence Tomography Angiography / R.F. Spaide, J.G. Fujimoto, N.K. Waheed // Retina. – 2015. – Vol. 35, N. 11. – P. 2163-2180.
- 70. De Carvalho, N. In vivo micro-angiography by means of speckle-variance optical coherence tomography (SV-OCT) is able to detect microscopic vascular changes in naevus to melanoma transition / N. De Carvalho, S. Ciardo, A.M. Cesinaro, G.B.E. Jemec, M. Ulrich, J. Welzel, J. Holmes, G. Pellacani // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2016. Vol. 30, N. 10. P. E67-E68.
- Schuh, S. Imaging Blood Vessel Morphology in Skin: Dynamic Optical Coherence Tomography as a Novel Potential Diagnostic Tool in Dermatology / S. Schuh, J. Holmes, M. Ulrich, L. Themstrup, G.B.E. Jemec, N. De Carvalho, G. Pellacani, J. Welzel // Dermatology and Therapy. – 2017. – Vol. 7, N. 2. – P. 187-202.
- 72. Barnhill, R. L. Angiogenesis and Tumor Progression of Melanoma -Quantification of Vascularity in Melanocytic Nevi and Cutaneous Malignant-Melanoma / R.L. Barnhill, K. Fandrey, M.A. Levy, M.C. Mihm, B. Hyman // Laboratory Investigation. – 1992. – Vol. 67, N. 3. – P. 331-337.
- 73. Moiseev, A. Optical coherence tomography-based angiography device with real-time angiography B-scans visualization and hand-held probe for everyday clinical use / A. Moiseev, S. Ksenofontov, M. Sirotkina, E. Kiseleva, M. Gorozhantseva, N. Shakhova, L. Matveev, V. Zaitsev, A. Matveyev, E. Zagaynova, V. Gelikonov, N. Gladkova, A. Vitkin, G. Gelikonov // Journal of Biophotonics. – 2018. – Vol. 11, N. 10. – P. e201700292.
- 74. Sirotkina, M. A. Photodynamic therapy monitoring with optical coherence angiography / M.A. Sirotkina, L.A. Matveev, M.V. Shirmanova, V.Y. Zaitsev, N.L. Buyanova, V.V. Elagin, G.V. Gelikonov, S.S. Kuznetsov, E.B. Kiseleva,

A.A. Moiseev, S.V. Gamayunov, E.V. Zagaynova, F.I. Feldchtein, A. Vitkin,
N.D. Gladkova // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, N. 1. – P. 41506.

- Sirotkina, M. A. Accurate early prediction of tumour response to PDT using optical coherence angiography / M.A. Sirotkina, A.A. Moiseev, L.A. Matveev, V.Y. Zaitsev, V.V. Elagin, S.S. Kuznetsov, G.V. Gelikonov, S.Y. Ksenofontov, E.V. Zagaynova, F.I. Feldchtein, N.D. Gladkova, A. Vitkin // Scientific Reports. 2019. Vol. 9, N. 1. P. 6492.
- 76. Gubarkova, E. V. Optical coherence angiography for pre-treatment assessment and treatment monitoring following photodynamic therapy: a basal cell carcinoma patient study / E.V. Gubarkova, F.I. Feldchtein, E.V. Zagaynova, S.V. Gamayunov, M.A. Sirotkina, E.S. Sedova, S.S. Kuznetsov, A.A. Moiseev, L.A. Matveev, V.Y. Zaitsev, D.A. Karashtin, G.V. Gelikonov, L. Pires, A. Vitkin, N.D. Gladkova // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9, N. 1. – P. 18670-18670.
- Maslennikova, A. V. In-vivo longitudinal imaging of microvascular changes in irradiated oral mucosa of radiotherapy cancer patients using optical coherence tomography / A.V. Maslennikova, M.A. Sirotkina, A.A. Moiseev, E.S. Finagina, S.Y. Ksenofontov, G.V. Gelikonov, L.A. Matveev, E.B. Kiseleva, V.Y. Zaitsev, E.V. Zagaynova, F.I. Feldchtein, N.D. Gladkova, A. Vitkin // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, N. 1. – P. 16505.
- Matthews, N. H. Epidemiology of Melanoma / N.H. Matthews, W.Q. Li, A.A. Qureshi, M.A. Weinstock, E. Cho // In: Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy / Edited by W.H. Ward and J.M. Farma. – Brisbane (AU): 2017. – P. 21.
- Garbe, C. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics - Update 2019 / C. Garbe, T. Amaral, K. Peris, A. Hauschild, P. Arenberger, L. Bastholt, V. Bataille, V. del Marmol, B. Dreno, M.C. Fargnoli, J.J. Grob, C. Holler, R. Kaufmann, A. Lallas, C. Lebbe, J. Malvehy, M. Middleton, D. Moreno-Ramirez, G. Pellacani, P. Saiag, A.J. Stratigos, R. Vieira, I. Zalaudek, A.M.M. Eggermont, E.D. Forum, E.A.

Dermato-Oncology, EORTC // European Journal of Cancer. – 2020. – Vol. 126. – P. 141-158.

