

02

Анализ спектров комбинационного рассеяния света при возбуждении на длинах волн 532 и 785 нм для экспресс-диагностики опухолей кожи

© И.Н. Сараева¹, Е.Н. Римская¹, А.В. Горевой¹, А.Б. Тимурзиева^{1,2}, С.Н. Шельгина¹,
Е.В. Переведенцева¹, С.И. Кудряшов¹

¹ Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН,
119991 Москва, Россия

² ФГБНУ „Национальный НИИ общественного здоровья им. Н.А. Семашко“,
105064 Москва, Россия

e-mail: saraevain@lebedev.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

В окончательной редакции 09.01.2024 г.

Принята к публикации 16.01.2024 г.

Микроспектроскопия комбинационного рассеяния света является важным методом диагностики рака кожи на ранних стадиях. Проведена дифференциация злокачественных новообразований кожи (базальноклеточные карциномы кожи, плоскоклеточные карциномы), доброкачественных новообразований кожи (папилломы) и здоровой кожи путем получения спектров комбинационного рассеяния *in vitro* при возбуждении на длинах волн 532 и 785 нм и их анализа с помощью метода главных компонент. Выполнено сопоставление спектральных признаков компонентом с известными пиками молекулярных колебаний; показано, что дифференциальная диагностика при длине волны возбуждения 785 нм является более надежной, чем при 532 нм, обеспечивая вероятность правильной классификации выше 90%. Предложенные методы могут быть применены для *in vivo* анализа при неинвазивной экспресс-диагностике с использованием соответствующего оборудования для получения спектров.

Ключевые слова: опухоли кожи, конфокальная сканирующая микроспектроскопия комбинационного рассеяния света, метод анализа главных компонент.

DOI: 10.61011/OS.2024.01.57543.9-24

Введение

Ранняя диагностика злокачественных новообразований кожи является чрезвычайно актуальной социально значимой проблемой, что подтверждается статистикой о заболеваемости и смертности населения в Российской Федерации и за рубежом [1]. На ранних стадиях развития патологии клинические признаки новообразования недостаточно выражены и необходима дифференциальная уточняющая диагностика, с которой без инструментальных средств способны справиться только высококвалифицированные медицинские работники. Окончательный диагноз с высокой точностью определяют только при помощи гистологических исследований хирургически удаленных тканей, что может негативно сказываться на эффективности лечения [2]. При этом существующие неинвазивные методы и инструментальные средства, широко применяемые в онкодерматологии (дерматоскопия [3], термометрия [4], высокочастотное ультразвуковое сканирование кожи [5], кроссполяризационная оптическая когерентная томография [6], спектроскопия и визуализация в терагерцовом диапазоне [7]), не обеспечивают достаточной эффективности ранней диагностики [2,8]. Разработка неинвазивных методов экспресс-диагностики злокачественных новообразований

кожи является актуальной задачей, решение которой позволит значительно повысить вероятность обнаружения рака на ранней стадии и благоприятного исхода лечения.

Происходящие изменения в структуре клеток ткани с большой точностью можно обнаружить с помощью микроспектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света, в связи с чем данная методика широко используется для дифференциации различных типов опухолей. В ряде работ сообщали об успешной дифференциации злокачественных новообразований кожи от здоровой кожи; так, авторы в [9] предложили различать спектры комбинационного рассеяния базальноклеточной карциномы (БКК), плоскоклеточной карциномы (ПКК), актинического кератоза от доброкачественных новообразований и здоровых тканей с использованием анализа главных компонент/дискриминантного анализа (PCA/DA) и частичного метода наименьших квадратов/дискриминантного анализа (PLS/DA). Полученные данные показали эффективность использования спектральных признаков липидов и белков для дифференциальной диагностики. Алгоритмы отличали спектры злокачественных новообразований кожи от доброкачественных и нормальных тканей с точностью 82.8 и 91.9% соответственно.

