

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»



На правах рукописи

Николаев Виктор Владимирович

АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОЛЛАГЕНА В ЛИМФЕДЕМАТОЗНОЙ  
КОЖЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДВУХФОТОННОЙ МИКРОСКОПИИ И  
МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

1.5.2 – Биофизика

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель  
доктор физико-математических наук, профессор  
Кистенев Юрий Владимирович

Томск 2022

## Оглавление

Список основных сокращений .....	4
Глава 1. Основные сведения о коже, коллагене и эластине, их функциях, характеристиках, методах визуализации и моделирования .....	15
Раздел 1.1. Структура, функции и оптические характеристики кожи .....	15
1.1.1 Структура, функции кожи .....	15
1.1.2. Оптические характеристики кожи .....	20
1.1.3 Сравнение строения кожи человека и лабораторных животных.....	23
Раздел 1.2. Характеристики коллагена .....	23
1.2.1 Строение коллагена.....	23
1.2.2. Оптические характеристики коллагена I типа.....	25
Раздел 1.3. Характеристики эластина .....	26
1.3.1 Строение эластина.....	26
1.3.2. Оптические характеристики эластина.....	27
Раздел 1.4. Трансформация кожи, коллагена и эластина при лимфедеме .....	28
Раздел 1.5. Инструментальные методы визуализации коллагена и эластина <i>in vivo</i> .....	30
1.5.1 Двухфотонная микроскопия.....	30
1.5.2 Когерентная антистоксовая рамановская спектроскопия .....	31
Раздел 1.6. Аналитические методы и подходы количественного описания 2D и 3D изображений.....	32
1.6.1 Определение понятия вектора признаков .....	32
1.6.2 Способы извлечения векторов признаков.....	32
Раздел 1.7. Методы классификации векторов признаков .....	38
Заключение к главе 1 .....	41
Глава 2. Выбор и обоснование аналитических и экспериментальных методик <i>in vivo</i> визуализации структуры коллагена и эластина методом ДФМ. ....	42
Раздел 2.1 Разработка протокола исследования кожи методом ДФМ.....	42
Раздел 2.2 Методы предварительной обработки данных.....	49
2.2.1 Подходы к обработке FLIM данных .....	49
2.2.2 Применение фильтрации для улучшения ДФМ изображений.....	52
Раздел 2.3 Выделение информативных признаков.....	63

2.3.1 Индекс старения как характеристика состояния кожи .....	63
2.3.2 Адаптация метода гистограмм ориентированных градиентов для количественного описания пространственной структуры коллагена.....	64
Раздел 2.4. Заключение к главе 2.....	68
Глава 3. Разработка предиктивной модели для диагностики лимфедематозной ткани с использованием ДФМ и машинного обучения .....	70
Раздел 3.1 Описание групп участников .....	70
Раздел 3.2 Протокол исследования кожи человека <i>in vivo</i> методом ДФМ .....	71
Раздел 3.3 Применение SAAID для оценки состояния дермы .....	73
Раздел 3.4 Анализ структуры коллагена в лимфедематозной коже с использованием градиентных методов .....	75
Раздел 3.5 Применение метода опорных векторов для построения прогностической модели с вектором признаков на базе адаптированного метода HOG.....	79
Раздел 3.6 Разработка метода классификации лимфедемы на основании FLIM данных.....	80
Раздел 3.7 Заключение к главе 3.....	84
Глава 4. Разработка модели лимфедемы на мелких животных .....	86
Раздел 4.1. Обзор литературы по теме создания модели лимфедемы.....	86
Раздел 4.2. Протокол создания модели лимфедемы на задних конечностях крыс ...	88
Раздел 4.3. Протокол исследования задних конечностей крыс <i>in vivo</i> методом ДФМ.....	91
Раздел 4.4. Результаты исследования длины окружности задней конечности при лимфедеме .....	93
Раздел 4.5. Результаты гистологического исследования .....	94
Раздел 4.6. Результаты исследования модели лимфедемы методом ДФМ.....	100
Раздел 4.7. Заключение к главе 4.....	102
Заключение.....	103
Приложение 1 .....	105
Список литературы.....	106

## Список основных сокращений

**АФ** – автофлуоресценция

**ВДФ** – время-доза-фракционирование

**ВКМ** – внеклеточный матрикс

**ГВГ** – генерация второй гармоники

**ДФМ** – двухфотонная микроскопия

**ИПФ/IRF** – импульсной переходной функцией / impulse response function

**КАРС** – когерентная антистоксовая рамановская спектроскопия

**МГК** – метод главных компонент

**МОВ** – метод опорных векторов

**ИНС** – искусственные нейронные сети

**ОКТГ** – общее количество точек градиента

**РБФ** – радиальная базисная функция

**FLIM** – флуоресцентная микроскопия с временным разрешением (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)

**HOG** – гистограмма ориентированных градиентов (Histogram of Oriented Gradients)

**NADH** – никотинамидадениндинуклеотид

**SAAD** – индекс старения дермы (Second harmonic generation to Autofluorescence Aging Index of Dermis)

**SIFT** – масштабно-инвариантное преобразование особенностей текстуры (Scale-invariant feature transform)

## Введение

### Актуальность исследования

Лимфедема — заболевание, связанное с нарушением работы лимфатической системы [1]–[4]. Данное заболевание характеризуется скоплением жидкости в тканях, что приводит к набуханию (отеку) и фиброзным нарушениям как в дерме, так и подкожной жировой клетчатке. Лимфедема делится на первичную и вторичную. Первичная лимфедема обусловлена врожденной аномалией лимфатической системы в сочетании с аномальным структурным развитием, вызванным мутантными генами [5]. Вторичная лимфедема – приобретенная, возникает, например, после повреждения или хирургического удаления лимфатического узла, радиотерапии, паразитических инфильтраций, инфекции [2], [4]–[6]. По данным Всемирной организации здравоохранения в мире насчитывается более 300 млн. людей, страдающих лимфедемой; 96% больных лимфедемой - люди трудоспособного возраста [7]. Данное заболевание является прогрессирующим и без должного лечения может привести к полной инвалидности больного. Таким образом, диагностика лимфедемы на ранних стадиях является важным шагом в ее терапии [4].

В клинической практике используются следующие методы диагностики лимфедемы [8]. Прямая лимфография основана на введении контрастных веществ непосредственно в лимфатический сосуд [9]. Недостатком является риск его повреждения. Непрямая лимфосцинтиграфия основана на создании депо радиоактивно меченного контрастного вещества в мягких тканях или паренхиме органа с последующим проникновением в лимфатические сосуды [10], [11]. Этот метод позволяет анализировать структуру лимфососудов и транспорт лимфы. Недостатком является использование радиоактивных препаратов и отсутствие стандартизации протоколов использования радио-контрастных веществ [12], [13].

Количественная оценка отека основана на регистрации увеличения объема конечности, может быть реализована методом вытеснения [14], измерением объема конечности методом усеченных конусов [15], с использованием оптоэлектронной перометрии [16], [17]. Метод вытеснения включает измерение объема конечности путем ее погружения в емкость с водой и измерения объема вытесненной жидкости. До недавнего времени этот подход являлся «золотым стандартом» диагностики лимфедемы [16]. Полезность таких методов для раннего выявления лимфедемы сомнительна, потому что, латентная фаза лимфедемы предшествует отеку [4], [17].

Для диагностики лимфедемы используют УЗИ, лазерную доплеровскую флоуметрию, магнитно-резонансную томографию (МРТ), компьютерную томографию (КТ), часто в сочетании с контрастными агентами [18]–[22]. Эти методы позволяют анализировать накопление жидкости, фиброз, изменение плотности ткани [5], [17]. Двухэнергетическая рентгеновская

абсорбциометрия позволяет оценить вклад жирового компонента в общее увеличение объема ткани [23], [24]. Однако указанные методы либо технологически сложны (например, МРТ), либо достаточно дороги, например КТ, часто требуют специальных помещений (например, изотопная непрямая лимфосцинтиграфия) [17].

Биоимпедансометрия является перспективным неинвазивным методом измерения внеклеточной жидкости [25]. Анализ биоэлектрического импеданса был использован в качестве предиктора возникновения отека верхней конечности при раке молочной железы [26], [27]. Недостатком метода является вариабельность полученных результатов в зависимости от степени гидратации [28], изменения температура тела, скорости течения крови по сосудам [29], расположения датчиков [30], [31].

Гистопатологическое исследование дает подробную информацию о процессе ремоделирования ткани при лимфедеме, но имеет очевидные недостатки.

Таким образом, актуальна разработка методов ранней неинвазивной визуализации тканей *in vivo* с пространственным разрешением, близким к гистологическому. В данной области перспективны методы оптической визуализации.

Лимфохромия представляет собой инфракрасную флуоресцентную визуализацию лимфатических сосудов с использованием красителя индоцианина зеленого, которая обеспечивает визуализацию даже мелких лимфатических сосудов, но также основана на инвазивных инъекциях красителя индоцианина зеленого в лимфатический сосуд [32]–[35].

Хроническая лимфедема характеризуется изменением структуры кожного коллагена, так как развитие лимфатического отека сопровождается развитием фиброза в дерме [36], [37], [37], [38]. Развитие лимфедемы также влияет на количественное отношение коллагена и эластина в папиллярной дерме. Данные диагностические признаки требуют применения специальных методов оптической микроскопии, чувствительных к изменению пространственной структуры коллагена и содержанию эластина. В первую очередь, к ним относится двухфотонная микроскопия (ДФМ). Однако применение данного метода для диагностики лимфедемы требует развития, соответствующих экспериментальных и аналитических методик. Наиболее актуальным подходом к анализу данных ДФМ, с учетом сложного характера трансформации тканей при лимфедеме, отсутствии ведущих статистических значимых признаков, является машинное обучение.

Исследования в данном направлении актуальны и определили цель настоящей диссертационной работы.

## **Цель и задачи диссертационной работы**

Целью диссертационной работы является разработка и апробация неинвазивного метода детектирования лимфедемы, в основе которого лежит регистрация изменений структуры и пространственного распределения коллагена и содержания эластина в коже с использованием ДФМ и машинного обучения.

В диссертационной работе решаются следующие задачи:

1. Разработка модели лимфедемы на мелких лабораторных животных.
2. Разработка протокола *in vivo* исследования лимфедематозной ткани методом ДФМ и набор экспериментальных данных.
3. Развитие и применение методов выявления информативных признаков в данных ДФМ.
4. Разработка и верификация предиктивной модели неинвазивной диагностики лимфедематозной ткани с использованием данных ДФМ и машинного обучения.
- 5.

## **Объекты исследования**

Объектом исследования данной диссертационной работы являлись кожные покровы здоровых добровольцев и пациентов с лимфедемой, а также кожные покровы крыс с реализованной в рамках выполнения диссертационного исследования моделью лимфедемы.

Участники исследования набраны из числа амбулаторных пациентов НИИ микрохирургии, Томск, Россия. Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИ Микрохирургии 27.06.2017 №01-31979/17, каждый доброволец подписал информационное согласие на проведение исследования.

Протокол исследования с использованием мелких животных одобрен Комитетом по биоэтике НИ ТГУ (выписка из протокола № 1 заседания комитета по биоэтике НИ ТГУ от 23.11.2018).

## **Научная новизна**

Впервые использован индекс SAAID для диагностики лимфедематозной ткани. Данный индекс вычисляется по формуле  $(S-A)/(S+A)$ , где S – сигнал генерации второй гармоники биоткани, A – сигнал автофлуоресценции биоткани. Показаны значимые отличия данного индекса для здоровой и лимфедематозной тканей.

Впервые модифицирован и использован метод гистограмм ориентированных градиентов для оценки степени дезорганизации коллагена на основе данных ДФМ.

Разработана предиктивная модель диагностики лимфедемы основанная на регистрации сигнала второй гармоники методом ДФМ, выявлении информативных признаков

модифицированным методом гистограмм ориентированных градиентов, классификации информативных признаков обученной машины опорных векторов с радиальным базисным ядром (параметр регуляризации равен 1.0, параметр гамма, описывающий вклад отдельного образца на решающую гиперплоскость, равен 0.1) и метода голосования большинством. Данная модель обеспечила точность диагностики лимфедематозной ткани 96% на использованной экспериментальной выборке.

Предложена и исследована лабораторная модель лимфедемы на задних конечностях мелких животных.

### **Практическая ценность:**

Реализованная лабораторная модель развития лимфедемы может быть использована для изучения особенностей протекания лимфедемы на стадии доклинических исследований.

Модифицированный подход гистограмм ориентированных градиентов может быть использован для неинвазивной диагностики заболеваний кожи, сопровождающихся дезорганизацией коллагена, с использованием ДФМ.

Разработанная предиктивная модель *in vivo* диагностики лимфедемы может быть положена в основу диагностических методик данного заболевания.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Индекс SAAID папиллярной дермы, измеренный методом двухфотонной микроскопии с использованием оптической накачки на длине волны 760нм, для лимфедематозной ткани значительно отличается от такового для здоровой ткани ( $0.45 \pm 0.13$  против  $0.36 \pm 0.14$  на использованной экспериментальной выборке с уровнем значимости  $<5\%$  по критерию Манна-Уитни).

2. Модификация метода гистограмм ориентированных градиентов, основанная на разбиении изображения на блоки и построении вектора признаков изображения в виде плотности вероятности пространственных ориентаций градиентов яркости внутри каждого блока, позволяет количественно оценить дезорганизацию коллагена на основе регистрации сигнала генерации второй гармоники кожи с использованием ДФМ. При этом для полностью дезорганизованной структуры указанная плотность вероятности имеет вид равномерного распределения, для полностью ориентированной структуры – вид дельта-функции.

3. Разработанная предиктивная модель диагностики лимфедемы основанная на регистрации сигнала второй гармоники кожи методом ДФМ, выявлении информативных признаков модифицированным методом гистограмм ориентированных градиентов, классификации информативных признаков обученной машины опорных векторов с радиальным



базисным ядром (параметр регуляризации равен 1.0, параметр гамма равен 0.1) и метода голосования большинством обеспечивает точность диагностики лимфедемы 96% на использованной экспериментальной выборке.