- Ferlay, J. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012 / J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J.W.W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray // European Journal of Cancer. 2013. Vol. 49, N. 6. P. 1374-1403.
- Bauer, J. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data / J. Bauer, C. Garbe // Pigment Cell Res. – 2003. – Vol. 16, N. 3. – P. 297-306.
- Bishop, J. N. Management of familial melanoma / J.N. Bishop, M. Harland, J. Randerson-Moor, D.T. Bishop // The Lancet Oncology. 2007. Vol. 8, N. 1. P. 46-54.
- Curtin, J. A. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma / J.A. Curtin, K. Busam, D. Pinkel, B.C. Bastian // Journal of Clinical Oncology. – 2006. – Vol. 24, N. 26. – P. 4340-4346.
- Elder, D. E. Melanocytic tumour classification and the pathway concept of melanoma pathogenesis / D.E. Elder, R.L. Barnhill, B.C. Bastian, M.G. Cook, A. de la Fouchardiere, P. Gerami // In: WHO classification of skin tumours / Edited by D.M. Elder, D. Scolyer, and R.A. Willemze. – 4. – France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2018. – P. 66-71.
- Clark, W. H. Jr. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin / W.H. Clark, Jr., L. From, E.A. Bernardino, M.C. Mihm // Cancer Research. – 1969. – Vol. 29, N. 3. – P. 705-727.
- 86. Gershenwald, J. E. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual / J.E. Gershenwald, R.A. Scolyer, K.R. Hess, V.K. Sondak, G.V. Long, M.I. Ross, A.J. Lazar, M.B. Faries, J.M. Kirkwood, G.A. McArthur, L.E. Haydu, A.M.M. Eggermont, K.T. Flaherty, C.M. Balch, J.F. Thompson // CA Cancer J Clin. – 2017. – Vol. 67, N. 6. – P. 472-492.

- Пожарисский, К М. Патоморфологическая характеристика и особенности меланомы кожи. Прогностические факторы / К.М. Пожарисский, А.Г. Кудайбергенова, Е.Е. Леенман // Практическая онкология. – 2001. – Vol. 8, N. 4. – Р. 23-29.
- Elder, D. E. Melanoma progression / D.E. Elder // Pathology. 2016. Vol. 48, N. 2. P. 147-154.
- Gimotty, P. A. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma / P.A. Gimotty, P. Van Belle, D.E. Elder, T. Murry, K.T. Montone, X. Xu, S. Hotz, S. Raines, M.E. Ming, P. Wahl, D. Guerry // J Clin Oncol. – 2005. – Vol. 23, N. 31. – P. 8048-8056.
- 90. Guerry, D. Lessons from Tumor Progression the Invasive Radial Growth-Phase of Melanoma Is Common, Incapable of Metastasis, and Indolent / D. Guerry, M. Synnestvedt, D.E. Elder, D. Schultz // Journal of Investigative Dermatology. – 1993. – Vol. 100, N. 3. – P. S342-S345.
- 91. Грушин, В. Н. Особенности строения кожи человека при меланоме / В.Н. Грушин, И.С. Беликова, О.Д. Мяделец, Т.Н. Кичигина, И.В. Зубарева, Ю.П. Аблецова // Проблемы здоровья и экологии. 2010. Vol. 23, N. 1. Р. 98-101.
- Spatz, A. Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas / A. Spatz, M.G. Cook, D.E. Elder, M. Piepkorn, D.J. Ruiter, R.L. Barnhill, E.M. grp // European Journal of Cancer. 2003. Vol. 39, N. 13. P. 1861-1865.
- 93. Scolyer, R. A. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized primary cutaneous melanoma / R.A. Scolyer, J.F. Thompson, H.M. Shaw, S.W. McCarthy // Journal of Cutaneous Pathology. – 2006. – Vol. 33, N. 5. – P. 395-396.
- Balch, C. M. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification / C.M. Balch, J.E. Gershenwald, S.J. Soong, J.F. Thompson, M.B. Atkins, D.R. Byrd, A.C. Buzaid, A.J. Cochran, D.G. Coit, S.L. Ding,

A.M. Eggermont, K.T. Flaherty, P.A. Gimotty, J.M. Kirkwood, K.M. McMasters, M.C. Mihm, D.L. Morton, M.I. Ross, A.J. Sober, V.K. Sondak // Journal of Clinical Oncology. – 2009. – Vol. 27, N. 36. – P. 6199-6206.