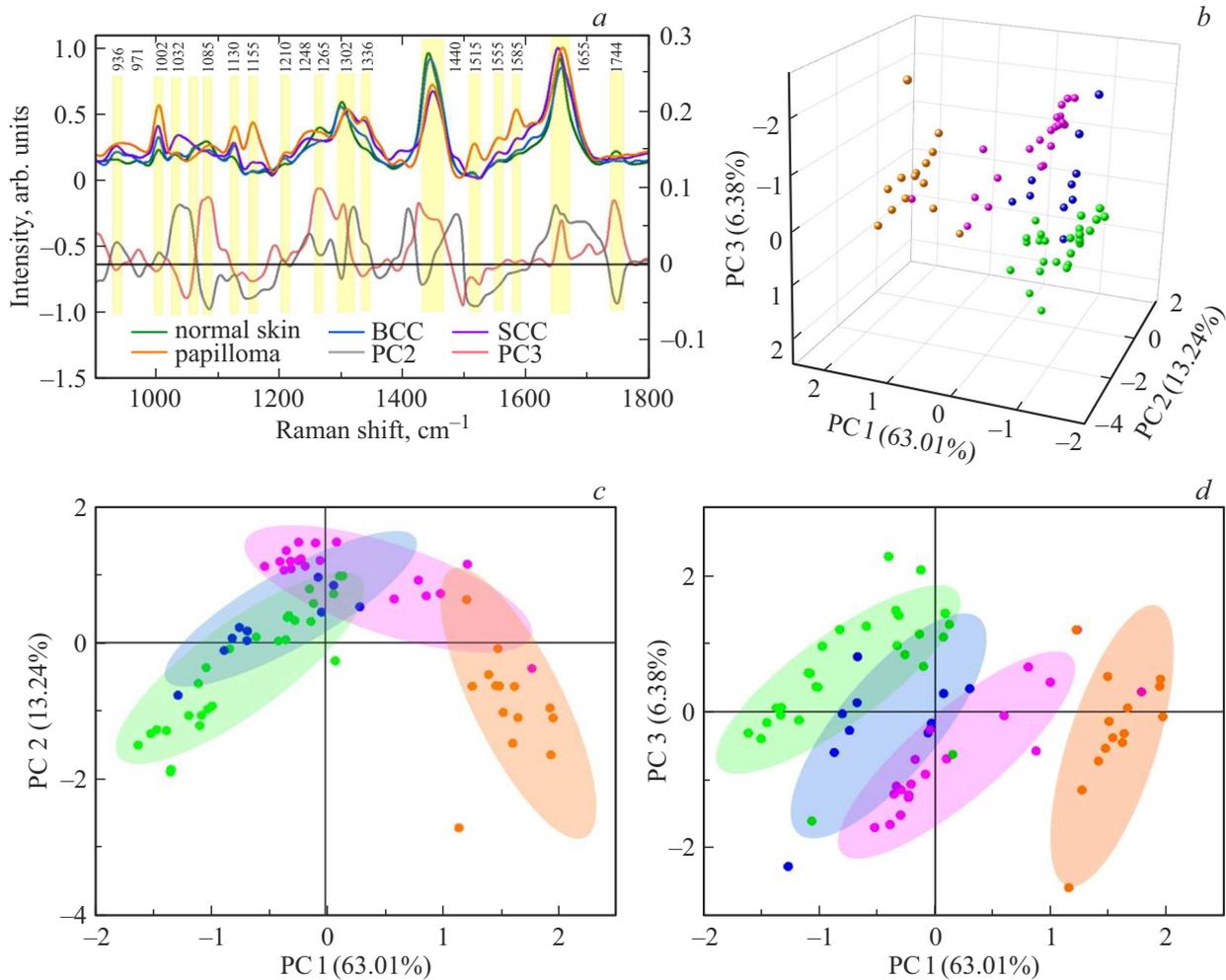


Рис. 1. (а) Спектры КР здоровой кожи (зеленая линия), БКК (синяя линия), ПКК (розовая линия) и папилломы (оранжевая линия) при лазерном возбуждении 532 nm (левая вертикальная шкала) и выделенные главные компоненты (нагрузки) (PC2, серая линия; PC3, красная линия; правая вертикальная шкала). Распределение коэффициентов (счетов) для трех первых компонент в виде трехмерного графика (b) и его проекций (c, d); цвета маркеров соответствуют цвету линий на рисунке (a).

В настоящей работе мы сравниваем эффективность метода главных компонент для анализа спектров КР света при использовании длин волн возбуждения 532 и 785 nm с целью дифференциации БКК, ПКК и папилломы от здоровой кожи. Излучение лазера с длиной волны 532 nm возбуждает интенсивную нежелательную флуоресценцию, в отличие от длины волны 785 nm, которая помогает минимизировать фоновую флуоресценцию ткани и, следовательно, может быть оптимальна для измерения свежей ткани [8,10,11]. Глубина проникновения лазерного света и степень его рассеяния зависят как от длины волны, так и от свойств тканей, поэтому перспективным представляется использование различных длин волн лазерного возбуждения для анализа кожных биомаркеров. Рассматриваемые алгоритмы являются универсальными и могут использоваться как для *in vitro* анализа хирургически удаленных частей кожи, так и для *in vivo* анализа при неинвазивной диагностике

с использованием соответствующего оборудования для получения спектров КР света.

Экспериментальная часть

В качестве исследуемых образцов были взяты хирургически удаленные участки здоровой кожи и опухоли с интактной тканью (5 образцов здоровой кожи, 7 БКК, 5 ПКК, 3 папилломы). Для каждого образца было измерено от 10 до 15 спектров.

Спектры КР измерялись с помощью спектрометра Renishaw inVia Basis (inVia InSpect, Renishaw) с длинами волн возбуждения 532 и 785 nm. При измерении спектров с длиной волны возбуждения 532 nm использовалась мощность до 20 mW, время накопления составляло 2 s. Измерения с длиной волны возбуждения 785 nm осуществлялись при мощности 45 mW при времени накопления 10 s [8]. В случае длины волны возбуждения

Таблица 1. Основные полосы молекулярных колебаний в спектрах КР света при длине волны возбуждения 532 нм и соответствующие значения на графиках главных компонент