4. Лабораторная модель лимфедемы на задней конечности крысы реализуется путем резекции подколенного и ближайшего пахового лимфатического узлов с последующим облучением рентгеновым излучением оперированной конечности крысы через 1 и 10 месяцев после резекции с дозой облучения 20 грей в каждом сеансе, полученной по следующему протоколу: облучение 4 раза по 5 минут, интервалом между облучениями - 2 минуты.

5.

#### **Личный вклад автора диссертации:**

Автор лично участвовал во всех экспериментальных измерениях, обработке и анализе полученных данных, а также в написании научных статей и представлении результатов исследований на конференциях.

Определение основного направления диссертационной работы, формулировка темы, постановка задач, обсуждение результатов, обсуждение текста диссертационной работы, ее основных положений и выводов, осуществлялась совместно с научным руководителем диссертационной работы: заместителем проректора по научной и инновационной деятельности, ФГБОУ ВО «Томский национальный исследовательский государственный университет», д.ф.-м.н., профессором Кистеневым Ю.В.

#### **Степень достоверности и апробация работы и публикации**

Достоверность описанных в диссертационном исследовании результатов, сделанных выводов, обсуждений и заключения подтверждается выступлениями на конференциях и публикациями в рецензируемых научных журналах.

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на следующих конференциях: Workshop FLIM 2017 (Берлин, 30 июля 2017 года), VI Международный симпозиум «Актуальные проблемы биофотоники» (Нижний Новгород – Санкт Петербург, 28 июля – 03 августа 2017 года), XXIV Международный симпозиум «Оптика атмосферы и океана. Физика атмосферы» (Томск, 2-5 июля 2018 года), Photonics West 2019. International Conference (Сан-Франциско, 2-7 февраля 2019), XXV Международный симпозиум «Оптика атмосферы и океана. Физика атмосферы» (Новосибирск, 1-5 июля 2019 года), European Conference on Biomedical Optics (Мюнхен, 23–25 июня 2019), Saratov Fall Meeting 2019 (Саратов 23-27 сентября 2019), 27th International Conference on Advanced Laser Technologies (Прага, 15-20 октября 2019).

Всего по теме диссертации опубликовано 11 научных статей. Из них 4 работы в рецензируемых журналах из списка ВАК, 11 работ, 8 индексируемые в базе-данных Scopus. Одна

работа опубликована в журнале Q1 и две в журнале Q2 по системе Journal Citation Reports (Web of Science).

### **Конкурсная поддержка работы**

Результаты исследования получены в том числе при выполнении следующих научных проектов:

*в рамках программы международного сотрудничества российских вузов и научных организаций с учеными мирового уровня и ведущими зарубежными научно-образовательными центрами в сферах науки:*

– проект № 075-15-2021-615 «Разработка методов скрининговой неинвазивной диагностики вирусных и бактериальных респираторных инфекций с использованием лазерной спектроскопии и методов искусственного» (2021-2023гг., руководитель – Ю. В. Кистенев, в числе соисполнителей – В. В. Николаев);

*в рамках программы поддержки фундаментальных научных исследований, актуальных для решения практических задач, стоящих перед Субъектами РФ; привлечение талантливых молодых ученых к проведению самостоятельных исследований по важнейшим проблемам естественных, гуманитарных и общественных наук, закрепление молодых научных кадров в организациях Субъектов РФ.:*

– проект № 18-42-703012 р\_мол\_а «Исследование ранних стадий развития лимфедемы с использованием методов биофотоники для поиска подходов к неинвазивной диагностике данного заболевания» (2018-2019гг., руководитель – Е. А. Сандыкова, в числе соисполнителей – В. В. Николаев);

*в рамках программы государственной поддержки ведущих университетов Российской Федерации в целях повышения их конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров (проект 5-100):*

– госконтракт 8.1.43.2017 «Разработка физических основ оптической медицинской визуализации и диагностики с использованием лазерных технологий» (2017г., руководитель – В. В. Тучин, в числе соисполнителей – В. В. Николаев);

– госконтракт 8.1.38.2018 «Разработка метода in-vivo анализа дезорганизации коллагена в коже с использованием метода многофотонной лазерной микроскопии» (2018 г., руководитель – Н. А. Кривова, в числе соисполнителей – В. В. Николаев);

– госконтракт № 8.1.43.2018 «Содержательный анализ данных молекулярного имиджинга на основе оптических технологий и развитие прогностических моделей для медицинской диагностики социально-значимых заболеваний с использованием алгоритмов искусственного интеллекта» (2018–2020 гг., руководитель – В. В. Тучин, в числе соисполнителей – В. В. Николаев);

– госконтракт № 8.1.11.2019 «Разработка методов выделения внеклеточного матрикса тканей организма» (2019 г., руководитель – Н. А. Кривова, в числе соисполнителей – В. В. Николаев);

*в рамках государственного задания Минобрнауки России:*

– проект № №20.9968.2017/ДААД «Исследование особенностей 2PM/FLIM имиджинга различных слоев кожи в ее различных состояниях» (2017–2018 гг. руководитель – В. В. Николаев);

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. Работа изложена на 128 страницах, включает 53 рисунка, 16 таблиц и список литературы из 325 наименования.

### **Содержание диссертации**

**Во введении** описана общая характеристика работы, описана актуальность темы исследования, которая подкреплена литературным обзором; представлены цели и задачи настоящей работы; описан объект исследования и приведены ссылки на протоколы этических комитетов НИИ Микрохирургии и НИ ТГУ, разрешающих проведение данного исследования; сформулированы защищаемые положения, приведены структура и краткое содержание диссертации.

**В первой главе** представлено описание структуры, функций и оптических характеристик кожи в целом, а также коллагена и эластина кожи, в частности. Рассмотрены основные отличия кожи человека и мелких лабораторных животных с точки зрения их оптических свойств.

Обсуждаются современные подходы и инструментальные методы визуализации коллагена и эластина *in vivo*. Рассмотрены аналитические методы количественного описания 2D и 3D изображений, определено понятие вектора признаков. Рассмотрены основные алгоритмы классификации, которые применяются для построения предиктивных моделей в медицинской диагностике.

**Во второй главе** представлено обоснование выбора метода *in vivo* визуализации структуры коллагена и эластина, разработаны соответствующие протоколы для экспериментального исследования кожи. Определены методы предварительной обработки полученных изображений, а также представлена методика разбиения изображения на блоки для последующего анализа полученных данных. Реализована компьютерная модель коллагеновых волокон и синтезированы данные, моделирующие коллаген с разной степенью дезорганизации. На модельных данных показана применимость метода гистограмм ориентированных градиентов для анализа структуры коллагена и подобраны параметры метода, применительно к рассматриваемой задаче.

**В третьей главе** представлены результаты анализа экспериментальных данных ДФМ для здоровых добровольцев и пациентов с лимфедемой. На основании выявленных закономерностей разработаны подходы к диагностике лимфедемы, основанные на отношении сигналов

автофлуоресценции и генерации второй гармоники, и методов анализа градиентных векторов признаков. Описана разработанная предиктивная модель диагностики лимфедематозной ткани на основе метода опорных векторов и векторов признаков на базе адаптированного метода гистограммы ориентированных градиентов разработан с использованием ДФМ и машинного обучения.

**В четвертой главе** представлена информация о разработанной экспериментальной модели развития лимфедемы на задних конечностях крыс Wistar.

В заключении описаны основные результаты и сформулированы выводы работы.

### **Публикация результатов исследований**

Всего опубликовано 11 работ, в том числе 5 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (из них 2 статьи в зарубежных научных журналах, 3 статьи в российских научных журналах, переводные версии которых входят в Scopus), 5 статей в сборниках материалов конференций, представленных в изданиях, входящих в Scopus), 1 статья в прочем научном журнале.

### **Список публикаций по теме диссертации:**

Статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук:

1. Кистенев Ю. В. Исследование пространственной структуры коллагена с применением методов многофотонной микроскопии и машинного обучения / Ю. В. Кистенев, Д. А. Вражнов, **В. В. Николаев**, Е. А. Сандыкова, Н. А. Кривова // Успехи биологической химии. – 2019. – № 59. – С. 219–252. – 1,5 / 0,3 а.л.

*в переводной версии журнала, входящей в Scopus:*

Kistenev Yu. V. Analysis of Collagen Spatial Structure Using Multiphoton Microscopy and Machine Learning Methods / Yu. V. Kistenev, D. A. Vrazhnov, **V. V. Nikolaev**, E. A. Sandykova, N. A. Krivova // Biochemistry (Moscow). – 2019. – Vol. 84, is. 1. – P. 108–123. – DOI: 10.1134/S0006297919140074.

2. Князькова А. И. Возможности двухфотонной микроскопии для анализа флуоресцентных свойств эластиновых волокон крыс *in vivo* / А. И. Князькова, А. А. Самарина, **В. В. Николаев**, Ю. В. Кистенев, А. В. Борисов // Известия высших учебных заведений. Физика. – 2021. – Т. 64, № (11). – С. 128–133. – DOI: 10.17223/00213411/64/11/128. – 0,43 / 0,09 а.л.

в переводной версии журнала, входящей в Scopus:

Knyazkova A. I. Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy of Rat Elastin Fiber In Vivo / A. I. Knyaz'kova, A. A. Samarina, **V. V. Nikolaev**, Y. V. Kistenev, A. V. Borisov // Russian Physics Journal. – 2022. – Vol. 64, is. 10. – P. 2123–2128. – DOI: 10.1007/s11182-022-02565-w.

3. Кистенев Ю. В. Микроскопия с многофотонным возбуждением для идентификации и оперативного контроля компонентов внеклеточного матрикса тканей организма / Ю. В. Кистенев, **В. В. Николаев**, А. В. Борисов, О. Б. Заева, А. И. Князькова, Н. А. Кривова // Оптика и спектроскопия. – 2020. – Т. 128, вып. 6. – С. 790–794. – 0,37 / 0,06 а.л.

в переводной версии журнала, входящей в Scopus:

Kistenev Y. V. Multiphoton Excitation Microscopy for Identification and Operational Control of Extracellular Matrix Components of Body Tissues / Y. V. Kistenev, **V. V. Nikolaev**, A. V. Borisov, O. B. Zaeva, A. I. Knyazkova, N. A. Krivova // Optics and Spectroscopy. – 2020. – Vol. 128, is. 6. – P. 794–798. – DOI: 10.1134/S0030400X20060107.

4. Kistenev Y. V. Application of multiphoton imaging and machine learning to lymphedema tissue analysis / Y. V. Kistenev, **V. V. Nikolaev**, O. S. Kurochkina, A. V. Borisov, D. A. Vrazhnov, E. A. Sandykova // Biomedeccal Optic Express. – 2019. – Vol. 10, № 7. – P. 3353–3368. – URL: <http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC6706037&blobtype=pdf> (access date: 07.09.2022). – DOI: 10.1364/BOE.10.003353. – 1,08 / 0,36 а.л. (*Scopus*).

5. Mazumder N. Label-Free Non-linear Multimodal Optical Microscopy – Basics, Development, and Applications / N. Mazumder, N. K. Balla, G.-Y. Zhuo, Yu. V. Kistenev, R. Kumar, F.-J. Kao, S. Brasselet, **V. V. Nikolaev**, N. A. Krivova // Frontiers in Physics. – 2019. – Vol. 7. – DOI: 10.3389/fphy.2019.00170. – 1,38 / 0,15 а.л. (*Scopus*).

Статьи в сборниках материалов конференций, представленных в изданиях, входящих в Scopus:

6. Kistenev Yu. V. Kalman filtering in the problem of noise reduction in the absorption spectra of exhaled air / Y. V. Kistenev, A. V. Shapovalov, D. A. Vrazhnov, **V. V. Nikolaev** // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. – 2016. – Vol. 10035 : 22nd International Symposium on Atmospheric and Ocean Optics: Atmospheric Physics. Tomsk, Russia, June 30 – July 03, 2016. – Article number 100350A. – 6 p. – URL: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/10035/100350A/Kalman-filtering-in-the-problem-of-noise-reduction-in-the/10.1117/12.2249139.short?SSO=1> (access date: 07.09.2022). – DOI: 10.1117/12.2249139. – 0,28 / 0,07 а.л.

7. **Nikolaev V. V.** Research on lymphedema by method of high-resolution multiphoton microscopy / V. V. Nikolaev, O. S. Kurochkina, D. A. Vrazhnov, E. A. Sandykova, Y. V. Kistenev //

Journal of Physics: Conference Series. – 2019. – Vol. 1145 : XV International Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists. Tomsk, Russia, April 24–27, 2017. – Article number 012043. – 6 p. – URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1145/1/012043/pdf> (access date: 07.09.2022). – DOI: 10.1088/1742-6596/1145/1/012043. – 0,28 / 0,07 а.л.

8. Kistenev Yu. V. Lymphedema tissue analysis using optical imaging and gradient processing / Y. V. Kistenev, A. V. Borisov, **V. V. Nikolaev**, D. A. Vrazhnov, A. I. Knyazkova, N. A. Krivova, E. A. Sandykova // Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE. – 2019. – Vol. 11073 : Clinical and Preclinical Optical Diagnostics II. Munich, Germany, June 23–25, 2017. – Article number 110731Z. – 7 p. – URL: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/11073/2526530/Lymphedema-tissue-analysis-using-optical-imaging-and-gradient-processing/10.1117/12.2526530.full?SSO=1> (access date: 07.09.2022). – DOI: 10.1117/12.2526530. – 0,27 / 0,04 а.л.

9. **Nikolaev V. V.** Estimation of the collagen and elastin condition at lymphedema using multiphoton microscopy / V. V. Nikolaev, E. Sandykova, O. O. Kurochkina, D. A. Vrazhnov, N. A. Krivova, Y. V. Kistenev, E. S. Sim // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. – 2019. – Vol. 11208 : 25th International Symposium on Atmospheric and Ocean Optics: Atmospheric Physics 2019. Novosibirsk, Russia, June 30 – July 05, 2019. – Article number 112080E. – 5 p. – URL: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/11208/112080E/Estimation-of-the-collagen-and-elastin-condition-at-lymphedema-using/10.1117/12.2540604.short> (access date: 07.09.2022). – DOI: 10.1117/12.2540604. – 0,27 / 0,04 а.л.