- 95. Gachon, J. First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice / J. Gachon, P. Beaulieu, M.F. Sei, J. Gouvernet, J.P. Claudel, M. Lemaitre, M.A. Richard, J.J. Grob // Archives of Dermatology. – 2005. – Vol. 141, N. 4. – P. 434-438.
- 96. Nachbar, F. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions / F. Nachbar, W. Stolz, T. Merkle, A.B. Cognetta, T. Vogt, M. Landthaler, P. Bilek, O. Braun-Falco, G. Plewig // J Am Acad Dermatol. 1994. Vol. 30, N. 4. P. 551-559.
- 97. Argenziano, G. Seven-point checklist of dermoscopy revisited / G. Argenziano,
 C. Catricalà, M. Ardigo, P. Buccini, P. De Simone, L. Eibenschutz, A. Ferrari,
 G. Mariani, V. Silipo, I. Sperduti, I. Zalaudek // Br J Dermatol. 2011. Vol.
 164, N. 4. P. 785-790.
- 98. Kittler, H. Diagnostic accuracy of dermoscopy / H. Kittler, S.W. Menzies // Atlas of Dermoscopy, 2nd Edition. – 2013. – P. 351-353.
- Argenziano, G. Blue-black rule: a simple dermoscopic clue to recognize pigmented nodular melanoma / G. Argenziano, C. Longo, A. Cameron, S. Cavicchini, J.Y. Gourhant, A. Lallas, I. McColl, C. Rosendahl, L. Thomas, D. Tiodorovic-Zivkovic, P. Zaballos, I. Zalaudek // British Journal of Dermatology. 2011. Vol. 165, N. 6. P. 1251-1255.
- Argenziano, G. Dermoscopy of pigmented skin lesions: Results of a consensus meeting via the Internet / G. Argenziano, H.P. Soyer, S. Chimenti, R. Talamini, R. Corona, F. Sera, M. Binder, L. Cerroni, G. De Rosa, G. Ferrara, R. Hofmann-Wellenhof, M. Landthater, S.W. Menzies, H. Pehamberger, D. Piccolo, H.S. Rabinovitz, R. Schiffner, S. Staibano, W. Stolz, I. Bartenjev, A. Blum, R. Braun, H. Cabo, P. Carli, V. De Giorgi, M.G. Fleming, J.M. Grichnik, C.M. Grin, A.C. Halpern, R. Johr, B. Katz, R.O. Kenet, H. Kittler, J. Kreusch, J. Malvehy, G. Mazzocchetti, M. Oliviero, F. Ozdemir, K. Peris, R. Perotti, A.

Perusquia, M.A. Pizzichetta, S. Puig, B. Rao, P. Rubegni, T. Saida, M. Scalvenzi, S. Seidenari, I. Stanganelli, M. Tanaka, K. Westerhoff, I.H. Wolf, O. Braun-Falco, H. Kerl, T. Nishikawa, K. Wolff // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2003. – Vol. 48, N. 5. – P. 679-693.

- 101. Stolz, W. Dermatoscopy for facial pigmented skin lesions / W. Stolz, R. Schiffner, W.H.C. Burgdorf // Clinics in Dermatology. 2002. Vol. 20, N. 3. P. 276-278.
- 102. Pralong, P. Dermoscopy of lentigo maligna melanoma: report of 125 cases / P. Pralong, E. Bathelier, S. Dalle, N. Poulalhon, S. Debarbieux, L. Thomas // British Journal of Dermatology. 2012. Vol. 167, N. 2. P. 280-287.
- 103. Dinnes, J. Dermoscopy, with and without visual inspection, for diagnosing melanoma in adults / J. Dinnes, J.J. Deeks, N. Chuchu, L. Ferrante di Ruffano, R.N. Matin, D.R. Thomson, K.Y. Wong, R.B. Aldridge, R. Abbott, M. Fawzy, et al. // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – Vol. 12, N. 12. – P. CD011902.
- 104. Garbe, Claus Diagnosis and treatment of melanoma. European consensusbased interdisciplinary guideline – Update 2016 / C. Garbe, K. Peris, A. Hauschild, P. Saiag, M. Middleton, L. Bastholt, J.-J. Grob, J. Malvehy, J. Newton-Bishop, A.J. Stratigos, H. Pehamberger, A.M. Eggermont // European Journal of Cancer. – 2016. – Vol. 63. – P. 201-217.
- 105. Gonzalez, S. In vivo reflectance-mode confocal microscopy in clinical dermatology and cosmetology / S. Gonzalez, Y. Gilaberte-Calzada // Int J Cosmet Sci. – 2008. – Vol. 30, N. 1. – P. 1-17.
- 106. Eichert, S. Diagnosis of cutaneous tumors with in vivo confocal laser scanning microscopy / S. Eichert, M. Mohrle, H. Breuninger, M. Rocken, C. Garbe, J. Bauer // Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. – 2010. – Vol. 8, N. 6. – P. 400-410.
- 107. Ulrich, M. In vivo confocal microscopy in dermatology: from research to clinical application / M. Ulrich, S. Lange-Asschenfeldt // J Biomed Opt. 2013. Vol. 18, N. 6. P. 061212.