КР полоса, cm^{-1}	Расшифровка	Содержание	PC2	PC3	Источник
936	$\nu(\text{CC})$	Протеины (α -helix), коллаген	+	-	[12]
971	$\nu(\text{C}-\text{C})$	Фосфолипиды	-	+	[13]
1002	$\nu(\text{C}-\text{C})$, фенилаланин	Протеины (<i>Phe</i>), каротиноиды	+	-	[8,11-13]
1032	$\delta(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, фенилаланин, пролин	Протеины	+		[13]
1085	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$	Липиды, протеины, нуклеиновые кислоты	-	+	[11]
1130	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$	Липиды, протеины, керамиды		-	[8,11,14]
1155	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$	Протеины, каротиноиды	-	-	[11,14]
1210	$\nu(\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5)$, фенилаланин, тимин, аденин, амид III	Протеины (<i>Phe</i>)			[11,15]
1248	амид III	Протеины (α -helix), коллаген, эластин	+		[16]
1265	амид III (α -helix), $\nu(\text{CN})$	Протеины (α -helix), коллаген, эластин, кератин		+	[14,16]
1301	$\tau(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Липиды, протеины, триолеин	→	←	[11,14,16,17]
1336	$\omega(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Липиды, протеины, эластин нуклеиновые кислоты		-	[11,14]
1440	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$	Липиды, протеины, триолеин	→	←	[11,14,16]
1515	$\nu(\text{C}=\text{C})$	Каротиноиды	-		[11,18]
1555	$\nu(\text{C}=\text{C})$	Триптофан			[8,14,15]
1585	$\delta(\text{C}=\text{C})$, $\nu(\text{C}=\text{C})$	фенилаланин, Протеины (<i>Phe</i>)			[8,14,19,20]
1655	амид I, $\nu(\text{C}=\text{C})$	Липиды, протеины (α -helix), триолеин	←	+	[8,11,14,16,21]
1744	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Липиды		→	[8,11,22]

532 нм следует применять меньшую мощность лазера и более короткую экспозицию, чтобы избежать разрушения биологических образцов. Данные условия работы были выбраны как оптимальные, не приводящие к заметным разрушениям образцов и обеспечивающие хороший уровень соотношения сигнал/шум. Морфология образцов тканей кожи оставалась без видимых изменений и не имела признаков лазерного рубцевания после лазерного воздействия.

Обработка спектров заключалась в удалении фона флуоресценции и их сглаживании в программном пакете OriginPro (OriginPro 2019b 9.6.5.169). Спектры образцов были разделены на группы по результатам гистопатологии, после чего был использован анализ главных компонент. PCA — это метод, который преобразует возможно коррелирующие переменные в меньшее количество некоррелированных переменных — главных компонент. Графики полученных главных компонент (нагрузок) в зависимости от значений волновых чисел помогают описать биохимические различия в спектрах КР света и иллюстрировать различные группы спектров,

соответствующих нормальной коже и опухолям. Мы рассмотрели основные известные из литературы полосы в спектрах КР света, характерные для различных колебаний молекул биотканей, и сопоставили эту информацию со значениями графиков главных компонент в соответствующих спектральных полосах.

Результаты и обсуждение

В данном разделе приведены результаты PCA для спектров КР света образцов нормальной кожи и опухолей кожи, измеренных при возбуждении на длинах волн 532 и 785 нм, и результаты дифференциации на основе первых трех главных компонент.

1. Анализ PCA при лазерном возбуждении с длиной волны 532 нм

Расшифровка спектральных линий производилась на основании литературных данных [8–17], детали приведены в табл. 1. Данные линии, полученные средние спектры КР для каждого типа образцов при длине волны