10. **Nikolaev V. V.** Measurement and estimation of the structure of lymphedematous tissue on animal model / V. V. Nikolaev, O. O. Zakharova, O. O. Kurochkina, E. Sandykova, A. A. Taletskiy, N. A. Krivova // Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering. – 2020. – Vol. 11582 : 4th International Conference on Terahertz and Microwave Radiation: Generation, Detection, and Applications 2020. Tomsk, Russia, August 24–26, 2017. – Article number 115821I. – 7 p. – URL: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/11582/115821I/Measurement-and-estimation-of-the-structure-of-lymphedematous-tissue-on/10.1117/12.2581564.short> (access date: 07.09.2022). – DOI: 10.1117/12.2581564. – 0,3 / 0,05 а.л.

Статья в прочем научном журнале:

11. Байтингер В. Ф. Морфологические изменения в коже и подкожной клетчатке при создании экспериментальной модели лимфедемы на задней конечности белой крысы / В. Ф. Байтингер, И. В. Суходоло, О. С. Курочкина, М. Е. Павлова, Ю. В. Кистенев, Н. А. Кривова, А. В. Талецкий, **В. В. Николаев** // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2022. – Т. 25, № 1. – С. 40–52. – 0,8 / 0,1 а.л.

## **ГЛАВА 1. Основные сведения о коже, коллагене и эластине, их функциях, характеристиках, методах визуализации и моделирования**

В данной главе представлена необходимая для последующих глав информация о структуре и оптических характеристиках кожи, а также основных белков дермы: коллагена и эластина; представлен обзор оптических методов визуализации кожи, описаны подходы к формированию количественных характеристик изображений и их классификации с использованием методов машинного обучения.

### **Раздел 1.1. Структура, функции и оптические характеристики кожи**

#### **1.1.1 Структура, функции кожи**

Кожа состоит из эпидермиса, дермы и гиподермы (кожно-жировой клетчатки) [1], [39], [40]. Эпидермис находится на поверхности кожи [39]–[43]. Кератиноциты — основные клетки кожного эпидермиса, содержат белок кератин, который создает внешний слой кожи и совместно с коллагеном и эластином придает коже упругость и прочность. В основном, толщина эпидермиса составляет около 0.1 мм, однако на ладони, ступни может достигать толщины до 3-5 мм. Эпидермис разделяют на пять слоев: роговой, блестящий, зернистый, шиповатый и базальный (см. рисунок 1) [39], [40].

Роговой слой состоит из корнеоцитов [44], [45]. Корнеоциты состоят из кератиновых фибрилл диаметром 7-8нм разделенных между собой аморфным материалом (состоит из 70% воды, минеральных веществ (4-7%), гликопротеинов (4-5%), протеогликановых агрегатов (4-5%)) в соотношении 1:1 и окружены оболочкой толщиной 12-15нм [46]. Размер корнеоцитов: диаметр – около 30 мкм, толщина - 50-1000нм [47]. Образование корнеоцитов является одной из основных функций эпидермиса. Толщина рогового слоя варьируется от 5-15мкм, до 1мм – на ладонях, ступнях [47], [48]. Основная функция— защита кожи от внешних воздействий [49], [50].

Блестящий слой эпидермиса является тонким слоем, состоящим из одного-двух рядов плоских кератиноцитов, наполненных элейдином (промежуточной формой кератина), в которых полностью разрушены ядра и органеллы [41]. Размер кератиноцитов в данном слое порядка 10мкм, толщина – 0.1-20мкм. Данный слой встречается только на толстых участках кожи, таких как подошва или ладони. Основная функция данного слоя – защитная.

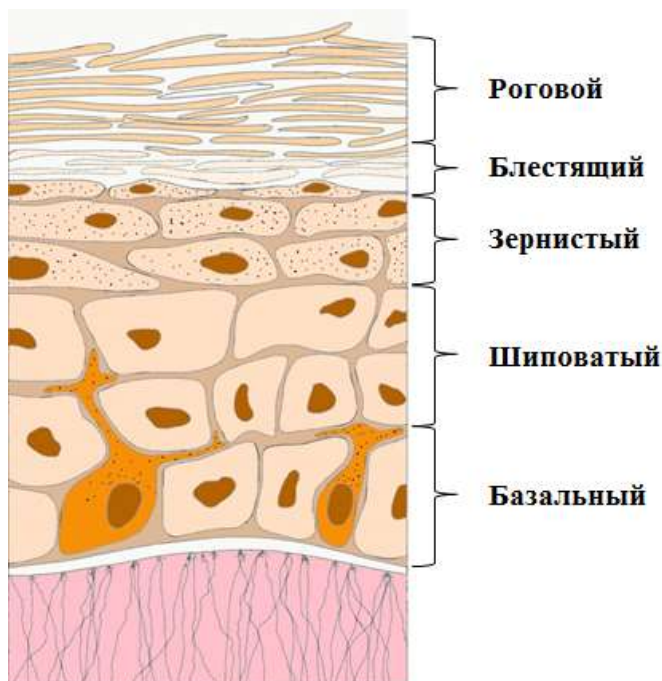


Рисунок 1 – Структура эпидермиса

Зернистый слой состоит из 1-4 рядов кератиноцитов [51]. Количество органелл в клетках данного слоя невелико по сравнению с более молодыми клетками, расположенными в шиповатом слое. Цитоплазма кератиноцитов в данном слое содержит гранулы кератогиалина и кератоносомы. Высвобождение этих гранул происходит в верхних рядах зернистого слоя, где формируются пластинчатые структуры блестящего слоя. В этом же слое происходит синтез кератолинина и филагрина, что приводит к последующей кератинизации клеток эпидермиса. Толщина слоя составляет примерно 3мкм [40], [41]. Выделение межклеточных липидов, которые скрепляют клетки рогового слоя, является основной функцией данного слоя. Данный слой так же защищает кожу от обезвоживания [49].

Шиповатый слой состоит из 10 и более рядов шиповатых кератиноцитов, в нижних рядах встречаются клетки Лангерганса, которые трансформируются из клеток костного мозга (менее 5% от клеток всего эпидермиса). Кератиноциты покрыты толстой оболочкой (толщиной 7-8нм), которая имеет характерные отростки (шипы), связывающая клетки друг с другом [46]. Клетки Лангерганса осуществляют транспорт антигенов в лимфатические узлы, тем самым активизируя иммунную защиту [49], [52], [53]. Толщина шиповатого слоя составляет 50 – 150мкм [42]. Шиповатый слой выделяет липиды, которые заполняют межклеточное пространство в шиповатом, зернистом, блестящем и роговым слоях. Вследствие этого ороговевшие слои обладают защитной функцией [49].

Базальный слой содержит базальные кератиноциты, клетки Лангерганса, меланоциты. Клетки в данном слое соединены между собой межклеточными мостиками и крепятся к



базальной мембране. В данном слое кожи происходит деление кератиноцитов, которые в последующем эволюционируют и продвигаются в верхние слои. В базальном слое синтезируется фибриллярный белок, полисахариды и липиды [46], [54]. Меланоциты, расположенные в базальном слое, образуют меланосомы и синтезируют меланин, который осуществляют защиту организма от ультрафиолетового излучения [41], [55]. Каждый меланоцит контактирует приблизительно с 30 кератиноцитами и распределяет по ним меланин. Данный слой является опорным слоем эпидермиса, связывает эпидермис с дермой, но не дает возможности кераноцитам попадать в дерму.

Дерма - следующий после эпидермиса слой кожи. Данный слой отделен от эпидермиса базальной мембраной и представляет собой сложную сеть, содержащую клеточные и неклеточные компоненты: кровеносные сосуды, нервы, корни волос и потовые железы. Основными структурными белками в дерме является коллаген и эластин.

Описание структуры, свойств и функций коллагена и эластина подробно изложено в разделе 1.2 и 1.3 настоящей диссертации.

Фибробласты являются основными клетками дермы и отвечают за синтез и деградацию дермальных белков (коллаген и эластин), участвуют в восстановлении кожи [56]–[59], стимуляции роста кератиноцитов и сосудов [60], формируют ответ на аутокринные и паракринные сигналы [61]–[63]. Существует несколько типов фибробластических клеток: фибробласты, миофибробласты, фиброциты, фиброкласты, клетки-предшественники и дифференцированные фибробласты [64]. Эти типы клеток дифференцируются по своим функциональным свойствам, хотя изначально они формируются из стволовых клеток. Процесс преобразования “спящих” клеток в клетки, позволяющие производить внеклеточный матрикс (ВКМ), называется активацией фибробластов [65]. Фибробласты продуцируют белки коллагена и эластина, такие как проколлаген, проэластин, фибронектин, ламинин, тенасцин, в зависимости от их расположения в ткани и функциональной активности [66]–[69]. Фиброциты продуцируют межклеточные вещества и обладают противовоспалительным действием [70], [71]. Миофибробласты относятся к дифференцированному типу клеток [72]. Рисунок 2 иллюстрирует схематическое изображение дифференцировки фибробластов [73].

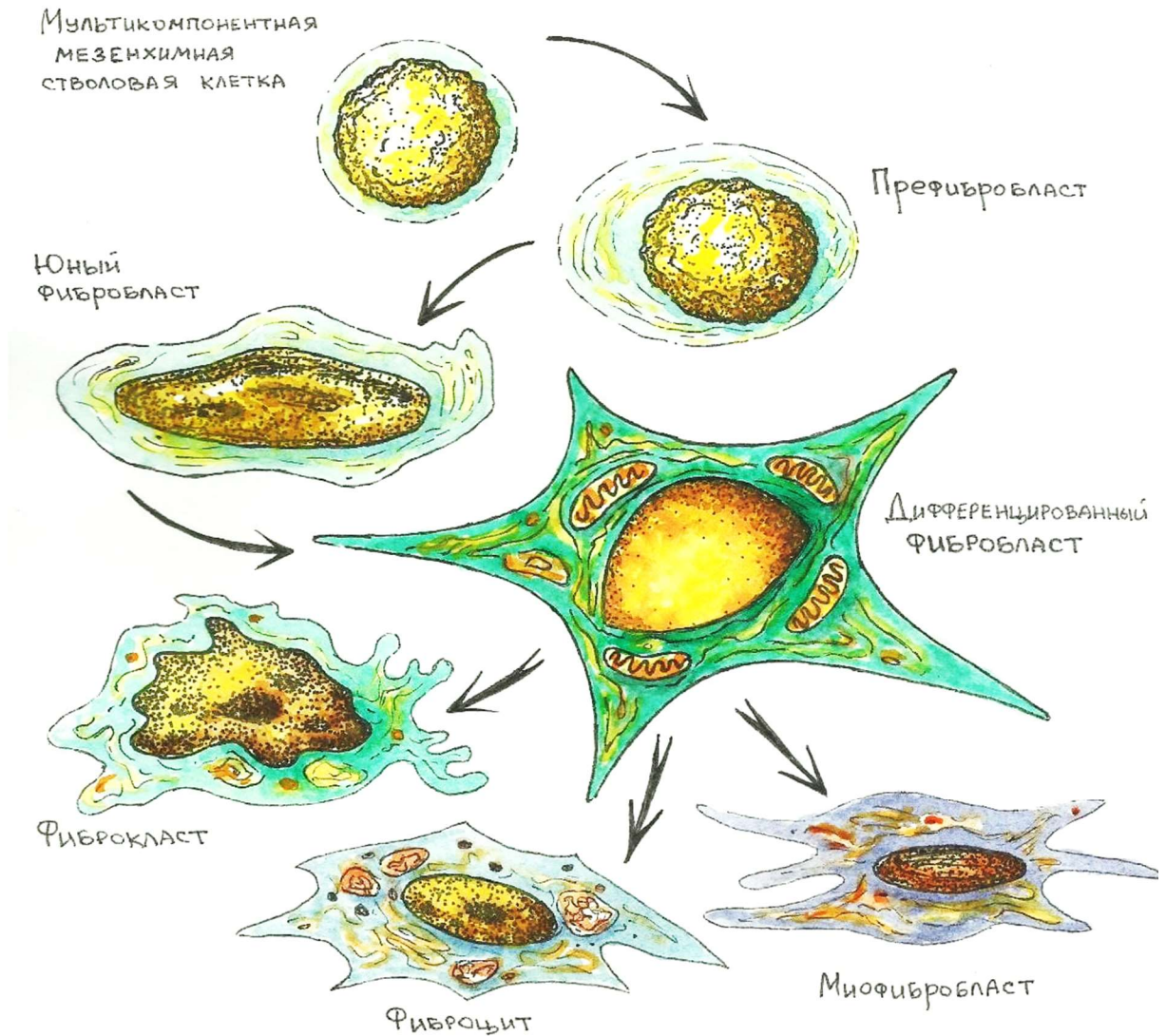


Рисунок 2 – Схематическое изображение дифференцировки фибробластов

Находящиеся в дерме лейкоциты являются частью иммунной системы [74]–[76]. Лейкоциты разделяют на 5 основных видов: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты. Нейтрофилы одними из первых мигрируют к месту воспаления, захватывают и расщепляют лизосомными ферментами патогенные микроорганизмы [77]. Основная функция эозинофилов заключается в борьбе с многоклеточными паразитами [78]. Базофилы участвуют в развитии аллергических реакций [79]. Лимфоциты обеспечивают выработку антител, клеточный иммунитет, а также регулируют деятельность клеток других типов [75]. Моноциты являются самым крупным типом лейкоцитов, которые могут дифференцироваться в макрофаги и дендритные клетки. Данный тип клеток выполняет три основные функции иммунной системы: фагоцитоз, передача антигена лимфоцитам и продуцирование цитокинов [80].

Дерма, как правило, имеет толщину 1.0-1.5 мм, но на пятках и ладонях толщина может достигать до 3 мм [41], [49]. Дерма состоит из двух подслоев: сосочковый (папиллярный) и сетчатый (ретикулярный) (см. рисунок 3). Сосудистые и капиллярные петли сосочкового слоя дермы обеспечивают эпидермис питательными веществами и кислородом. Дерма составляет основной объем кожи, обеспечивает ее пластичность и эластичность, удерживает воду и частично участвует в терморегуляции.