- 108. Ferris, L. K. New diagnostic aids for melanoma / L.K. Ferris, R.J. Harris // Dermatol Clin. 2012. Vol. 30, N. 3. P. 535-545.
- 109. Rajadhyaksha, M. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast / M. Rajadhyaksha, M. Grossman, D. Esterowitz, R.H. Webb, R.R. Anderson // Journal of Investigative Dermatology. – 1995. – Vol. 104, N. 6. – P. 946-952.
- 110. Branzan, A. L. In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology / A.L. Branzan, M. Landthaler, R.M. Szeimies // Lasers Med Sci. 2007. Vol. 22, N. 2. P. 73-82.
- 111. Yamashita, T. Non-invasive visualization of melanin and melanocytes by reflectance-mode confocal microscopy / T. Yamashita, T. Kuwahara, S. Gonzalez, M. Takahashi // Journal of Investigative Dermatology. 2005. Vol. 124, N. 1. P. 235-240.
- 112. Langley, R. G. Confocal scanning laser microscopy of benign and malignant melanocytic skin lesions in vivo / R.G. Langley, M. Rajadhyaksha, P.J. Dwyer, A.J. Sober, T.J. Flotte, R.R. Anderson // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2001. – Vol. 45, N. 3. – P. 365-376.
- 113. Gonzalez, S. Clinical applications of reflectance confocal microscopy in the management of cutaneous tumors / S. Gonzalez // Actas Dermosifiliogr. 2008. Vol. 99, N. 7. P. 528-531.
- 114. Stevenson, A. D. Systematic review of diagnostic accuracy of reflectance confocal microscopy for melanoma diagnosis in patients with clinically equivocal skin lesions / A.D. Stevenson, S. Mickan, S. Mallett, M. Ayya // Dermatol Pract Concept. – 2013. – Vol. 3, N. 4. – P. 19-27.
- 115. Pellacani, G. Reflectance confocal microscopy as a second-level examination in skin oncology improves diagnostic accuracy and saves unnecessary excisions: a longitudinal prospective study / G. Pellacani, P. Pepe, A. Casari, C. Longo // British Journal of Dermatology. – 2014. – Vol. 171, N. 5. – P. 1044-1051.

- 116. Borsari, S. Clinical Indications for Use of Reflectance Confocal Microscopy for Skin Cancer Diagnosis / S. Borsari, R. Pampena, A. Lallas, A. Kyrgidis, E. Moscarella, E. Benati, M. Raucci, G. Pellacani, I. Zalaudek, G. Argenziano, C. Longo // Jama Dermatology. – 2016. – Vol. 152, N. 10. – P. 1093-1098.
- 117. Benati, E. Quantitative evaluation of healthy epidermis by means of multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy / E. Benati, V. Bellini, S. Borsari, C. Dunsby, C. Ferrari, P. French, M. Guanti, D. Guardoli, K. Koenig, G. Pellacani, G. Ponti, S. Schianchi, C. Talbot, S. Seidenari // Skin Res Technol. 2011. Vol. 17, N. 3. P. 295-303.
- 118. Leitgeb, R. Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography / R. Leitgeb, C. Hitzenberger, A. Fercher // Opt Express. 2003. Vol. 11, N. 8. P. 889-894.
- 119. Shilyagin, P. A. Achromatic registration of quadrature components of the optical spectrum in spectral domain optical coherence tomography / P.A. Shilyagin, G.V. Gelikonov, V.M. Gelikonov, A.A. Moiseev, D.A. Terpelov // Quantum Electronics. 2014. Vol. 44, N. 7. P. 664-669.
- 120. An, L. Ultrahigh sensitive optical microangiography for in vivo imaging of microcirculations within human skin tissue beds / L. An, J. Qin, R. Wang // Optics Express. – 2010. – Vol. 18, N. 8. – P. 8220-8228.
- 121. Matveev, L. A. Hybrid M-mode-like OCT imaging of three-dimensional microvasculature in vivo using reference-free processing of complex valued Bscans / L.A. Matveev, V.Y. Zaitsev, G.V. Gelikonov, A.L. Matveyev, A.A. Moiseev, S.Y. Ksenofontov, V.M. Gelikonov, M.A. Sirotkina, N.D. Gladkova, V. Demidov, A. Vitkin // Optics Letters. – 2015. – Vol. 40, N. 7. – P. 1472-1475.
- 122. Reif, R. Quantifying optical microangiography images obtained from a spectral domain optical coherence tomography system / R. Reif, J. Qin, L. An, Z. Zhi, S. Dziennis, R. Wang // International journal of biomedical imaging. 2012. Vol. 2012. P. 509783.