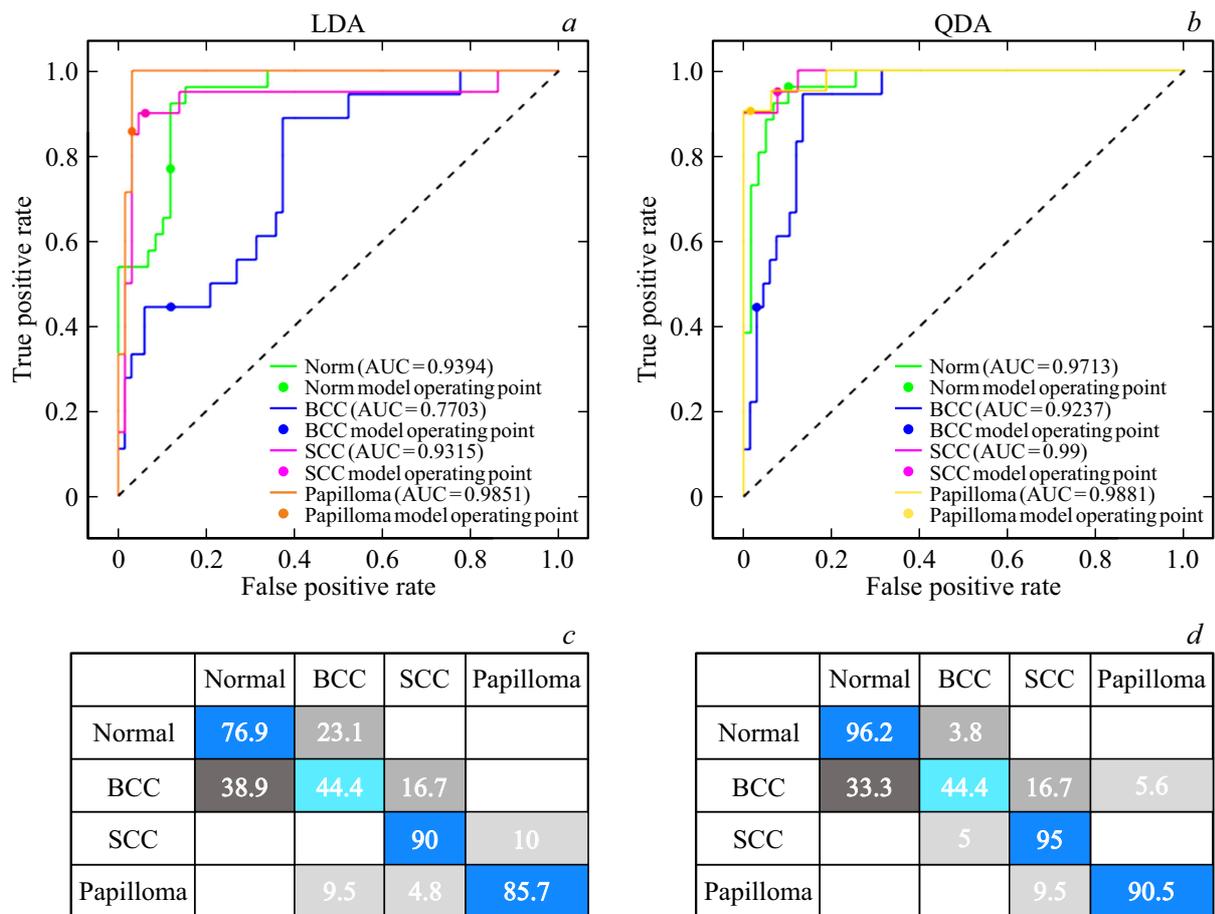


Рис. 2. Классификация образцов здоровой кожи, БКК, ПКК и папилломы *in vitro* при лазерном возбуждении 532 nm с использованием линейного (a, c) и квадратичного (b, d) дискриминантного анализа. ROC — кривые со значениями AUC для здоровой кожи, БКК, ПКК и папилломы (a, b); c, d — соответствующие матрицы классификации (значения указаны в процентах).

возбуждения 532 nm, а также графики главных компонентов (нагрузок) #2 (PC2) и #3 (PC3) показаны на рис. 1, a. Главный компонент #1 содержит спектральные полосы, характерные для всех образцов, и не показывает значительного различия между группами [18].

Таким образом, положительная составляющая PC2 в основном включает в себя полосы (отмечены знаком „+“ в столбце PC2 табл. 1), относящиеся к протеинам, и коррелирует со спектральными особенностями БКК и ПКК (средние коэффициенты (счета) равны 0.13 и 1.05 соответственно); отрицательная составляющая — полосы (отмечены знаком „-“ в табл. 1), относящиеся к протеинам и липидам, и коррелирует с спектрами КР света здоровой кожи и папилломы (средние коэффициенты (счета) равны -0.38 и -0.89 соответственно). Положительная составляющая PC3 (полосы, отмеченные знаком „+“ в столбце PC3 табл. 1) соотносится с протеинами и липидами и в основном представляет область разброса счетов здоровой кожи (средний коэффициент 0.78); отрицательная — с протеинами и каротиноидами, и ассоциирована с новообразованиями кожи (средние коэффициенты -0.33, -0.65 и -0.26

для БКК, ПКК и папилломы соответственно). Кроме того, компоненты PC2 и PC3 отвечают за сдвиг максимумов в полосах 1302, 1440 и 1650 cm^{-1} (отмечены знаками „→“ и „←“ в табл. 1).

Чтобы подтвердить значимость и достаточность выделенных спектральных признаков для дифференциации нормальной кожи и опухолей, была оценена эффективность классификации с помощью *MATLAB Classification Learner* (R2022b, *MathWorks*). Был применен линейный и квадратичный дискриминантный анализ (LDA и QDA соответственно) [8,23] для трех первых главных компонентов (PC) и оценена их эффективность с помощью матриц классификации и кривых ROC (*receiver operating characteristic*, рабочие характеристики приемника) [8,24–27]. Результаты для четырех классов тканей кожи (здоровая кожа, БКК, ПКК и папиллома) представлены на рис. 2.

ROC-кривые (рис. 2, a и b) отображают изменения уровня истинно положительных результатов по сравнению с уровнем ложноположительных результатов с различными порогами разделения для каждого класса образцов. Оценки ROC AUC (*area under curve*, площадь

Таблица 2. Основные полосы молекулярных колебаний в спектрах КР света при длине волны возбуждения 785 нм и соответствующие значения на графиках главных компонент

КР полоса, cm^{-1}	Расшифровка	Содержание	PC2	PC3	Источник
936	$\nu(\text{CC})$	Протеины (α - <i>helix</i>), коллаген	+	+	[12]
971	$\nu(\text{C}-\text{C})$	Фосфолипиды	+	-	[13]
1002	$\nu(\text{C}-\text{C})$, фенилаланин	Протеины (<i>Phe</i>), каротиноиды		-	[8,11-13]
1032	$\delta(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, фенилаланин, пролин	Протеины	←	+	[13]
1062	$\nu(\text{CC})$	Липиды, керамиды	+		[14,16]
1082	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$	Фосфолипиды, нуклеиновые кислоты, триолеин		-	[11]
1130	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$	Липиды, протеины, керамиды			[8,11,14]
1155	$\nu(\text{CC})$, $\nu(\text{CN})$	Протеины, ароматические амины	-	-	[11,14]
1210	$\nu(\text{C}-\text{C}_6\text{H}_5)$, фенилаланин, тимин, аденин, амид III	Протеины (<i>Phe</i>)		+	[11,15]
1248	амид III	Протеины (α - <i>helix</i>), коллаген, эластин			[16]
1265	амид III (α - <i>helix</i>), $\nu(\text{CN})$	Протеины (α - <i>helix</i>), коллаген, эластин, кератин		-	[14,16]
1301	$\tau(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Липиды, протеины, триолеин	+	-	[11,14,16,17]
1336	$\omega(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Липиды, протеины, нуклеиновые кислоты, эластин			[11,14]
1440	$\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$	Липиды, протеины, триолеин	←	→	[11,14,16]
1517	$\nu(\text{C}=\text{C})$	Каротиноиды	-	-	[11,18]
1555	$\nu(\text{C}=\text{C})$	Триптофан			[8,14,15]
1582	$\delta(\text{C}=\text{C})$, фенилаланин, $\nu(\text{C}=\text{C})$	Протеины (<i>Phe</i>)			[8,14,19,20]
1655	амид I, $\nu(\text{C}=\text{C})$	Липиды, протеины (α - <i>helix</i>), триолеин	←	←	[8,11,14,16,21]
1744	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Липиды	+	-	[8,11,22]