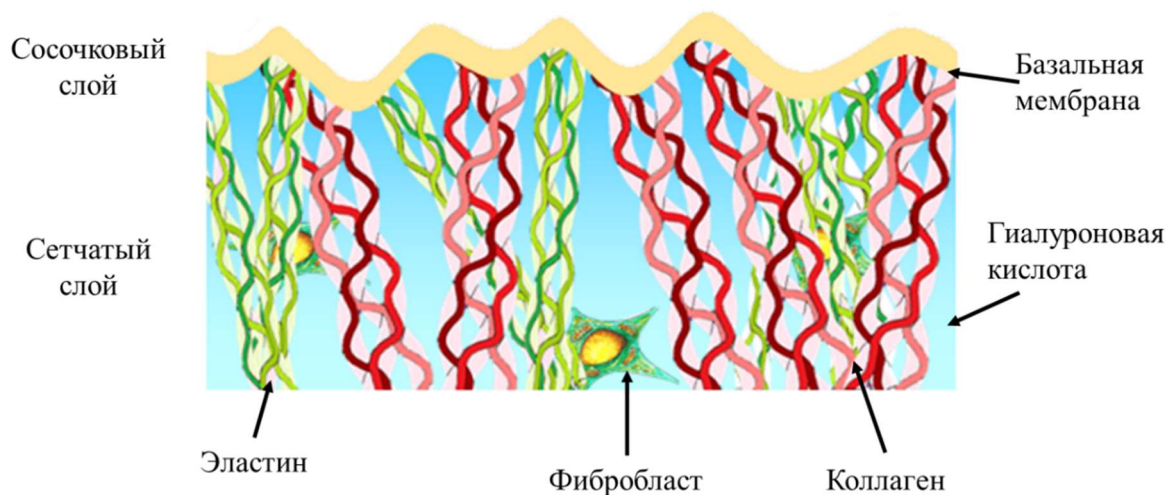


Рисунок 3 – Структура дермы

Гиподермой называют подкожную жировую клетчатку – наиболее глубокий покровный слой кожи, расположенный под дермой (см. рисунок 4). Толщина слоя гиподермы может колебаться от 2мм до 10см и более. Состоит, главным образом, из рыхлой сети волокон (коллагена, эластина) и жировой ткани. Среди клеток можно выделить адипоциты (жировые клетки), фибробласты и макрофаги.

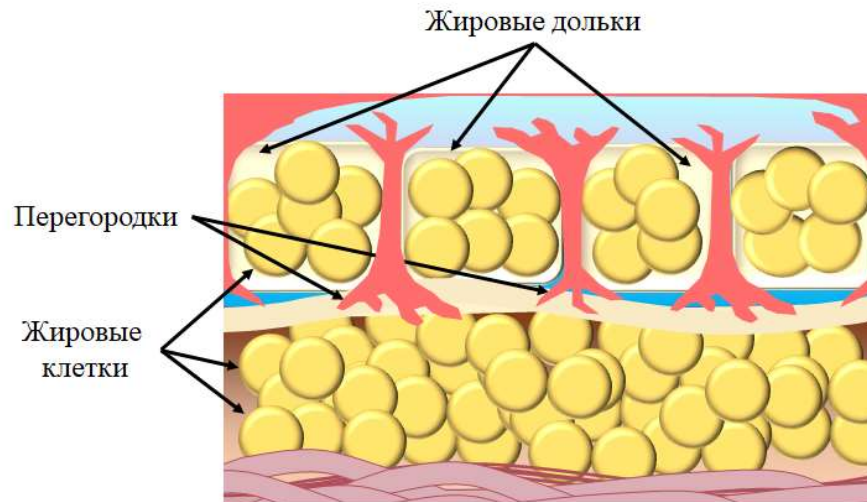


Рисунок 4 – Схематичное представление гиподермы

Функции гиподермы: естественная амортизация и теплоизоляция организма, депо для энергии. Гиподерма играет защитную роль внутренних органов, накапливает полезные вещества, продуцирует гормоны.

### 1.1.2. Оптические характеристики кожи

Показатель преломления кожи больше, чем у воздуха, по этой причине на границе раздела между кожей и воздухом часть падающего света отражается (от 4% до 7%) [81], [82]. Прошедший свет поглощается либо рассеивается внутренними слоями кожи [42], [81]. Ослабление коллимированного светового пучка в коже описывается законом Бугера-Бера [41]:

$$I(d) = (1 - R)I_0 \exp(-\mu_t z) \quad (1)$$

где  $I_0$  и  $I(d)$  - интенсивность падающего света и света, прошедшего через слой биоткани толщиной  $d$ ,  $\mu_t$  - коэффициент ослабления - складывается из коэффициента поглощения  $\mu_a$  и коэффициента рассеяния  $\mu_s$ :

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (2)$$

Глубина проникновения света в биоткань оценивается следующим образом:

$$l_b = \frac{1}{\mu_a + \mu_s}. \quad (3)$$

Коэффициент рассеяния можно представить в виде произведения концентрации рассеивателей  $N$  и их сечения рассеяния  $\sigma_s$ :

$$\mu_s = N\sigma_s.$$

Под сечением рассеяния понимают физическую величину (площадь), характеризующую интенсивность рассеяния элементарным рассеивателем. Для коэффициента поглощения используют аналогичное выражение [42].

За рассеяние в коже в видимой области спектра отвечают белковые нити [46], [83], клеточные ядра, меланосомы и оболочки клеток [84], [85]. Эпидермис представляет собой слой, заполненный в основном клетками (кератиноцитами), которые можно представить в виде сферических рассеивателей. Используя приближение Рэлея-Ганса-Дебая для сферических рассеивателей, сечение рассеяния может быть представлено в виде [86], [87]:

$$\sigma_s = \frac{9\pi^2 a x^3}{8} \left(\frac{m^2-1}{m^2+1}\right)^2 \int_0^\pi \frac{(\sin u - u \cos u)^2}{u^6} (1 + \cos^2 \theta) \sin \theta d\theta,$$

где  $u = 2x \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$ ,  $m = n_s/n_l$  относительный показатель преломления и  $x = 2\pi n_l a/\lambda$  – относительный размер рассеивателей. Здесь  $n_s$  – показатель преломления рассеивающих свет частиц,  $n_l$  – показатель преломления среды, окружающей рассеиватели,  $\lambda$  – длина волны излучения. Рассеяние в дерме намного выше, чем в эпидермисе [88].

Основными хромофорами кожи, поглощающими свет, являются меланин (в форме эумеланина) [89]–[91], гемоглобин (в формах окси – и дезоксигемоглобина) [91], бетта-кератин [92], коллаген [93], вода [94]. Вода не обладает значительным поглощением в видимой области, но в ближней инфракрасной области ее вклад заметен.

Диапазон длин волн от 600 до 1300нм слабо поглощается в коже, его называют первым терапевтическим «окном прозрачности». Окно между двумя максимумами поглощения воды на длинах волн от 1100 до 1350нм называют вторым терапевтическим «окном прозрачности», третье – от 1600 до 1870нм, и четвертое – от 2100 до 2300нм [42], [96]. На рисунке 5 показаны спектры основных флуорофоров кожи в первом терапевтическом окне прозрачности.

Значения коэффициентов рассеяния, поглощения и показателя преломления слоев кожи представлены в Таблица 1 [97]–[102]

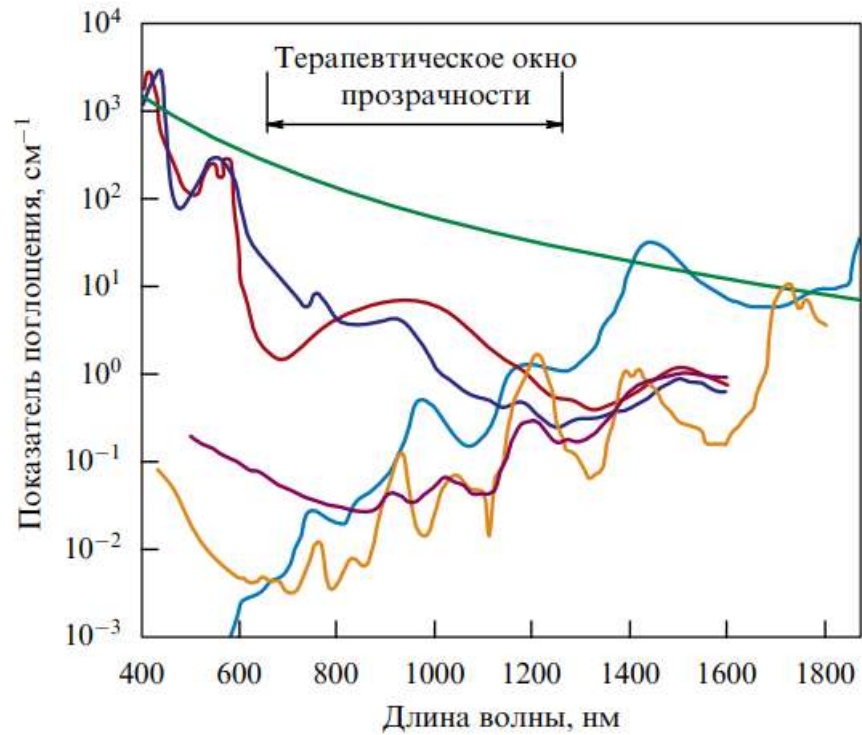


Рисунок 5 – Спектры поглощения эндогенных флуорофоров. Красным и синим цветом показаны окси- и дезоксигемоглобин, соответственно, в концентрации  $150 \text{ г л}^{-1}$ , голубым – вода, коричневым – липиды, зеленым – меланин, фиолетовым – коллаген [96]

Таблица 1 - Оптические параметры кожи человека

	Длина волны, нм	Коэффициент поглощения, $\text{см}^{-1}$	Коэффициент рассеяния, $\text{см}^{-1}$	Параметр анизотропии рассеяния	Показатель преломления
Эпидермис	577	10.7	120	0.78	1.5
	633	4.3	107	0.79	
	805	1.66	18.3	0.80	
	940	0.64	16.2	0.80	
Дерма	577	3 - 6	205 – 225	0.78	1.35-1.45
	633	2.7 – 3.4	187 – 194	0.82	
	805	1.18 – 1.45	11.4 – 45.9	0.81	
	940	0.77 – 1.26	9.7 – 37.7	0.81	
Гиподерма	577	3.00	205	0,78	1.4
	633	2.7	187	0.82	
	805	1.18	11.4	0.80	
	940	0.77	9.7	0.80	

### 1.1.3 Сравнение строения кожи человека и лабораторных животных

При проведении диагностических исследований кожи на лабораторных животных крайне важно понимать ее отличия от кожи человека. Если рассматривать структуру кожи животных, то принципиальных различий с кожей человека практически нет [103], [104]. Однако, у мелких лабораторных животных толщина кожи значительно меньше по сравнению с кожей человека. Шиповатый слой у мышей и крыс состоит из 1–2 рядов клеток, что более чем в 2 раза меньше, чем у человека; зернистый и роговой слои имеют также в 2-3 раза меньше рядов клеток [105], [106]. Существуют небольшие отличия в составе базального слоя: у свиней меньше меланоцитов по сравнению с человеком [107], у мелких лабораторных животных меланоциты в основном располагаются вблизи волосяных фолликулов [108]. Таблица 2 представляет данные о толщине слоев кожи человека и крысы.

Таблица 2 Толщина эпидермиса и дермы кожи человека и крысы

	<i>Эпидермис, мкм</i>	<i>Дерма, мкм</i>	<b>Источники</b>
<b>Человек, предплечье</b>	50–100	500–2000	[103]–[106]
<b>Крысы, бедро</b>	10–18	300–500	[107], [108]

## Раздел 1.2. Характеристики коллагена

### 1.2.1 Строение коллагена

Самым распространённым белком у млекопитающих является коллаген (25% - 45% всех белков организма). Коллаген является основным компонентом ВКМ, участвует в адгезии, миграции, дифференцировке и морфогенезе клеток [109]. Коллаген относится к семейству фибриллярных белков. Коллаген синтезируют многие клетки, однако клетки фибробластного ряда соединительной ткани являются основными источниками синтеза коллагена [110].

В зависимости от аминокислотной последовательности белки могут образовывать  $\alpha$ -цепи или  $\beta$ -складчатые структуры. Молекула коллагена – тропоколлаген состоит из трех  $\alpha$ -цепей, образующих тройную спираль (см. рисунок 6).



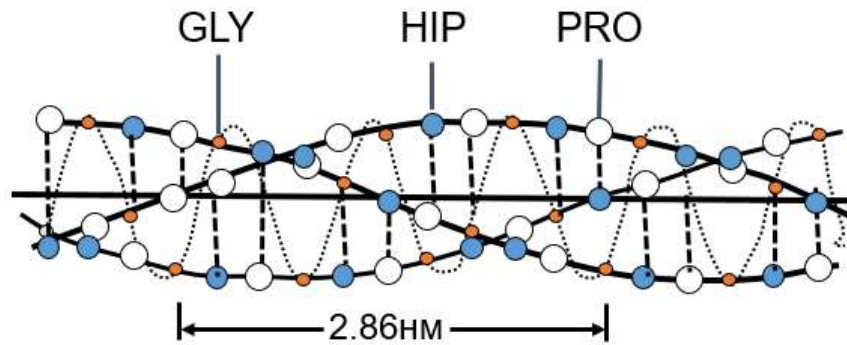


Рисунок 6 – Тройная спираль, состоящая из  $\alpha$ -цепей, формирующая коллаген [111]  
(адаптировано из [112])

Коллаген образует фибриллы, состоящие из повторяющихся молекул тропоколлагена, упакованных в параллельные пучки, расположенные «голова к хвосту» и ориентированные в одном направлении вдоль длинной оси фибрилл (см. рисунок 7). В фибриллах соседние молекулы коллагена смещены друг от друга на 67 нм, что объясняет характерные поперечные связи, повторяющиеся с одинаковым периодом. Более толстые коллагеновые пучки могут включать гликопротеины и протеогликаны [113].