- 123. Friedman, J. H. An Algorithm for Finding Best Matches in Logarithmic Expected Time / J.H. Friedman, J.L. Bentley, R.A. Finkel // ACM Trans. Math. Softw. – 1977. – Vol. 3, N. 3. – P. 209–226.
- 124. Hill, T. STATISTICS: Methods and Applications. / T. Hill, P. Lewicki. Tulsa, OK: StatSoft, 2007of.
- 125. Современные неинвазивные методы диагностики меланоцитарных новообразований кожи лица / О.Е. Гаранина, В.В. Елагин, Д.А. Давыдова, И.Л. Шливко, И.А. Клеменова, Е.В. Губарькова, Н.Ю. Орлинская, Е.В. Загайнова // Клиническая дерматология и венерология. – 2019. – Vol. 18, N. 5. – Р. 608-615.
- 126. Родионов, А. Н. Клиническая дерматология. Иллюстрированное руководство для врачей / А.Н. Родионов, Д.В. Заславский, А.А. Сыдиков. – 2-е. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019оf.
- 127. Бойчук, Н. В. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Н.В.
 Бойчук, Р.Р. Исламов, Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Челышев. Москва:
 ГЭОТАР-Медиа, 2016оf.
- 128. Langley, R. G. B. In vivo confocal scanning laser microscopy of benign lentigines: Comparison to conventional histology and in vivo characteristics of lentigo maligna / R.G.B. Langley, E. Burton, N. Walsh, I. Propperova, S.J. Murray // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2006. – Vol. 55, N. 1. – P. 88-97.
- 129. Pellacani, G. Microscopic in vivo description of cellular architecture of dermoscopic pigment network in nevi and melanomas / G. Pellacani, A.M. Cesinaro, C. Longo, C. Grana, S. Seidenari // Archives of Dermatology. 2005. Vol. 141, N. 2. P. 147-154.
- 130. Correia, M. S. Melanin Transferred to Keratinocytes Resides in Nondegradative Endocytic Compartments / M.S. Correia, H. Moreiras, F.J.C. Pereira, M.V. Neto, T.C. Festas, A.K. Tarafder, J.S. Ramalho, M.C. Seabra, D.C. Barral // Journal of Investigative Dermatology. – 2018. – Vol. 138, N. 3. – P. 637-646.

- 131. Wu, X. Melanosome transfer: it is best to give and receive / X. Wu, J.A. Hammer // Curr Opin Cell Biol. 2014. Vol. 29. P. 1-7.
- 132. Bowman, S. L. Shining a Light on Black Holes in Keratinocytes / S.L. Bowman, M.S. Marks // Journal of Investigative Dermatology. 2018. Vol. 138, N. 3. P. 486-489.
- 133. Gundalli, S. Histopathological spectrum of benign melanocytic nevi our experience in a tertiary care centre / S. Gundalli, S. Kadadavar, S. Singhania, R. Kolekar // Our Dermatol Online. 2016. Vol. 7, N. 1. P. 21-25.
- 134. Zalaudek, I. The morphologic universe of melanocytic nevi / I. Zalaudek, M. Manzo, I. Savarese, G. Docimo, G. Ferrara, G. Argenziano // Semin Cutan Med Surg. 2009. Vol. 28, N. 3. P. 149-156.
- 135. Kalia, S. Melanin quantification by in vitro and in vivo analysis of near-infrared fluorescence / S. Kalia, J. Zhao, H. Zeng, D. McLean, N. Kollias, H. Lui // Pigment Cell & Melanoma Research. – 2018. – Vol. 31, N. 1. – P. 31-38.
- 136. Waddell, A. Advances in the use of reflectance confocal microscopy in melanoma / A. Waddell, P. Star, P. Guitera // Melanoma management. – 2018. – Vol. 5, N. 1. – P. MMT04-MMT04.
- 137. Paul, E. Melanin-producing dendritic cells and histogenesis of malignant melanoma / E. Paul, L. Illig // Arch Dermatol Res. 1976. Vol. 257, N. 2. P. 163-177.
- Segura, S. In Vivo Microscopic Features of Nodular Melanomas: Dermoscopy, Confocal Microscopy, and Histopathologic Correlates / S. Segura, G. Pellacani, S. Puig, C. Longo, S. Bassoli, P. Guitera, J. Palou, S. Menzies, S. Seidenari, J. Malvehy // Archives of Dermatology. – 2008. – Vol. 144, N. 10. – P. 1311-1320.
- Nielsen, K. P. The importance of the depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological processes / K.P. Nielsen, L. Zhao, J.J. Stamnes, K. Stamnes, J. Moan // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2006. – Vol. 82, N. 3. – P. 194-198.

- 140. Brożyna, A. A. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy / A.A. Brożyna, W. Jóźwicki, K. Roszkowski, J. Filipiak, A.T. Slominski // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, N. 14. – P. 17844-17853.
- 141. Lambert, M. W. The physiology of melanin deposition in health and disease / M.W. Lambert, S. Maddukuri, K.M. Karanfilian, M.L. Elias, W.C. Lambert // Clinics in Dermatology. – 2019. – Vol. 37, N. 5. – P. 402-417.
- 142. Banerjee, S. S. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma / S.S. Banerjee, M. Harris // Histopathology. 2000. Vol. 36, N. 5. P. 387-402.
- 143. Blessing, K. Small cell malignant melanoma: a variant of naevoid melanoma. Clinicopathological features and histological differential diagnosis / K. Blessing, J.J. Grant, D.S. Sanders, M.M. Kennedy, A. Husain, P. Coburn // J Clin Pathol. – 2000. – Vol. 53, N. 8. – P. 591-595.
- 144. Petronic-Rosic, V. Pagetoid melanocytosis: when is it significant? / V. Petronic-Rosic, C.R. Shea, T. Krausz // Pathology. 2004. Vol. 36, N. 5. P. 435-444.
- 145. Hurwitz, R. M. Atypical or typical pagetoid cell: a subtle clue to differentiate a melanoma from a melanocytic nevus / R.M. Hurwitz // Dermatol Pract Concept. – 2013. – Vol. 3, N. 2. – P. 9-11.
- 146. Shahriari, N. Reflectance confocal microscopy features of melanomas on the body and non-glabrous chronically sun-damaged skin / N. Shahriari, J.M. Grant-Kels, H. Rabinovitz, M. Oliviero, A. Scope // Journal of Cutaneous Pathology. – 2018. – Vol. 45, N. 10. – P. 754-759.
- 147. Starner, R. J. PGE(2) is a UVR-inducible autocrine factor for human melanocytes that stimulates tyrosinase activation / R.J. Starner, L. McClelland, Z. Abdel-Malek, A. Fricke, G. Scott // Exp Dermatol. 2010. Vol. 19, N. 7. P. 682-684.
- 148. Cinotti, E. Nipple and areola lesions: Dermoscopy and reflectance confocal microscopy features / E. Cinotti, D. Galluccio, M. Ardigò, S. Gonzalez, A.M. Manganoni, M. Venturini, P. Broganelli, S. Ribero, F. Farnetani, V.D. Mandel,