под кривой) указывают на общую эффективность метода, в частности, значения для здоровой кожи, БКК, ПКК и папилломы составляли 0,94, 0,77, 0,93 и 0,99 соответственно при использовании LDA и немного выше — 0,97, 0,92, 0,99 и 0,99 соответственно для QDA. Матрицы классификации (рис. 2, *c* и *d*) показывают вероятность отнесения к тому или иному классу по итогам классификации (прогнозируемый класс) в зависимости от истинного класса для оптимальных порогов разделения; диагональные значения соответствуют истинным показателям классификации для каждого класса. Таким образом, ПКК было верно диагностировано в 90% (LDA) и 95% (QDA) случаев, тогда как здоровая кожа была правильно классифицирована в 76,9% (LDA) и 96,2% (QDA) случаев. Частичное перекрытие кластера точек, принадлежащих классу БКК, с кластерами, представляющими здоровую кожу и ПКК (рис. 1), затрудняет их эффективное разделение с помощью дискриминантного анализа, что приводит к довольно низкой степени верной классификации (44,4%) для БКК.

2. Анализ PCA при лазерном возбуждении с длиной волны 785 нм

Результаты сопоставления полос молекулярных колебаний со значениями главных компонент приведены в табл. 2. Средние спектры КР для каждого типа образцов при длине волны возбуждения 785 нм и графики главных компонент (нагрузок) #2 (PC2) и #3 (PC3) показаны на рис. 3, *a*.

Как видно из табл. 2 (отмечено знаками „+“ и „-“) положительная составляющая PC2 включает в себя полосы протеинов и липидов, характерные для здоровой кожи и БКК (средние коэффициенты (счета) равны 0,92 и 0,62 соответственно); отрицательная — компоненты протеинов и каротиноидов, полосы которых совпадают со спектральными особенностями ПКК (средний коэффициент -0,28) и папилломы (-1,32). Положительную составляющую PC3 можно отнести к протеинам, она в значительной мере отражает особенности ПКК (средний коэффициент 1,6) и БКК (0,21); отрицательная составляющая включает липиды, протеины и каротиноиды и коррелирует со спектральными особенностями здоровой кожи и папилломы (средние коэффициенты -0,48 и -0,77 соответственно).