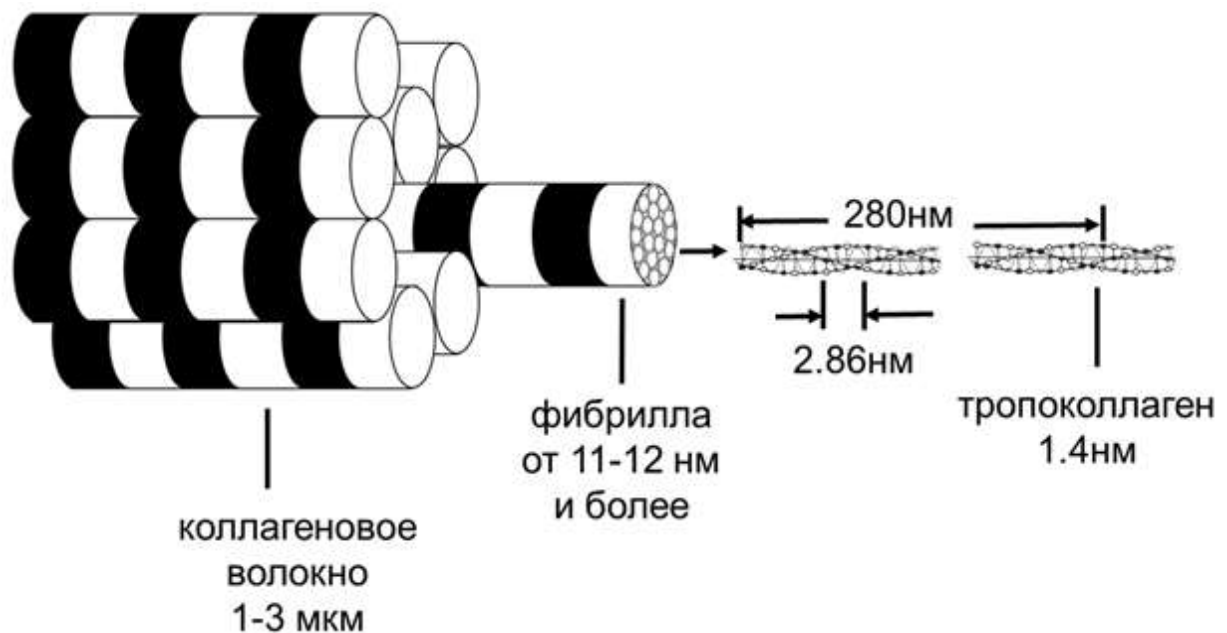


Рисунок 7 – Пространственная структура коллагеновых волокон [111]  
(адаптировано из [41])

Аминокислотная последовательность  $\alpha$ -цепи тройной спирали состоит из повторяющейся структуры Gly-X-Y, где Gly – глицин, X, как правило, пролин (Pro), а Y может быть любой аминокислотой, обычно гидроксипролином (Hyp) или гидроксизином (см. рисунок 6) [113]. В



настоящее время описано 28 типов коллагена, отличающихся аминокислотными последовательностями [113].

Синтез коллагена протекает в два этапа. Первый этап: внутриклеточная стадия включает трансляцию и посттрансляционную модификацию полипептидных цепей коллагена. А-цепи синтезируются на полирибосомах на мембранах эндоплазматического ретикулума. Из эндоплазматического ретикулума синтезированные молекулы проколлагена переносятся в аппарат Гольджи, где они включаются в секреторные пузырьки, а затем транспортируются во внеклеточное пространство. Второй этап: внеклеточная стадия включает модификации молекул проколлагена, включая расщепление N- и C-концевых пептидов протеолитическими ферментами. Высвобожденные тройные коллагеновые спирали (молекулы тропоколлагена) автоматически собираются в фибриллы посредством ковалентного сшивания. Коллагеновые фибриллы образуют коллагеновые волокна [114].

Самые часто встречающиеся коллагены являются частью фибрилл (коллагены I, II, III, V, XI типов) и сетевидных структур (коллагены IV, VIII и X типов) в межклеточном матриксе. В целом можно выделить следующие основные функции коллагена в организме [115]:

- образование каркаса органов и тканей;
- «биологический» клей;
- регулирование водно-солевого обмена.

Так как тип коллагена напрямую связан с аминокислотной последовательностью, лежащей в ее структуре, то и оптические свойства коллагенов зависят от его типа. Данная диссертация посвящена изучению изменений в дерме при лимфедеме, а, следовательно, в первую очередь касаются коллагена I типа. Поэтому далее при упоминании термина «коллаген» будет подразумеваться коллаген данного типа.

### 1.2.2. Оптические характеристики коллагена I типа

Спектральная зависимость показателя преломления коллагеновых волокон  $n_s^{col}(\lambda)$  имеет вид [116]:

$$n_s^{col}(\lambda) = 1.439 + \frac{15880.4}{\lambda^2} - \frac{1.48 \cdot 10^9}{\lambda^4} + \frac{4.39 \cdot 10^{13}}{\lambda^6}.$$

В работе [117] показано, что показатель преломления коллагена для волокон сухожилия хвоста крысы принимает значения  $n=1.51 \pm 0.02$ .

Фреунд с соавторами [118] при анализе рассеяния света в роговице показали применимость модели коллагеновых фибрилл как параллельных цилиндров конечной длины. Саиди и др. [119] использовали теорию Ми для моделирования рассеяния коллагена.

Приведенные подходы описывают только частные случаи, так как часто, коллагеновые волокна расположены беспорядочно или сложно переплетены. Для более реалистичных моделей больше подходят численные методы решения уравнений Максвелла [120].

Флуоресценция коллагена возбуждается между 300 и 400нм, при этом испускание отмечается между 400 и 600нм [41].

Как отмечалось, молекулы коллагена образуют тройную геликоидальную спираль. Подобные молекулы, обладающие нецентросимметричной структурой, способны генерировать вторую гармонику из-за наличия ненулевой восприимчивости второго порядка [121], [122].

## **Раздел 1.3. Характеристики эластина**

### **1.3.1 Строение эластина**

Эластические волокна образуют обширную тонкую сеть в дерме, при этом составляют всего 2% от сухой массы кожи человека и имеет молекулярную массу около 68кДа [123]. Основная функция эластина – это придание способности коже возвращаться в исходное состояние после растяжения, т.е. обеспечивает коже эластичность [124].

Эластин состоит из двух компонентов: фибриллярного и аморфного. Гликопротеины, фибриллины являются основной фибриллярного компонента, аморфный компонент состоит из белка эластина. Сетчатый слой дермы содержит структуры, преимущественно состоящие из аморфного компонента, в сосочковом слое эластина меньше.

Так же, как и коллаген, эластин синтезируется при помощи клеток фибробластного ряда соединительной ткани [41]. Эластин содержит около 27 % глицина, 19 % аланина, 10 % валина, 4,7 % лейцина [49], [124]. Наличие большого количества гидрофобных радикалов препятствует созданию стабильной глобулы, в результате полипептидные цепи эластина не формируют регулярные вторичную и третичную структуры. Схематичное представление структуры эластина показано на рисунке 8.

Тропоэластин является предшественником эластина, его синтез начинается в фибробластах. Тропоэластин представляет собой растворимый мономер, состоящий из гидрофильных и гидрофобных участков. Гидрофильные участки обогащены лизиномыми остатками. Остатки лизина окисляются посредством медьзависимой лизилоксидазы до аллизина, и после формируют поперечные сшивки (десмозины) [125]. За счет них эластиновые волокна объединяются в сеть прочных ковалентных связей.

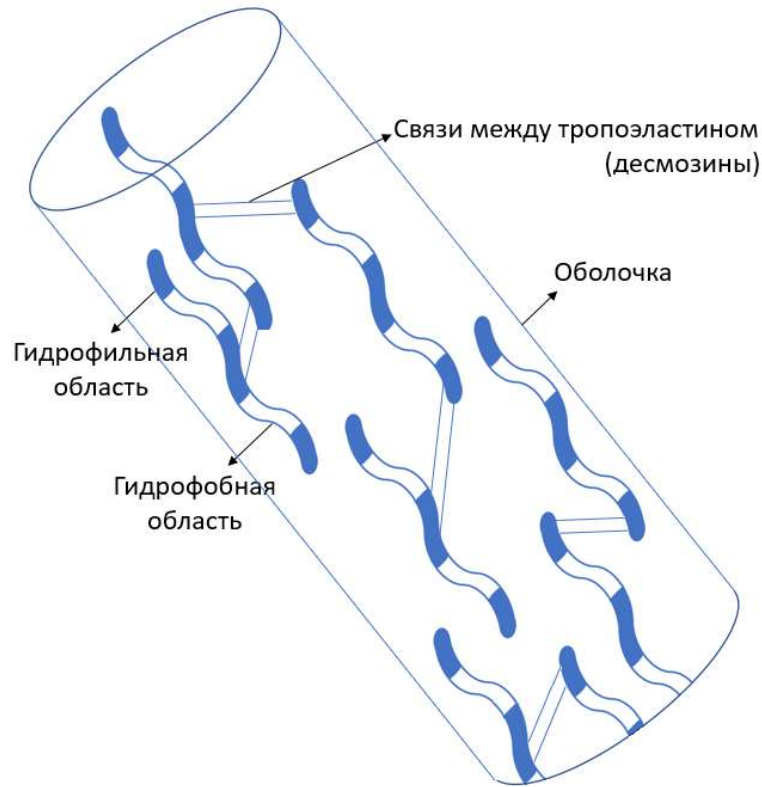


Рисунок 8 – Схематичное представление эластинового волокна

Образование эластина протекает в три основных этапа. Первый этап: внутриклеточная стадия включает образование эластиновых мономеров (тропоэластина), которые впоследствии связываются с белком-шапероном, который предотвращает агрегацию эластина в клетке. На втором этапе полученный комплекс вступает в контакт с оболочкой эластинового волокна и встраивается в него. Третий этап является заключительным и на этом шаге основная часть боковых цепей лизина (из тропоэластина) преобразуется в аллизины или не модифицированные лизины при действии фермента лизилоксидазы. В итоге конечный эластин представляет собой эластиновый белок, который модифицирован лизилоксидазой [124], [126], [127].

### 1.3.2. Оптические характеристики эластина

Расчетный показатель преломления эластина для волокон сухожилия хвоста крысы,  $n = 1,54 \pm 0,02$  [117], аналогичен полученному в работе [128] значению  $n = 1,534$ .

Тропоэластин имеет размер порядка сотни нм и организован в пучки волокон размером 1-3 мкм, аналогично коллагену. Коэффициент рассеяния эластина обычно моделируется степенным законом от длины волны с отдельными вкладами рассеяния Рэлея и Ми [129]:

$$\mu_s(\lambda) = \mu_s(\lambda_0) \left[ f_{Ray} \left( \frac{\lambda}{\lambda_0} \right)^{-4} + (1 - f_{Ray}) \left( \frac{\lambda}{\lambda_0} \right)^{-b_{Mie}} \right],$$

где  $\lambda_0$  произвольная длина волны, используемая для масштабирования экспериментальных данных, фактор  $f_{Ray}$  - это часть рассеяния, соответствующая режиму Рэлея, а фактор  $(1 - f_{Ray})$  соответствует режиму Ми, коэффициент  $b_{Mie}$  зависит от среднего размера рассеивателей в рассматриваемой среде.

Шангуан с соавторами [130] провели эксперименты по изучению оптических свойств эластиновой пластинки из аорты свиньи в зависимости от давления и показали, что значение  $\mu_s$  увеличивается от 53,7 до 83,1 см<sup>-1</sup>, при величине давления 1 кг/см<sup>2</sup>.

Что касается флуоресценции эластина, то ее можно наблюдать при возбуждении на длинах волн 300-400 нм, испускание регистрируется в диапазоне 400-600 нм [41]. Для смесей коллагена и эластина наблюдали красное смещение автофлуоресценции при увеличении концентрации эластина [131].

При сравнении спектра поглощения эластина с желатином, водой и жирными кислотами показано, что спектры поглощения желатина и эластина аналогичны, но обладают более высокими абсорбционными свойствами, чем вода и жирные кислоты [132].

Изотропность эластина продемонстрирована более 40 лет назад [133].

#### **Раздел 1.4. Трансформация кожи, коллагена и эластина при лимфедеме**

Лимфедема приводит к воспалению, гипертрофии жировой ткани и расширению фиброза с необратимым структурным повреждением ткани [2], [5]. Лимфедема затрагивает дерму, подкожную ткань и фасцию [5].

По сравнению со здоровыми участками кожи у пациентов с вторичной лимфедемой наблюдается высокая концентрация лимфоцитов и эритроцитов в периферической лимфе, иногда повышенное количество В-клеток, повышенная плотность клеток Лангерганса в эпидермисе, а иногда и в сосочковом слое кожи, сильная экспрессия антигенов класса II на эндотелиальные клетки кожи и мононуклеарная инфильтрация вокруг кровеносных сосудов [3]. Таким образом, продолжающиеся хронические воспалительные процессы сочетаются с лимфатическим застоем и нарушенным переносом лимфоцитов и клеток Лангерганса из кожи в региональные лимфатические узлы и неэффективным клиренсом чужеродных антигенов.

Таблица 3 отражает характерные изменения в коже в зависимости от стадии лимфедемы.

Таблица 3 - Характерные изменения в коже в зависимости от стадии лимфедемы.

Стадия	Гиперкератоз	Фиброз	Истончение эпидермиса	Папилломатоз
Первая	-	+	+	-
Вторая	±	+	+	-
Третья	±	+	+	-
Четвертая	±	+	+	+

При лимфедеме реализуются неферментативные механизмы распада коллагена, которые связаны с образованием дополнительных межмолекулярных связей под действием механического давления (отека) [134]. Деструктивные процессы в коллагене сопровождаются изменениями длины, толщины и пространственной ориентации волокон коллагена [6].

Развитие вторичной лимфедемы также сопровождается изменениями уровня металлопротеиназ (фермент способный разрушать все типы белков внеклеточного матрикса) [135], что может привести к разрушению коллагена. На изображениях задней конечности крысы с лимфедемой (см. рисунок 9), полученных с помощью ДФМ, видны участки дезорганизованной структуры коллагена [36].