G. Pellacani, L. Tognetti, F. Lacarrubba, P. Guitera, I. Stanganelli, I. Zalaudek,
E.J. Arzberger, P. Bahadoran, C. Longo, G. Spataro, J.-L. Perrot, P. Rubegni //
Journal of the American Academy of Dermatology. – 2019. – Vol. 81, N. 2. –
P. 610-613.

- 149. Zalaudek, I. Clinically equivocal melanocytic skin lesions with features of regression: a dermoscopic-pathological study / I. Zalaudek, G. Argenziano, G. Ferrara, H.P. Soyer, R. Corona, F. Sera, L. Cerroni, A. Carbone, A. Chiominto, L. Cicale, G. De Rosa, A. Ferrari, R. Hofmann-Wellenhof, J. Malvehy, K. Peris, M.A. Pizzichetta, S. Puig, M. Scalvenzi, S. Staibano, V. Ruocco // Br J Dermatol. 2004. Vol. 150, N. 1. P. 64-71.
- 150. Pellacani, G. The Impact of In Vivo Reflectance Confocal Microscopy for the Diagnostic Accuracy of Melanoma and Equivocal Melanocytic Lesions / G. Pellacani, P. Guitera, C. Longo, M. Avramidis, S. Seidenari, S. Menzies // Journal of Investigative Dermatology. – 2007. – Vol. 127, N. 12. – P. 2759-2765.
- 151. Elagin, V. Multimodal optical imaging for in vivo discrimination of equivocal melanocytic skin lesions / V. Elagin, E. Gubarkova, O. Garanina, N. Orlinskaya, D. Davydova, I. Klemenova, I. Shlivko, E. Zagaynova // SPIE BiOS. 2020. Vol. 11211. P. 1121108-1-1121108-5.
- 152. Carli, P. Lentigines Including Lentigo Simplex, Reticulated Lentigo and Actinic Lentigo / P. Carli, C. Salvini // In: Color Atlas of Melanocytic Lesions of the Skin / Edited by H.P. Soyer, G. Argenziano, R. Hofmann-Wellenhof, and R.H. Johr. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. – P. 290-294.
- 153. Pe'er, J. Pathology of eyelid tumors / J. Pe'er // Indian Journal of Ophthalmology. – 2016. – Vol. 64, N. 3. – P. 177-190.
- 154. Elder, D. E. Dysplastic naevi: an update / D.E. Elder // Histopathology. 2010.
 Vol. 56, N. 1. P. 112-120.

- 155. Culpepper, K. S. My approach to atypical melanocytic lesions / K. Culpepper,
 S. Granter, P. McKee // Journal of clinical pathology. 2004. Vol. 57, N. 11.
 P. 1121-1131.
- 156. Pellacani, G. In vivo confocal microscopy for detection and grading of dysplastic nevi: a pilot study / G. Pellacani, F. Farnetani, S. Gonzalez, C. Longo, A.M. Cesinaro, A. Casari, F. Beretti, S. Seidenari, M. Gill // J Am Acad Dermatol. – 2012. – Vol. 66, N. 3. – P. e109-121.
- 157. Vaišnorienė, I. Nevomelanocytic atypia detection by in vivo reflectance confocal microscopy / I. Vaišnorienė, R. Rotomskis, V. Kulvietis, R. Eidukevičius, V. Zalgevičienė, A. Laurinavičienė, J. Venius, J. Didžiapetrienė // Medicina (Kaunas). – 2014. – Vol. 50, N. 4. – P. 209-215.
- 158. Quintella, D. C. Histopathological diagnosis of small melanocytic lesions suspicious for malignant melanoma / D.C. Quintella, G. Campos-do-Carmo, L.P. Quintella, T. Cuzzi // Anais brasileiros de dermatologia. – 2017. – Vol. 92, N. 3. – P. 375-378.
- 159. Stefanato, C. M. The "Dysplastic Nevus" Conundrum: A Look Back, a Peek Forward / C.M. Stefanato // Dermatopathology. – 2018. – Vol. 5, N. 2. – P. 53-57.
- 160. Filosa, A. Melanoma Diagnosis: The Importance of Histopathological Report / A. Filosa, G. Filosa // Dermatopathology (Basel, Switzerland). 2018. Vol. 5, N. 1. P. 41-43.
- 161. Thompson, J. F. Textbook of melanoma / J.F. Thompson, D.L. Morton, B.B. Kroon. –, 2004of.
- 162. Elagin, V. In vivo multimodal optical imaging of dermoscopic equivocal melanocytic skin lesions / V. Elagin, E. Gubarkova, O. Garanina, D. Davydova, N. Orlinskaya, L. Matveev, I. Klemenova, I. Shlivko, M. Shirmanova, E. Zagaynova // Scientific Reports. 2021. Vol. 11, N. 1. P. 1405.
- 163. Balu, M. Distinguishing between Benign and Malignant Melanocytic Nevi by In Vivo Multiphoton Microscopy / M. Balu, K.M. Kelly, C.B. Zachary, R.M.