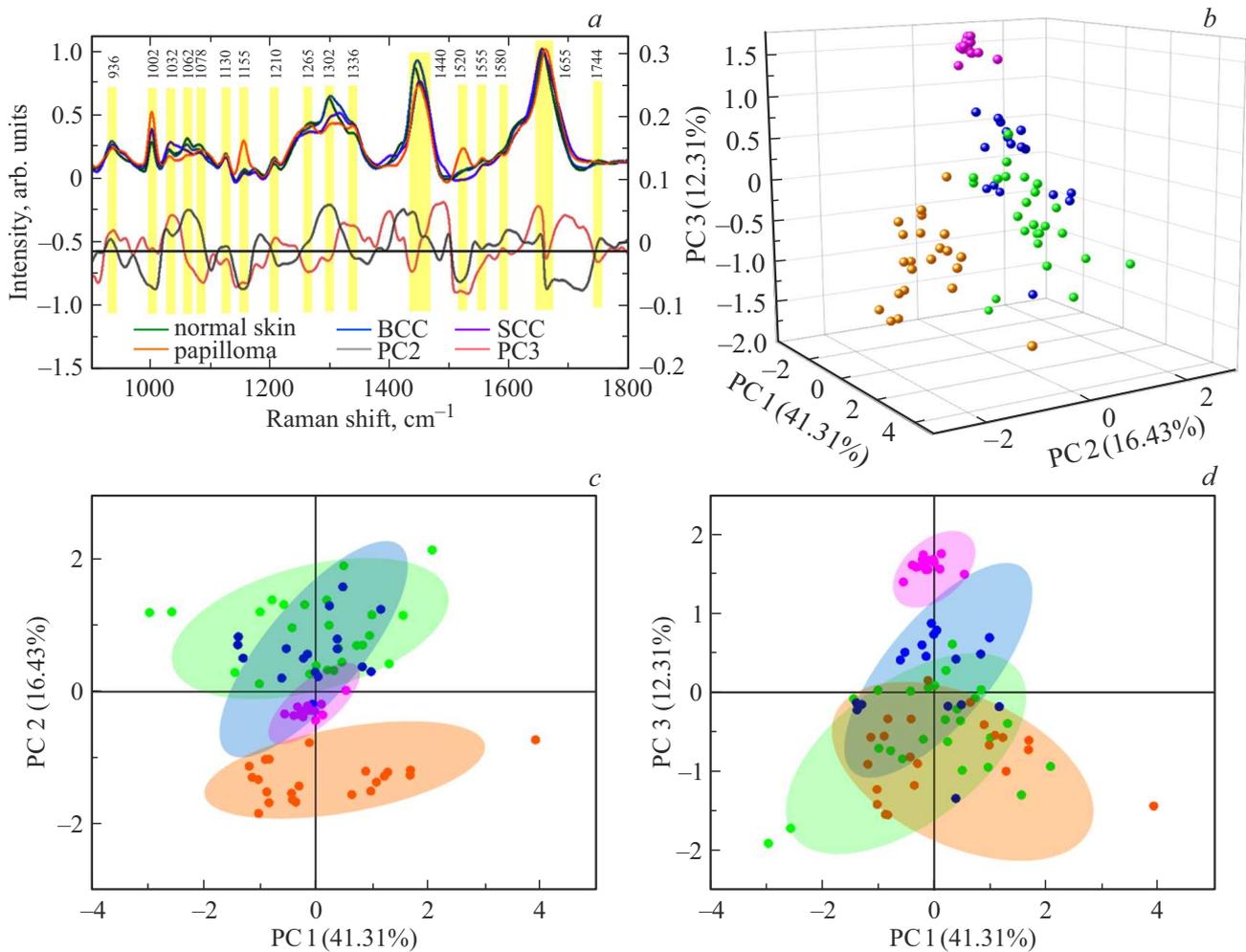


Рис. 3. (а) Спектры КР здоровой кожи (зеленая линия), БКК (синяя линия), ПКК (розовая линия) и папилломы (оранжевая линия) при лазерном возбуждении 785 nm (левая вертикальная шкала) и выделенные главные компоненты (нагрузки) (PC2, серая линия; PC3, красная линия; правая вертикальная шкала). Распределение коэффициентов (счетов) для трех первых компонент в виде трехмерного графика (b) и его проекций (c, d); цвета маркеров соответствуют цвету линий на рисунке (a).

Аналогично данным, полученным при длине волны возбуждения 532 nm, спектры КР света образцов разных классов при длине волны возбуждения 785 nm демонстрируют существенные различия, что позволило выделить репрезентативные признаки с помощью PCA и эффективно классифицировать здоровую кожу и опухоли с помощью LDA и QDA для трех первых PC (рис. 4). ROC-кривые, представленные на рис. 4, a и b, указывают на то, что классификация с использованием спектров при длине волны возбуждения 785 nm более надежна, чем классификация, основанная на данных, полученных при 532 nm. Действительно, показатели ROC AUC LDA для классов здоровой кожи, БКК, ПКК и папилломы составляли 0.98, 0.99, 0.996 и 1 соответственно; для QDA соответствующие значения были 0.996, 0.99, ~ 1 и 1. Согласно матрицам классификации (рис. 4, c и d), ПКК и папиллому можно правильно отличить от нормальной кожи и БКК во всех случаях для обоих типов анализа. Истинные показатели классификации для здоровой кожи

и БКК составили 76 и 82.4% соответственно для LDA и достигли 92 и 88.2% для QDA. Несмотря на перекрытие областей, соответствующих разным классам в проекциях PC (рис. 3, c и d), в трехмерном пространстве их можно разделить (рис. 3, b), что приводит к лучшим показателям классификации БКК и здоровой ткани кожи, чем при 532 nm.

Заключение

В работе выполнен анализ *in vitro* спектров КР света новообразований кожи с использованием метода главных компонент и интерпретация выделенных спектральных признаков в соответствии с известными данными о молекулярных колебаниях. Согласно полученным результатам, при длине волны возбуждения 532 nm положительная составляющая компонента PC2 в основном включает белки и коррелирует с признаками