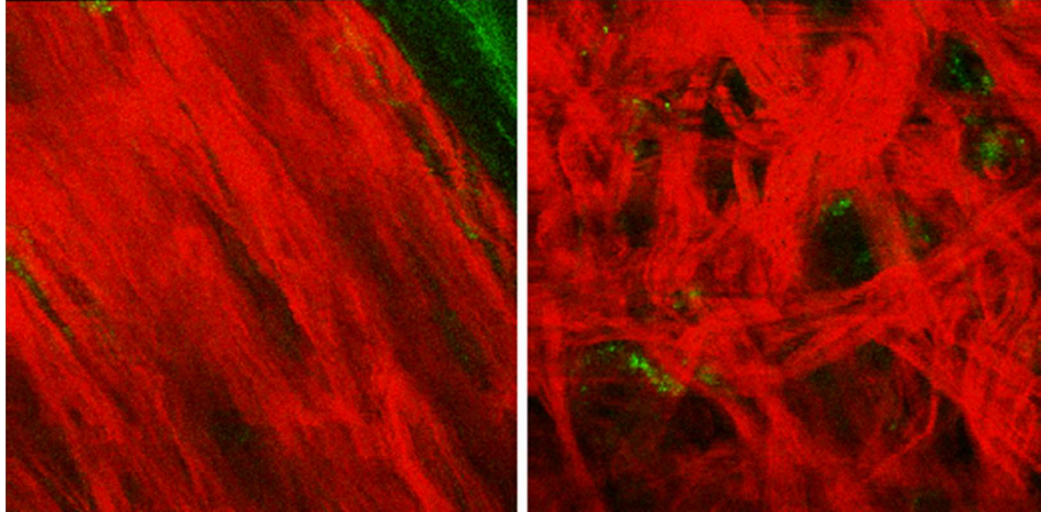


Рисунок 9 – Визуализация сосочкового слоя дермы задней лапы крысы при помощи ДФМ: а) здоровая ткань; б) ткань с лимфедемой

Эластиновые волокна окружают лимфатические сосуды кожи и направляют поток жидкости к ним [136], [137]. Неспособность эластиновых волокон должным образом поддерживать кожу и ее лимфатические сосуды рассматривается как фактор, способствующий

прогрессирующей лимфедеме [138]. Таким образом, хроническую прогрессирующую лимфедему связывают с более низким уровнем эластина в коже [139].

В работах [140]–[143] также показано, что генетическое нарушение метаболизма эластина препятствует правильному функционированию лимфатических сосудов, что приводит к отеку нижних конечностей.

## **Раздел 1.5. Инструментальные методы визуализации коллагена и эластина *in vivo***

Для исследования структуры и пространственного распределения коллагена и эластина необходимы методы визуализации с пространственным разрешением на уровне единиц мкм. На практике предпочтительны неинвазивные методы. Среди всего разнообразия методов оптической микроскопии на данный момент для подобных задач наиболее часто используется ДФМ и когерентная антистоксовая рамановская спектроскопия.

### **1.5.1 Двухфотонная микроскопия**

Двухфотонная микроскопия тканей основана на их двухфотонном поглощении с длиной волны 0,7–0,8 мкм, что соответствует окну оптической прозрачности кожи [144]–[146]. Процесс двухфотонного поглощения наблюдается только при высокой интенсивности падающего излучения, что возможно при фокусировке излучения мощных фемтосекундных лазеров.

ДФМ обеспечивает *in vivo* визуализацию эндогенных флуорофоров в коже на клеточном и субклеточном уровнях с разрешением (порядка 0,5 мкм) на глубине до 200 мкм без дополнительного воздействия просветляющих агентов и до 350 мкм с их использованием [147]–[150]. Среди таких флуорофоров можно выделить эластин, клеточные мембраны, NADH. В ряде работ показано, что пик флуоресценции эластина находится в диапазоне 480–520 нм [151]–[153].

Как отмечалось молекулы коллагена не имеют центра симметрии, что делает возможным их визуализацию на основе регистрации сигнала генерации второй гармоники (ГВГ) [121], [122]. Микроскопия ГВГ является одним из наиболее надежных методов визуализации структуры коллагена в тканях [147], [154]–[160]. Как правило, ГВГ не связана с фотообесцвечиванием и фототоксичностью [121].

Сигнал ГВГ очень чувствителен к изменениям, происходящим при таких заболеваниях, как рак, фиброз и патологии соединительной ткани [161]. Показатели морфологии коллагена, основанные на ГВГ визуализации, позволили количественно исследовать неопластическую трансформацию биоткани яичников и молочной железы [148], [162].

Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) основана на регистрации сигнала затухания флуоресценции со временем [163]. FLIM позволяет дифференцировать флуорофоры с близким спектром флуоресценции, но различным временем ее затухания (временем жизни флуоресценции) [164]. Параметры FLIM не зависят от концентрации, но зависят от следующих факторов: вязкость, показатель преломления, уровень pH, температура, конформационного состояния молекул и ее микроокружения [165]. FLIM обеспечивает высокую контрастность при картировании эндогенных флуорофоров в биоткани, позволяет оценить белковые взаимодействия и конформационные переходы, распределение кислорода в клетках [166]. FLIM демонстрирует большой потенциал в области биомедицинской визуализации, материаловедения и химического анализа, поскольку дает информацию о временной динамике флуоресцентного излучения по площади образца и может отображать окислительно-восстановительный статус клеток кожи [167]–[169].

Визуализации эластина в папиллярной дерме возможна на основе данных FLIM, что также позволяет выделить эластин среди других флуоресцирующих белков кожи [170]. Флуоресцентные свойства волокон эластина папиллярной дермы человека имеют близкие значения для аналогичных параметров папиллярной дермы крысы, что позволяет использовать лабораторные модели патологий на мелких животных на доклинической стадии [171].

### 1.5.2 Когерентная антистоксовая рамановская спектроскопия

Когерентная антистоксовая рамановская спектроскопия (КАРС) является вариантом использования эффекта комбинационного рассеяния [172]. О КАРС как о возможном нелинейном эффекте третьего порядка впервые упомянули Терхьюн и Мейкер в 1965 году [173]. КАРС-микроскопия впервые реализована Дунканом [174] в 1982 году. В КАРС-микроскопии волна накачки  $E_p(\omega_p)$  и волна  $E_s(\omega_s)$  взаимодействуют с молекулами в процессе четырехволнового смешения. Когда частота биений ( $\omega_p - \omega_s$ ) совпадает с частотой колебаний молекулы, генерируется сильное антистоксово поле  $E_{as}$  на частоте  $2\omega_p - \omega_s$ . Детектирование сигнала на заданных частотах (обычно в области  $500\text{--}1800\text{см}^{-1}$ ) позволяет исследовать коллаген, эластин, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, пептиды, липиды и углеводы [152], [175]–[178]. Показана возможность изучения адгезионных свойств коллагена методом КАРС [179].

Путем возбуждения комбинационных мод групп  $\text{CH}_2$  в мембранных фосфолипидах [180], можно визуализировать не только коллаген, но и клеточную плазматическую мембрану [181], [182].

Таким образом, КАРС метод позволяет визуализировать одновременно структуру коллагена и эластина. Недостатком метода является то, что сигналы КАРС коллагена и эластина сложно разделить [152].

## Раздел 1.6. Аналитические методы и подходы количественного описания 2D и 3D изображений.

### 1.6.1 Определение понятия вектора признаков

Автоматический поиск характерных особенностей на изображениях основан на их формализованном математическом описании. В биомедицине обычно анализируют графические текстуры (части изображений), которые связаны с микро- и макроструктурными особенностями тканей [183]. Стандартный подход математического описания текстуры заключается в использовании набора количественных параметров, который позволяет дифференцировать разные текстуры. Такой набор параметров называют вектором признаков. Методы извлечения векторов признаков представлены в следующем разделе.

### 1.6.2 Способы извлечения векторов признаков

#### *Структурные методы*

Структурные методы основаны на представлении текстуры в виде комбинации визуальных примитивов. Для анализа особенностей двухмерных изображений используются следующие основные алгоритмы:

- свертка с операторами первого порядка, такие как операторы Собеля [184] и Прюитта [185],
- операторы второго порядка (например, лапласиан гауссианов [186], разность Гауссианов [187]),
- детектор границ Канни [188],
- методы математической морфологии [189],
- преобразования Хафа [190],
- Фурье-анализ [191], [192].

Свертка с оператором Собеля является одним из классических алгоритмов для выделения границ на изображении. Для этого изображение преобразуется оператором Собеля  $G$ :

$$G = \sqrt{G_x^2 + G_y^2}; G_x = \begin{bmatrix} +1 & 0 & -1 \\ +2 & 0 & -2 \\ +1 & 0 & -1 \end{bmatrix}; G_y = \begin{bmatrix} +1 & +2 & +1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -2 & -1 \end{bmatrix},$$



где,  $G_x$ ,  $G_y$  - являются ядрами свертки исходного изображения [193]. Оператор Прюитта - аналогичен, но использует следующие ядра:

$$G_x = \begin{bmatrix} +1 & 0 & -1 \\ +1 & 0 & -1 \\ +1 & 0 & -1 \end{bmatrix}; G_y = \begin{bmatrix} +1 & +1 & +1 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix}.$$

Метод лапласина гауссианов (Laplacian of Gaussian, LoG) вычисляет производную второго порядка изображения и ищет точки с нулевым пересечением. Из-за использования производных второго порядка этот подход очень чувствителен к шуму, поэтому требует предварительной фильтрации. Обычно используемые ядра для LoG [194]:

$$\begin{bmatrix} +1 & +1 & +1 \\ +1 & -8 & +1 \\ +1 & +1 & +1 \end{bmatrix}; \begin{bmatrix} -1 & +2 & -1 \\ +2 & -4 & +2 \\ -1 & +2 & -1 \end{bmatrix}.$$

Детектор границ Канны обычно включает в себя четыре основных шага. Первым шагом является уменьшение шума. Вторым шагом является выделение границ и градиентов яркости. Третий шаг удаляет все пиксели из изображения, которые не относятся к границам. Последний шаг использует пороговый фильтр для выделения границ на изображении.

Основными элементами бинарной морфологии являются структурирующий элемент, расширение, эрозия, открытие и закрытие [189], [195], [196]. Структурирующий элемент представляет собой двоичное изображение произвольной геометрической формы. Расширение является результатом логического ИЛИ структурирующего элемента и исходного изображения. Эрозия является результатом логического И структурирующего элемента и всего изображения. Закрытие — это последовательное применение расширения и эрозии к исходному изображению. Открытие — это последовательное использование эрозии и расширения. Статистическое описание количества пикселей, оставшихся после применения морфологических операций со структурирующими элементами разного размера, позволяет рассчитать так называемую гранулометрию и рассматривать неравномерность изображения как характеристику его текстуры. Текстуры локализуются с использованием подхода скользящего окна [197].

Алгоритм преобразования Хафа изначально разработан для определения прямых на изображении, позже алгоритм был доработан на случай определения произвольных кривых [185]. Преобразование Хафа используется, когда аналитическое описание искомого объекта невозможно. В этом случае на первом этапе используется детектор границ, после чего используется своего рода справочная таблица, коррелирующая расположение и ориентацию объектов в исходном изображении с некоторым набором параметров в пространстве преобразования Хафа [185].

Существуют и более сложные методы извлечения структурных особенностей текстур, например, масштабно-инвариантное преобразование особенностей текстуры (Scale-invariant

feature transform, SIFT) [198]. SIFT базируется на поиске ключевых точек на изображении, которые являются инвариантными к масштабу, сдвигу и повороту.

Для распознавания изображений часто используют метод гистограммы ориентированных градиентов (Histogram of Oriented Gradients, HOG) [199], описание которого приведено во второй главе настоящей диссертации. Локально двоичные структуры или локальные бинарные шаблоны – это признаки которые определенным образом описывают окрестность пикселя изображения [200], [201].

### *Спектральные методы*

Спектральные методы описания текстуры используют для выявления специфических характеристик изображения, применяя интегральные фильтры с выбранными параметрами (преобразования Фурье, Габора и вейвлет-преобразования) [202]–[206]. На практике коэффициенты, полученные разложением исходного сигнала по базису (Фурье, Габор, материнские вейвлеты), анализируются для установления корреляции между рисунком текстуры и фрагментом изображения [146].

### *Модельные методы*

Модельные методы описывают текстуру как математическую модель, например, фрактальную [207], [208]. В практических применениях фрактального анализа объект обычно характеризуется размером покрытия. В этом случае исходное изображение рассматривается как трехмерная область, и определяется количество блоков с размером  $r$ , которые заполняют эту область [209].

При покрытии изображения прямоугольниками размера  $r$ , размерность Минковского вычисляется по формуле:

$$D = -\frac{\log(N(r))}{\log(r)},$$

где  $N(r)$  - количество ящиков с размером  $r$ . Значение  $D$  является хорошим описанием исходной неровности поверхности.