Harris, T.B. Krasieva, K. König, A.J. Durkin, B.J. Tromberg // Cancer Research. – 2014. – Vol. 74, N. 10. – P. 2688-2697.

- 164. Joly-Tonetti, N. An explanation for the mysterious distribution of melanin in human skin: a rare example of asymmetric (melanin) organelle distribution during mitosis of basal layer progenitor keratinocytes / N. Joly-Tonetti, J.I.D. Wibawa, M. Bell, D.J. Tobin // Br J Dermatol. 2018. Vol. 179, N. 5. P. 1115-1126.
- 165. d'Ischia, M. Melanin 'dust' or 'ghost'? / M. d'Ischia, A. Napolitano, D. Michalczyk-Wetula, P.M. Płonka // Exp Dermatol. 2016. Vol. 25, N. 7. P. 505-506.
- 166. Zalaudek, I. How to diagnose nonpigmented skin tumors: a review of vascular structures seen with dermoscopy: part I. Melanocytic skin tumors / I. Zalaudek, J. Kreusch, J. Giacomel, G. Ferrara, C. Catricalà, G. Argenziano // J Am Acad Dermatol. – 2010. – Vol. 63, N. 3. – P. 361-374.
- 167. Argenziano, G. Vascular structures in skin tumors: a dermoscopy study / G. Argenziano, I. Zalaudek, R. Corona, F. Sera, L. Cicale, G. Petrillo, E. Ruocco, R. Hofmann-Wellenhof, H.P. Soyer // Archives of dermatology. 2004. Vol. 140, N. 12. P. 1485-1489.
- 168. Kittler, H. Dermatoscopy of unpigmented lesions of the skin: a new classification of vessel morphology based on pattern analysis / H. Kittler, E. Riedl, C. Rosendahl, A. Cameron // Dermatopathology: Practical & Conceptual. 2008. Vol. 14, N. 4. P. 3.
- 169. Kreusch, J. F. Vascular patterns in skin tumors / J.F. Kreusch // Clin Dermatol.
 2002. Vol. 20, N. 3. P. 248-254.
- 170. Kopf, A. W. An Atlas of Dermoscopy / A.W. Kopf. CRC Press, 2004of.
- 171. Margolis, R. J. Comparison of acral nevomelanocytic proliferations in Japanese and whites / R.J. Margolis, A.K. Tong, H.R. Byers, M.C. Mihm, Jr. // J Invest Dermatol. – 1989. – Vol. 92, N. 5 Suppl. – P. 222s-226s.
- 172. Ayhan, E. Vascular structures in dermoscopy / E. Ayhan, D. Ucmak, Z. Akkurt
 // Anais brasileiros de dermatologia. 2015. Vol. 90, N. 4. P. 545-553.