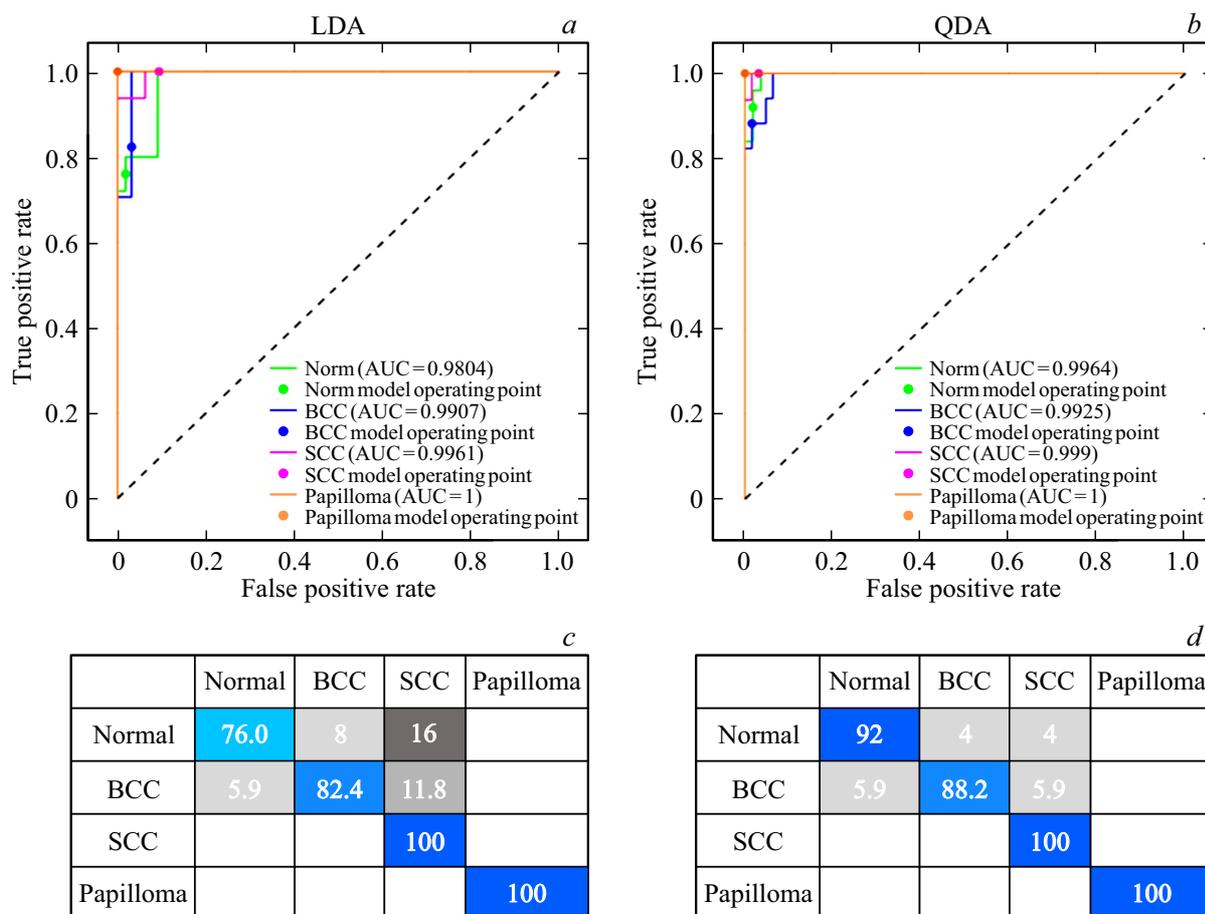


Рис. 4. Классификация образцов здоровой кожи, БКК, ПКК и папилломы *in vitro* при лазерном возбуждении 785 нм с использованием линейного (*a, c*) и квадратичного (*b, d*) дискриминантного анализа. ROC-кривые со значениями AUC для здоровой кожи, БКК, ПКК и папилломы (*a, c*); соответствующие матрицы классификации (значения указаны в процентах) (*c, d*).

БКК и ПКК, а отрицательная — протеины и липиды, коррелируя со спектральными особенностями здоровой кожи и папилломы. Положительная составляющая РС3 включает протеины и липиды, спектральные признаки которых соответствуют здоровой коже; отрицательная составляющая содержит признаки протеинов и каротиноидов, связанные с опухолями. При длине волны возбуждения 785 нм положительная составляющая РС2 соответствует протеинам и липидам и включает спектральные особенности здоровой кожи и БКК; отрицательная составляющая — протеинам и каротиноидам, включая признаки ПКК и папилломы. Положительная составляющая РС3 включает протеины, соответствующие признакам ПКК и БКК, тогда как отрицательная указывает на липиды, протеины и каротиноиды, соответствующая здоровой коже и папилломе. Анализ отдельных спектральных полос показывает сходство выделенных признаков при возбуждении лазерным излучением 532 и 785 нм, однако для 785 нм отношение сигнал-шум выше за счет меньшей фоновой флуоресценции. Возбуждение длиной волны 785 нм приводит к значительному увеличению интенсивности КР света определенных

мод колебаний, относящихся к хромофорам, которые поглощают вблизи этой длины волны возбуждения. В результате различия между спектрами КР нормальной кожи и опухолей (БКК, ПКК) могут быть связаны с изменением структуры протеинов в клетках опухоли, а также со снижением интенсивности липид-специфичных полос. Вследствие этого дифференциальная диагностика с использованием спектров КР, полученных при длине волны возбуждения 785 нм, является более надежной, чем при 532 нм, позволяя достичь вероятности правильной классификации выше 92%. Рассмотренные методы могут быть аналогично использованы для *in vivo* анализа и дифференциации и, при наличии соответствующего оборудования для измерения спектров КР света быть основой для создания автоматизированных комплексов неинвазивной экспресс-диагностики новообразований кожи. Дальнейшее развитие инструментов для ранней диагностики методами спектроскопии КР света может быть связано с обработкой мультиспектральных данных (при разных длинах волн возбуждения) и расширением диапазона анализируемых пиков колебаний.

Соблюдение этических стандартов

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Межвузовским этическим комитетом МГМСУ им. Евдокимова Минздрава России (Москва, Россия, код протокола 3, 16.03.2023) для исследований на человеке. Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании.