Существуют и специализированные модели оценки ориентации коллагена [210]. При анализе изображений сначала идентифицируются его элементы, а затем рассчитывается статистика их ориентации в пространстве. Угловая дисперсия,  $V_{3D}$  может быть рассчитана по формуле:

$$V_{3D} = 1 - \bar{R}_{3D},$$

где

$$\bar{R}_{3D} = \sqrt{(\bar{C}_{3D}^c)^2 + (\bar{S}_{3D}^c)^2 + (\bar{Z}_{3D}^c)^2},$$

$$\bar{C}_{3D}^c = \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{j=1}^n \sin\varphi_j \cos\theta_j,$$

$$\bar{S}_{3D}^c = \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{j=1}^n \sin\varphi_j \sin\theta_j,$$

$$\bar{Z}_{3D}^c = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \cos\varphi_j.$$

Здесь верхний индекс  $c$  относится к циклическим данным;  $n$  - общее количество вокселей, которые вносят вклад в определение отклонения направления;  $\theta$  и  $\varphi$  - азимутальный и полярный углы, используемые для отображения ориентации в трехмерном пространстве, соответственно. Азимутальный угол  $\theta$  определяется путем проецирования волокон на плоскость  $xu$ . Для описания трехмерной ориентации используется проекция структуры на плоскость  $xz$ , вводя дополнительные углы  $\beta$  и  $\gamma$ , сходные по своему значению с углами  $\theta$  и  $\varphi$  (см. рисунок 10). Соотношение между ними следующее:

$$\tan^2\varphi = 1/\tan^2\beta + 1/\tan^2\gamma.$$

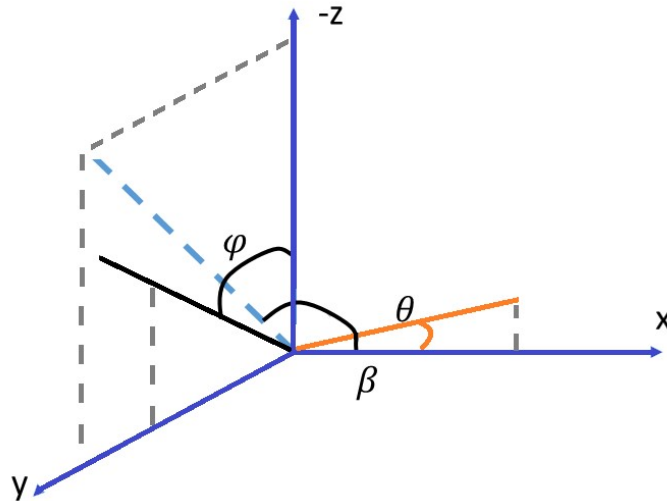


Рисунок 10 – Параметры, используемые для расчета трехмерной угловой дисперсии

### **Статистические методы**

Статистические методы описания текстур анализируют пространственное распределение значений яркости или цвета пикселей в определенной области изображения [6]. Гистограмма яркости оценивает распределение значений яркости пикселей, игнорируя при этом пространственные связи между пикселями изображения. Гистограмма яркости определяется выражением [211]:

$$H_g = n_g/N, g = 0, 1, \dots, G - 1,$$

где  $N$  - количество пикселей изображения,  $G$  - количество градаций яркости,  $n_g$  - количество пикселей с определенным значением яркости.

Гистограмма яркости описывает плотность вероятности и позволяет рассчитывать статистические характеристики изображения. Примером статистик первого порядка являются среднее значение яркости изображения, стандартное отклонение (контраст), энтропия и статистические моменты.

Статистики второго порядка оценивают вероятность наблюдения определенных значений пары пикселей на изображении. Матрица совпадений является примером статистик второго порядка. Матрица совпадений, построенная для изображения в оттенках серого, предложена в 1973 году Хараликом с соавторами и в настоящее время широко используется для извлечения векторов признаков [212]. Рассмотрим построение матрицы совпадений  $C_d(i, j)$  для изображения, представленного в  $p$  градациях яркости  $I(x, y)$ . Размер матрицы совпадений равен  $p \times p$ . Количество пар пикселей со значениями яркости  $i$  и  $j$ , расположенными на расстоянии меньше предварительно определенного значения  $d$  на пересечении  $i$ -й линии и  $j$ -го столбца матрицы совпадений, выражается через изменение координат  $(\Delta x, \Delta y)$  вдоль соответствующих полуосей:

$$C_d(i, j) = \sum_x \sum_y \begin{cases} 1, & \text{if } I(x, y) = i \text{ and } I(x + \Delta x, y + \Delta y) = j \\ 0, & \text{в противном случае} \end{cases}.$$

Матрица совпадений включает в себя ряд характерных параметров изображения (обратный разностный момент, энергия, инерция, энтропия и корреляция), которые можно использовать как вектор признаков изображения.

Обратный разностный момент количественно описывает степень однородности в интересующей области. Параметр энергии иногда называют вторым угловым моментом или однородностью матрицы смежности. Параметр энергии принимает минимальное значение, когда все функции вероятности плотности равны и нет доминирующих уровней яркости. Параметр инерции (также называемый вторым разностным моментом) отражает различия, возникающие в матрице смежности: высококонтрастные области имеют высокие значения инерции, тогда как для более однородных областей его значение является низким. Параметр корреляции количественно описывает зависимость уровней яркости пар пикселей от расстояния между ними: низкие значения корреляции означают, что уровни серого полностью независимы друг от друга, то есть изображение не имеет регулярной структуры. Если корреляция высокая, существует высокая вероятность повторения одной или нескольких текстур. Параметр энтропии характеризует отсутствие пространственной организации на изображении: энтропия высокая для грубых (крупнозернистых) текстур и низкая, когда текстура гладкая, более однородная. Подход, основанный на матрице совпадений, работает не только для изображения в градациях серого, но может быть обобщен на цветные изображения.

Метод главных компонент (МГК) — это математический подход статистического анализа многомерных данных, который обычно используется для сокращения размерности пространства признаков с минимальной потерей полезной информации. Метод главных компонент впервые предложен К. Пирсоном в 1901 г. [213], а последующее развитие данного подхода сделано американским исследователем Г. Хотеллингом [214]. Схематичное представление работы МГК показано на рисунке 11. На представленном рисунке  $X_1$  и  $X_2$  исходные координаты данных, новые координаты после преобразования МГК обозначены ГК.  $L_1, L_2, L_{ГК}$  — расстояния между точками в соответствующих проекциях.

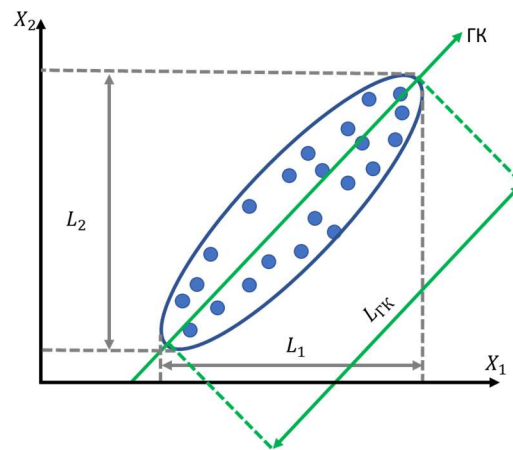


Рисунок 11 – Пример использования МГК на двумерных данных

С математической точки зрения МГК представляет собой ортогональное линейное отображение из исходного пространства признаков в новое пространство меньшей размерности. Вектор в меньшем пространстве строится таким образом, чтобы максимизировать дисперсию данных [215].

Вычисление главных компонент может быть сведено к вычислению сингулярного разложения матрицы данных или к вычислению собственных векторов и собственных значений ковариационной матрицы исходных данных. Иногда метод главных компонент называют преобразованием Кархунена — Лозва или преобразованием Хотеллинга [216]. Сравнительный анализ методов извлечения векторов признаков представлен в таблице 4.

Таблица 4 - Достоинства и недостатки методов извлечения векторов признаков

Метод	Достоинства	Недостатки
<b>Статистические</b>	легкая настройка	не подходит для извлечения ориентированных структур
<b>Спектральные</b>	хорошо для извлечения ориентированных структур	сложность расчетов
<b>Модельные</b>	хорошо для описания неровностей	не подходит для извлечения ориентированных структур
<b>Структурные</b>	хорошо для извлечения ориентированных структур	многие функции основаны на статистике, сложно выбрать оптимальные
<b>Другие</b>	универсальные методы обнаружения любой структуры	трудно учиться, требуется большая база данных изображений

На практике статистические и структурные методы наиболее часто используются для извлечения векторов признаков из-за гибкости их настройки, надежности и эффективности численной реализации.

### Раздел 1.7. Методы классификации векторов признаков

Классификация — это группа методов по разделению массива объектов на классы в соответствии с заданным критерием. Объекты в одном и том же классе считаются эквивалентными с точки зрения используемого критерия [217]. Объектами (обучающими примерами) являются вектора признаков.

Наиболее широко используемыми методами контролируемого обучения являются машины опорных векторов (МОВ) [218], искусственные нейронные сети (ИНС) [219].

Классификация с помощью МОВ реализуется посредством построения в пространстве признаков гиперплоскости, которое обеспечивает наилучшее разделение двух классов. Когда граница между классами имеет сложный вид, применяется нелинейное интегральное преобразование исходных данных с использованием ядер (см. рисунок 12). Классическими примерами ядер являются линейное ядро, радиальная базисная функция (РБФ) [220].

Линейное ядро представляет собой скалярное произведение двух векторов:  $k(x, y) = \langle x, y \rangle$ , РБФ ядро определяется выражением:  $k(x, y) = \exp(-\gamma \|x - y\|^2)$ , где  $\gamma$  — «гамма», неотрицательное число, которое интуитивно определяет, насколько далеко пример из обучающей

выборки влияет на окружение, низкие значения параметра гамма означают «далеко», а высокие значения означают «близко».

В подходе МОВ так же используется параметр регуляризации. Данный параметр связан с максимизацией решающей функции МОВ, суть которого компенсировать правильную классификацию обучающих примеров.

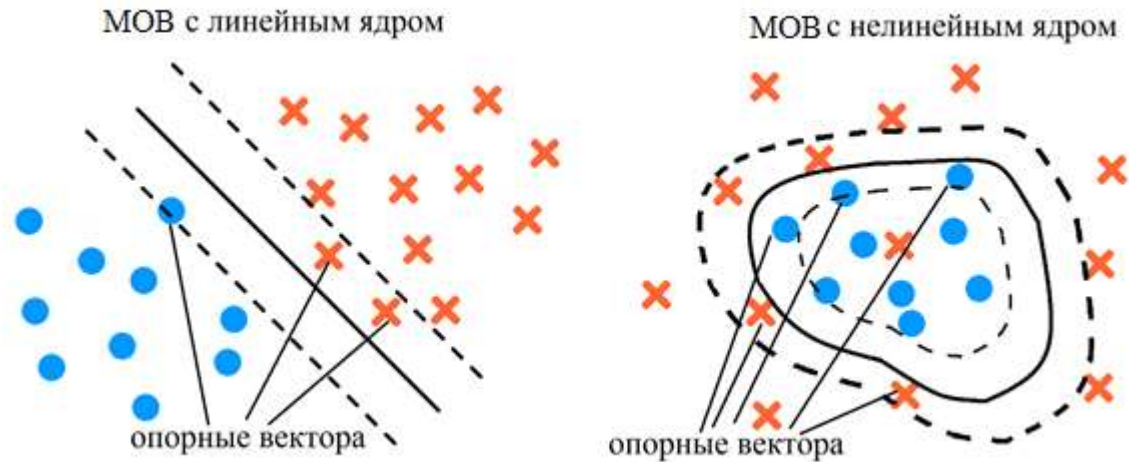


Рисунок 12 – Построение N-мерной гиперплоскости, оптимально разделяющей данные двух разных классов: а) линейный метод МОВ; б) МОВ с нелинейным ядром

ИНС базируются на принципах функционирования биологических нейронных сетей [221] и представляют собой большой класс методов основанных на системе узлов, называемых искусственными нейронами, соединенными и взаимодействующими друг с другом. Выход каждого искусственного нейрона вычисляется с помощью некоторой нелинейной функции суммы его входов. Топология сети определяется связями между нейронами разных слоев (см. рисунок 13). Каждому соединению присваивается вес. Целью обучения является корректировка весов, чтобы минимизировать ошибку между известным входным сигналом нейронной сети и результирующим значением выходного нейрона.

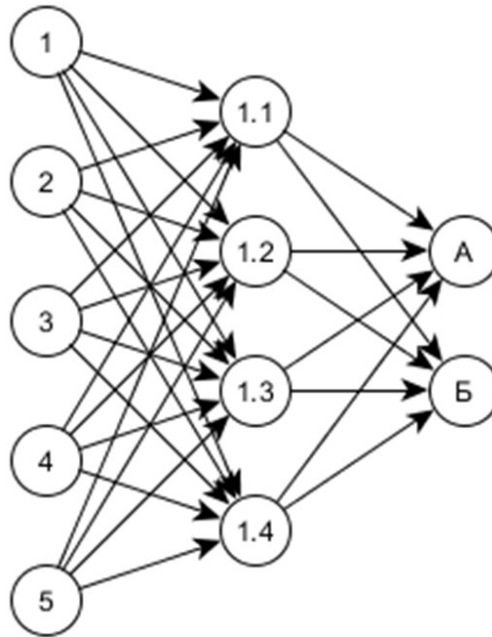


Рисунок 13 – Пример многослойного перцептрона; 1-5, входные нейроны; 1.1-1.4, скрытый слой нейронов; А и Б, выходные нейроны

Сверточная нейронная сеть (Convolutional Neural Networks, CNN) – является вариантом ИНС, который специализируется на обработке изображений, чаще всего такой тип сетей применяется для классификации изображений [222]. CNN обычно имеет три уровня: сверточный слой, слой объединения и полно-связанный слой. При этом основная часть вычислительной нагрузки приходится на сверточный слой. Сверточный слой вычисляет скалярное произведение между двумя матрицами, матрицей обучаемых параметров и областью изображения. Плюсами такого подхода является небольшое количество весов по сравнению с полносвязной ИНС, что позволяет обобщать данные в процессе работы (не попиксельному запоминанию областей изображения). Недостатком является все еще большое количество параметров сети.

Существует опасность, что обученный классификатор будет слишком хорошо приспособлен к набору исходных данных, что приведет к ошибкам в классификации новых данных. Эта проблема называется переобучением. Для ее решения используется увеличение количества данных в наборе, уменьшение количества параметров модели, регуляризация. Регуляризация основана на использовании дополнительных ограничений в модели с целью решить некорректно поставленную задачу или предотвратить переобучение [223]. В большинстве случаев регуляризация является дополнительным условием, накладывающим штраф на сложность модели, например, на слишком большие значения коэффициентов в аппроксимирующих полиномах [224].



Качество классификации можно оценить, используя отдельный набор данных для тестирования, то есть данные, разбитые на классы, но не используемые в процессе обучения. Чаще всего эта идея реализуется с использованием методов перекрестной проверки, основанных на манипуляциях с наборами данных. Например, стратегия скользящего контроля по отдельным объектам (Leave-one-out) [225] предполагает обучение с использованием наборов данных, полученных в результате последовательного удаления каждого элемента данных, с последующим изучением оставшегося набора данных; удаленный элемент используется для проверки классификатора. Точность классификации в этом случае определяется средней точностью в каждом таком наборе. Существуют также другие методы валидации, которые более подробно описаны в [226].