- 173. Folkman, J. Angiogenesis / J. Folkman // Annu Rev Med. 2006. Vol. 57. –
 P. 1-18.
- 174. Mahabeleshwar, G. H. Angiogenesis in melanoma / G.H. Mahabeleshwar, T.V.
 Byzova // Seminars in oncology. 2007. Vol. 34, N. 6. P. 555-565.
- 175. Kerbel, R. S. Tumor angiogenesis / R.S. Kerbel // The New England journal of medicine. – 2008. – Vol. 358, N. 19. – P. 2039-2049.
- 176. Rofstad, E. K. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, plateletderived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts / E.K. Rofstad, E.F. Halsør // Cancer research. – 2000. – Vol. 60, N. 17. – P. 4932-4938.
- 177. Hubler Jr, W. R. Melanoma. Tumor angiogenesis and human neoplasia / W. Hubler Jr, J. Wolf Jr // Cancer. 1976. Vol. 38, N. 1. P. 187-192.
- 178. Marcoval, J. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase / J. Marcoval, A. Moreno, J. Graells, A. Vidal, J.M. Escribà, M. Garcia-Ramirez, A. Fabra // Journal of cutaneous pathology. – 1997. – Vol. 24, N. 4. – P. 212-218.
- 179. Liu, J. Observation of the early blood vessels of cutaneous malignant melanoma using Swept Source Optical Coherence Tomography Angiography (SS-OCTA)/J. Liu, J. Fan, Q. Wang, W. He, C. Dong, M. Sun, G. Shi // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2019. – Vol. 12, N. 04. – P. 1942005.
- 180. Zagaynova, E. Multiphoton imaging and OCT MA for diagnosis of human melanocytic lesions / E. Zagaynova, V. Elagin, E. Gubarkova, O. Garanina, N. Orlinskaya, V. Dudenkova, I. Shlivko, I. Klemenova, D. Davydova // SPIE BiOS. – 2019. – Vol. 10882. – P. 108820G-1-108820G-6.
- 181. Tang, J. Primary culture of human face skin melanocytes for the study of hyperpigmentation / J. Tang, Q. Li, B. Cheng, L. Jing // Cytotechnology. – 2014. – Vol. 66, N. 6. – P. 891-898.
- 182. Быков, В. Л. Частная гистология человека (краткий обзорный курс) / В.Л. Быков. 2. Санкт-Петербург: СОТИС, 1997оf.

- 183. Delevoye, C. Melanin transfer: the keratinocytes are more than gluttons / C. Delevoye // Journal of Investigative Dermatology. 2014. Vol. 134, N. 4. P. 877-879.
- 184. Wu, X. S. Melanoregulin regulates a shedding mechanism that drives melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes / X.S. Wu, A. Masedunskas, R. Weigert, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, J.A. Hammer // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012. Vol. 109, N. 31. P. E2101-E2109.
- 185. Sugata, K. Imaging of melanin distribution using multiphoton autofluorescence decay curves / K. Sugata, S. Sakai, N. Noriaki, O. Osanai, T. Kitahara, Y. Takema // Skin Research and Technology. – 2010. – Vol. 16, N. 1. – P. 55-59.
- 186. Zagaynova, E. Metabolic imaging of tumor for diagnosis and response for therapy / E. Zagaynova, M. Shirmanova, M. Lukina, V. Dudenkova, N. Ignatova, V. Elagin, I. Shlivko, V. Scheslavsky, N. Orlinskay // SPIE BiOS. – 2018. – Vol. 10498. – P. 1049804-1-1049804-8.
- 187. Laga, A. C. Surgical Pathology of Melanocytic Neoplasms / A.C. Laga // In: Pathobiology of Human Disease / Edited by L.M. McManus and R.N. Mitchell.
 – San Diego: Academic Press, 2014. – P. 3563-3591.
- 188. Lazova, R. Why do melanomas get so dark? / R. Lazova, J.M. Pawelek // Exp Dermatol. – 2009. – Vol. 18, N. 11. – P. 934-938.
- 189. Vander Heiden, M. G. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation / M.G. Vander Heiden, L.C. Cantley, C.B. Thompson // Science. – 2009. – Vol. 324, N. 5930. – P. 1029-1033.
- 190. Sun, H. Warburg Effects in Cancer and Normal Proliferating Cells: Two Tales of the Same Name / H. Sun, L. Chen, S. Cao, Y. Liang, Y. Xu // Genomics, Proteomics & Bioinformatics. – 2019. – Vol. 17, N. 3. – P. 273-286.
- 191. Walsh, A. J. Optical metabolic imaging identifies glycolytic levels, subtypes, and early-treatment response in breast cancer / A.J. Walsh, R.S. Cook, H.C. Manning, D.J. Hicks, A. Lafontant, C.L. Arteaga, M.C. Skala // Cancer Res. – 2013. – Vol. 73, N. 20. – P. 6164-6174.

- 192. Venus, M. Basic physiology of the skin / M. Venus, J. Waterman, I. McNab // Surgery (Oxford). – 2011. – Vol. 29, N. 10. – P. 471-474.
- 193. Drunkenmolle, E. Paratumoral epidermal hyperplasia: a novel prognostic factor in thick primary melanoma of the skin? / E. Drunkenmolle, W. Marsch, D. Lubbe, P. Helmbold // Am J Dermatopathol. – 2005. – Vol. 27, N. 6. – P. 482-488.
- 194. McCarty, M. F. Epidermal hyperplasia overlying human melanoma correlates with tumour depth and angiogenesis / M.F. McCarty, D.R. Bielenberg, M.B. Nilsson, J.E. Gershenwald, R.L. Barnhill, P. Ahearne, C.D. Bucana, I.J. Fidler // Melanoma Research. – 2003. – Vol. 13, N. 4. – P. 379-387.
- 195. Kodet, O. Melanoma cells influence the differentiation pattern of human epidermal keratinocytes / O. Kodet, L. Lacina, E. Krejčí, B. Dvořánková, M. Grim, J. Štork, D. Kodetová, Č. Vlček, J. Šáchová, M. Kolář, H. Strnad, K. Smetana // Molecular Cancer. – 2015. – Vol. 14, N. 1. – P. 1.