Финансирование работы

Авторы признательны Российскому научному фонду за финансовую поддержку данных исследований в рамках проекта № 23–25–00249.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal. CA: a cancer journal for clinicians, **73**, 17 (2023). DOI: 10.3322/caac.21763
- [2] Е.Н. Римская, А.О. Щадько, И.А. Аполлонова, А.П. Николаев, А.Н. Брико, И.А. Дешин, П.Ю. Бережной, К.Г. Кудрин, К.И. Зайцев, В.В. Тучин, И.В. Решетов. Опт. и спектр., **126** (5), 584 (2019). DOI: 10.21883/OS.2019.05.47657.6-19
- [3] A. Eggermont, A. Spatz, C. Robert. The Lancet, **1** (383), 816 (2014). DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60802-8
- [4] J. Muller, J. Hartmann, C. Bert. Phys. in Medicine & Biology, **61** (7), 2646 (2016). DOI: 10.1088/0031-9155/61/7/2646
- [5] V. Neuschmelting, N.C. Burton, H. Lockau, A. Urich, S. Harmsen, V. Ntziachristos, M.F. Kircher. Photoacoustics, **4** (1), 1 (2016). DOI: 10.1016/j.pacs.2015.12.001
- [6] N. MacKinnon, F. Vasefi, N. Booth, D.L. Farkas. Proc. of SPIE, **9711** (1), 971111 (2016). DOI: 10.1117/12.2222415
- [7] K.I. Zaytsev, K.G. Kudrin, V.E. Karasik, I.V. Reshetov, S.O. Yurchenko. Appl. Phys. Lett., **106** (5), 053702 (2015). DOI: 10.1063/1.4907350
- [8] E. Rimskaya, S. Shelygina, A. Timurzieva, I. Saraeva, E. Perevedentseva, N. Melnik, K. Kudrin, D. Reshetov, S. Kudryashov. International J. Mol. Sci., **24**, 14748 (2023). DOI: 10.3390/ijms241914748
- [9] G.F. Silveira, D.M. Strottmann, L. de Borba, D.S. Mansur, N.I.T. Zanchin, J. Bordignon, C.N. Duarte dos Santos. Clinical and Experimental Immunology, **183** (1), 114 (2016). DOI: 10.1111/cei.12701
- [10] E.G. Borisova, I.A. Bratchenko, Y.A. Khristoforova, L.A. Bratchenko, T.I. Genova, A.I. Gisbrecht, A.A. Moryatov, S.V. Kozlov, P.P. Troyanova, V.P. Zakharov. Optical Engineering, **59**, 061616 (2020). DOI: 10.1117/1.OE.59.6.061616
- [11] A. Synytsya, M. Judexova, D. Hoskovec, M. Miskovicova, L. Petruzalka. J. Raman Spectrosc., **45**, 903 (2014). DOI: 10.1002/jrs.4581
- [12] M.S. Bergholt, W. Zheng, K. Lin, Z. Huang, K.Y. Ho, K.G. Yeoh, Mi. Teh, J.B.Y. So. J. Biomedical Optics, **16** (3), 037003 (2011). DOI: 10.1117/1.3556723
- [13] L. Shang, J. Tang, J. Wu, H. Shang, X. Huang, Y. Bao, Z. Xu, H. Wang, J. Yin. Biosensors, **13**, 65 (2023). DOI: 10.3390/bios13010065
- [14] S. Tfaili, C. Gobinet, G. Josse, J.F. Angiboust, M. Manfait, O. Piot. Analyst, **137**, 3673 (2012). DOI: 10.1039/C2AN16292J
- [15] Z.W. Huang, A. McWilliams, H. Lui, D.I. McLean, S. Lam, H. Zeng. International J. Cancer, **107** (6), 1047 (2003). DOI: 10.1002/ijc.11500.
- [16] X. Feng, A.J. Moy, H.T. Nguyen, J. Zhang, M.C. Fox, K.R. Sebastian, J.S. Reichenberg, M.K. Markey, J.W. Tunnell. Biomedical Optics Express, **8**, 2835 (2017). DOI: 10.1364/BOE.8.002835
- [17] R. Vyumvuhore, A. Tfayli, H. Duplan, A. Delalleau, M. Manfait, A. Baillet-Guffroy. Analyst, **138**, 4103 (2013). DOI: 10.1039/c3an00716b
- [18] L. Silveira, S. Sathaiah, R.A. Zangaro, M.T. Pacheco, M.C. Chavantes, C.A. Pasqualucci. Lasers in Surgery and Medicine, **30** (4), 290 (2002). DOI: 10.1002/lsm.10053
- [19] P.J. Caspers, H.A. Bruining, G.J. Puppels, G.W. Lucassen, E.A. Carter. J. Investigative Dermatology, **116**, 434 (2001). DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01258.x
- [20] J. Anastassopoulou, M. Kyriakidou, E. Malesiou, M. Rallis, T. Theophanides. In Vivo, **33**, 567 (2019). DOI: 10.21873/invivo.1151.
- [21] M. Gniadecka, H.C. Wulf, N. Nymark Mortensen, O. Faurskov Nielsen, D.H. Christensen. J. Raman Spectrosc., **28**, 125 (1997). DOI: 10.1002/(SICI)1097-4555(199702)28:2/3<125::AID-JRS65>3.0.CO;2-%23
- [22] P. Rekha, P. Aruna, E. Brindha, D. Koteeswaran, M. Baludavid, S. Ganesan. J. Raman Spectrosc., **47**, 763 (2016). DOI: 10.1002/jrs.4897
- [23] C. Yorucu, K. Lau, S. Mittar, N.H. Green, A. Raza, I.U. Rehman, S. MacNeil. Appl. Spectrosc. Rev., **51** (4), 243 (2016). DOI: 10.1080/05704928.2015.1126840
- [24] S. Sigurdsson, P.A. Philipsen, L.K. Hansen, J. Larsen, M. Gniadecka, H.C. Wulf. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, **51**, 1784 (2004). DOI: 10.1109/TBME.2004.831538
- [25] X.Y. Liu, P. Zhang, L. Su, L.M. Wang, X.D. Wei, H.Q. Wang, T.F. Ling. J. Nanoscience and Nanotechnology, **18**, 6776 (2018). DOI: 10.1166/jnn.2018.15510
- [26] I.A. Bratchenko, L.A. Bratchenko, A.A. Moryatov, Y.A. Khristoforova, D.N. Artemyev, O.O. Myakinin, A.E. Orlov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov. Experimental Dermatology, **30**, 652 (2021). DOI: 10.1111/exd.14301
- [27] C.A. Lieber, S.K. Majumder, D. Billheimer, D.L. Ellis, A.J. Mahadevan-Jansen. Biomedical Opt., **13**, 024013 (2008). DOI: 10.1117/1.2899155