## **Раздел 1.8 Заключение к главе 1**

Из литературных данных следует, что дезорганизация пространственной структуры коллагена и соотношение коллагена и эластина могут быть использованы как диагностические маркеры лимфедемы. На момент постановки задач диссертации не было работ, посвященных исследованию пространственной дезорганизации коллагена и соотношения коллагена и эластина у пациентов с лимфедемой. Данные признаки могут регистрироваться методами ДФМ и КАРС. ДФМ имеет преимущество перед КАРС при исследовании коллагена и эластина за счет использования различных эффектов взаимодействия оптического излучения с биомолекулами (генерация второй гармоники, автофлуоресценция).

МОВ предпочтителен по сравнению с ИНС, поскольку имеет относительно небольшое количество параметров и более устойчив к переобучению на малых выборках.

## 2. Выбор и обоснование аналитических и экспериментальных методик *in vivo* визуализации структуры коллагена и эластина методом ДФМ.

Целью данной главы является разработка протокола измерения сигналов АФ и ГВГ кожи *in vivo* с использованием ДФМ и разработка подходов для анализа данных ДФМ.

### Раздел 2.1 Разработка протокола исследования кожи методом ДФМ

ДФМ основана на двухфотонном возбуждении электронного перехода в течение одного квантового события. Двухфотонный микроскоп состоит из следующих основных блоков: фемтосекундный лазер, объектив, частотные фильтры и детекторы. Рисунок 14а иллюстрирует принцип работы ДФМ. В диссертации использовался ДФМ MPTflex (Jenlab GmbH, Германия) (см. рисунок 14б) [227]. Данный микроскоп оборудован перестраиваемым фемтосекундным титан-сапфировым лазером (Mai Tai, Spectra Physics, США) формирующим 200фс импульсы с частотой повторения 80МГц на перестраиваемой от 710 до 920нм длине волны. Объектив имеет 40-кратное увеличение с числовой апертурой 1.3. Данная система имеет два детектора, перед каждым из которых расположен фильтр на диапазоны 406-660нм и 373-387нм, соответственно (см. рисунок 14а). Пространственное разрешение: в горизонтальной плоскости – не хуже 0.5мкм, в вертикальной ~ 2мкм.

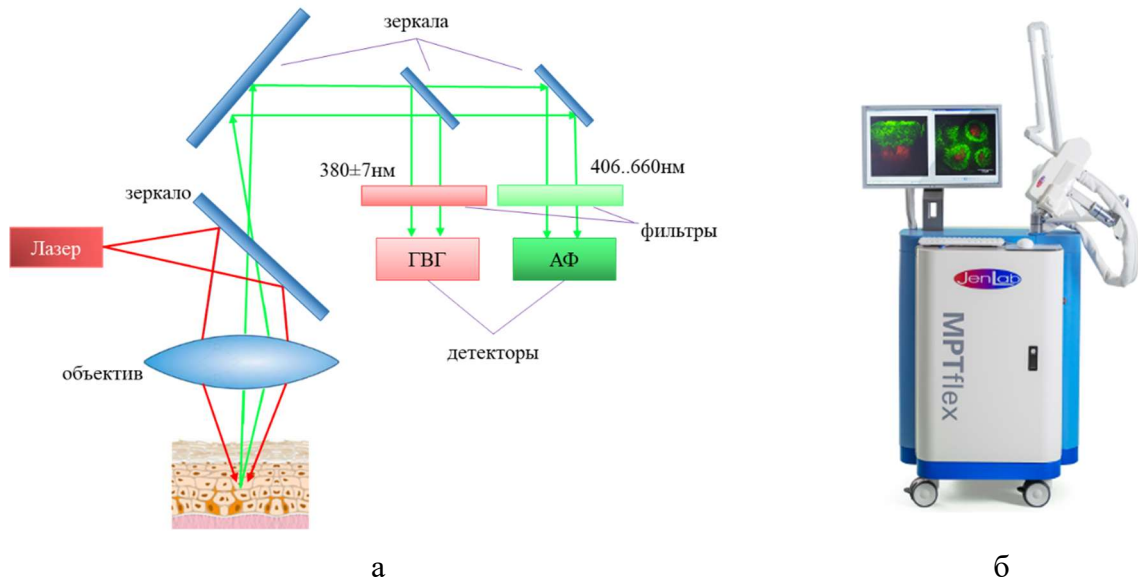


Рисунок 14 – Принцип работы ДФМ (а): ГВГ – детектор сигнала ГВГ, АФ – детектор сигнала АФ; внешний вид ДФМ MPTflex (б)

Флуоресценция биомолекул, таких как NAD(P)H, флавины, порфирины, эластин и меланин наблюдается в спектральной области от 400 до 700нм [228]–[230]. Параметры флуоресценции основных биомолекул представлены в таблице 5. Коллаген можно идентифицировать по сигналу ГВГ на длине волны 380нм при двухфотонном возбуждении на длине волны 760нм.

Таблица 5 - Параметры флуоресценции биологических молекул [228], [229]

Флуорофоры	Длина волны возбуждения, нм	Положение максимума спектра излучения, нм	Среднее время жизни флуоресценции, нс	Литература
<b>Метаболические коферменты</b>				
NAD(P)H	330-360(ОФВ) <760(ДФВ), 590(ДФВ)	440	0.4 (свободный) 16.5 * (связный)	[156], [231]– [234]
Флавинадениндину клеотид	360 450 (ОФВ) 725-760 (ДФВ) 850-950 (ДФВ) 800-900 (ДФВ)	450 490-650	2.3-2.9 (свободный) 0.04-0.4 (связный)	[156], [231], [235]–[238]
Флавин- мононуклеотид	444 (max)	558 (max)	4.27 to 4.67	[10], [11]
<b>Структурные белки</b>				
Коллаген	280-350 (ОФВ) 760 (ДФВ)	370-440	0.2-0.4, 0.4-2.5, 1	[170], [240]– [242]
Эластин	300-370(ОФВ) 760(ДФВ) 730-830 (ДФВ)	420-460 475 460-575	0.2-0.4, 0.4-2.5 1.3 0.260, 1.96	[170], [240], [242], [243]
<b>Аминокислоты</b>				
Триптофан	280(ОФВ) 600(ДФВ) 760(ДФВ)	310-360 * 250-310	0.110* 3.03	[240], [244]– [247]
Фенилаланин	258 (max)	280 (max)	7.5	[240]
Тирозин	275 (max)	300 (max)	2.5	[240]
<b>Витамины</b>				
Витамин Д <sub>2</sub> , Д <sub>3</sub>	<700 (ДФВ)	400-500	N/A	[20], [21]
Витамин Д	390 (max) (ОФВ)	480 (max)	N/A	[250]
Ретинол	327(ОФВ) 700- 830 (свободный) (ДФВ)	510 ~500 (свобод ный)	1.8, 5.0 (свободный), 0.7, 3.6, 12 (связный) 1.8, 5.0, 0.7, 3.6, 12	[248], [250], [251]
Витамин К	335 (max) (ОФВ)	480 (max)		[250]
Витамин В <sub>6</sub>	330 (max) (ОФВ)	420 (max)	0.6-8.4	[252], [253]

Окончание Таблицы 5

Витамин В12	275 (max) (ОФВ)	305 (max)	-	[250]
Рибофлавин	420-500 (ОФВ)	520 to 750	4.12	[240]
<b>Пигменты</b>				
Кератин	277(ОФВ) 350(ОФВ) 700-900(ДФВ) 764 (ДФВ)	382(ОФВ) 420 450-520** 465	1.4	[243], [254]– [256]
Меланин	760-800(ДФВ) 750-820 (ДФВ)	550	0.1 0.5 1.8	[257], [258]
Эумеланин	355	520	0.058, 0.51, 2.9, 7	[259], [260]
Липофусцин	400-500(ОФВ) 755, 860(ДФВ) 800 (ДФВ)	480-700	0.4	[236], [256], [261]–[264]
Протопорорфин IX	400-450	630, 690, 710	9.7-16	[250], [265]
Билирубин	350-520	480-650	0.02-0.09, 1-2	[266], [267]
Примечание: Обозначения: ОФВ, ДФВ, ТФВ - одно-, двух- и трех- фотонное возбуждение, соответственно; * в зависимости от окружающей среды; ** в зависимости от длины волны возбуждения				

Обычно сигналы ДФМ сохраняются в виде изображения, состоящего из трех цветовых каналов:  $R$  – красный,  $G$  – зеленый,  $B$  – синий. Сигнал ГВГ записывают в канал  $R$ , а сигнал АФ в канал  $G$ , канал  $B$  обычно заполняется нулями.

Результаты последующей обработки напрямую связаны с качеством изображений (например, при сильном размытии изображения градиентные методы имеют сильную погрешность [185]). Качество регистрируемых изображений биоткани зависит от глубины сканирования, выбранной мощности лазера, времени экспозиции. Количественная оценка качества изображений является важной как на этапе их регистрации, так и на последующих этапах обработки [268]. Качество изображений связано с показателями яркости, контрастности, насыщенности [186, 268]. Мера однородности изображения дает объективные значения качества и базируется на оценивании изменений показателей яркости, контрастности, насыщенности в пределах изображения [269].

Яркость изображения определяется как суммарная яркость по всем 3 каналам (для ДФМ сигнал в канале  $B$  равен нулю):

$$Y_{x,y} = R_{x,y} + G_{x,y} + B_{x,y},$$

где  $Y_{x,y}$  – яркость в пикселе с координатами  $x, y$ ,  $R_{x,y}, G_{x,y}, B_{x,y}$  значения яркости пикселя с координатами  $(x, y)$  в канале  $R$ ,  $G$  и  $B$ , соответственно. Поскольку чувствительность

человеческого глаза к разным частям спектра неодинакова, воспринимаемую яркость оценивают по формуле:

$$Y^v_{x,y} = 0.299 \cdot R_{x,y} + 0.587 \cdot G_{x,y}.$$

Контрастность характеризует чувствительности зрения человека относительно яркости. Существует несколько способов определения контрастности [[185]], контрастность Вебера определяется как:

$$c = \frac{Y_s - Y_b}{Y_s},$$

где  $Y_s$  – яркость изображения,  $Y_b$  – яркость фона.

Другое определение контрастности связано со среднеквадратичным отклонением яркости пикселя от его средней яркости:

$$c = \sqrt{\frac{1}{MN} \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N (Y_{x,y} - \bar{Y})^2},$$

где  $c$  – контрастность,  $Y_{x,y}$  – измеренная яркость изображения,  $\bar{Y}$  – среднее значение яркости на изображении.

Насыщенность определяют, как отличие цвета от ахроматического (в котором отсутствует цветовое содержание) при их одинаковой яркости. В RGB-пространстве насыщенность пикселя можно выразить как расстояние до диагонали ахроматических цветов:

$$h_{x,y} = \sqrt{R_{x,y}^2 + G_{x,y}^2 + B_{x,y}^2 - \frac{(R_{x,y} + G_{x,y} + B_{x,y})^2}{3}}.$$

Обычно в качестве меры однородности изображения используют энтропию:

$$F(z) = - \frac{\sum_{x,y=(0,0)}^{N_x N_y} z_{x,y} \ln z_{x,y}}{\ln N_x \cdot N_y}, \quad (4)$$

где  $z_{x,y}$  – значения соответствующего показателя (яркость, контрастность, насыщенность) в пикселе с координатами  $(x, y)$ , а  $N_x, N_y$  – количество точек вдоль осей  $x$  и  $y$ , соответственно (ширина и высота изображения). Для вычисления меры однородности используется нормированные значения расстояний между яркостью пикселя и значением контрастности.

Чем больше энтропия, тем лучше качество изображения. Объединим данную метрику по всем трем параметрам (яркость, контраст, насыщенность) и перепишем ее в виде нормированной суммы всех компонентов:

$$M = \frac{1}{3} (F(Y) + F(h) + F(c)). \quad (5)$$

Резкость может быть оценена путем вычисления меры эксцесса (отношения четвертого центрального момента и квадрата второго центрального момента) двумерного спектра Фурье [270]. Эксцесс в частотной области рассчитывается как отношение центрального момента четвертого порядка к квадрату дисперсии.

$$\gamma_2 = \frac{\mu_4}{\mu_2^2} = \frac{\mu_4}{\sigma^4} = \frac{1}{NM} \sum_{x=1, y=1}^{N, M} \frac{(x_i - \bar{x})^4}{\sigma^4},$$

где  $\mu_2, \mu_4$  – второй и четвертый центральные моменты вычисленный по всем частотам,  $\sigma$  – стандартное отклонение частоты от среднего значения частоты.

Альтернативный способ вычисления резкости заключается в оценке разности яркости соседний пикселей:

$$RQ = \frac{1}{K} \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N \frac{(|f_{x,y} - f_{x-1,y}| + |f_{x,y} - f_{x,y-1}|)^2}{(N_x - 1)(N_y - 1)}, \quad (6)$$

где  $f_{x,y}$  – значение яркости пикселя с координатами  $(x, y)$ ;  $K$  – половина максимального значения яркости,  $N_x, N_y$  – высота и ширина изображения

Как правило, ДФМ позволяет получать изображения кожи человека на глубине до 200мкм, при этом ВКМ начинается от 60-85мкм, сразу за базальной мембраной, которая отделяет ВКМ от эпидермиса. Таким образом, при переборе параметров достаточно выбрать глубину сканирования в диапазоне от 60 до 200мкм и определить на какой глубине получают избоб с высоким показателем качества и резкости.

Чтобы выбрать оптимальную глубину визуализации, область сканирования, время экспозиции и мощность, были проведены предварительные измерения кожи здорового человека. При анализе рассмотрены только изображения ГВГ. Определение оптимальной глубины, на которой получается наилучшее качество изображения, осуществлялось путем анализа данных, полученных в диапазоне от 60 до 200мкм. Каждое изображение на разной глубине и с разным значением мощности оценивалось с помощью метрики качества  $M$  (5) и метрики резкости  $RQ$  (6). Установлено, что изображения с высоким качеством получаются на глубине 100-120мкм (см. рисунок 15). На малой глубине количество коллагена мало, поэтому почти отсутствует сигнал ГВГ, метрика  $M$  и  $RQ$  имеет низкие значения. На большей глубине резкость изображений падает, что так же выражается в низком значении метрики  $RQ$ . На глубине больше 130мкм, метрика качества  $M$  резко уменьшается.

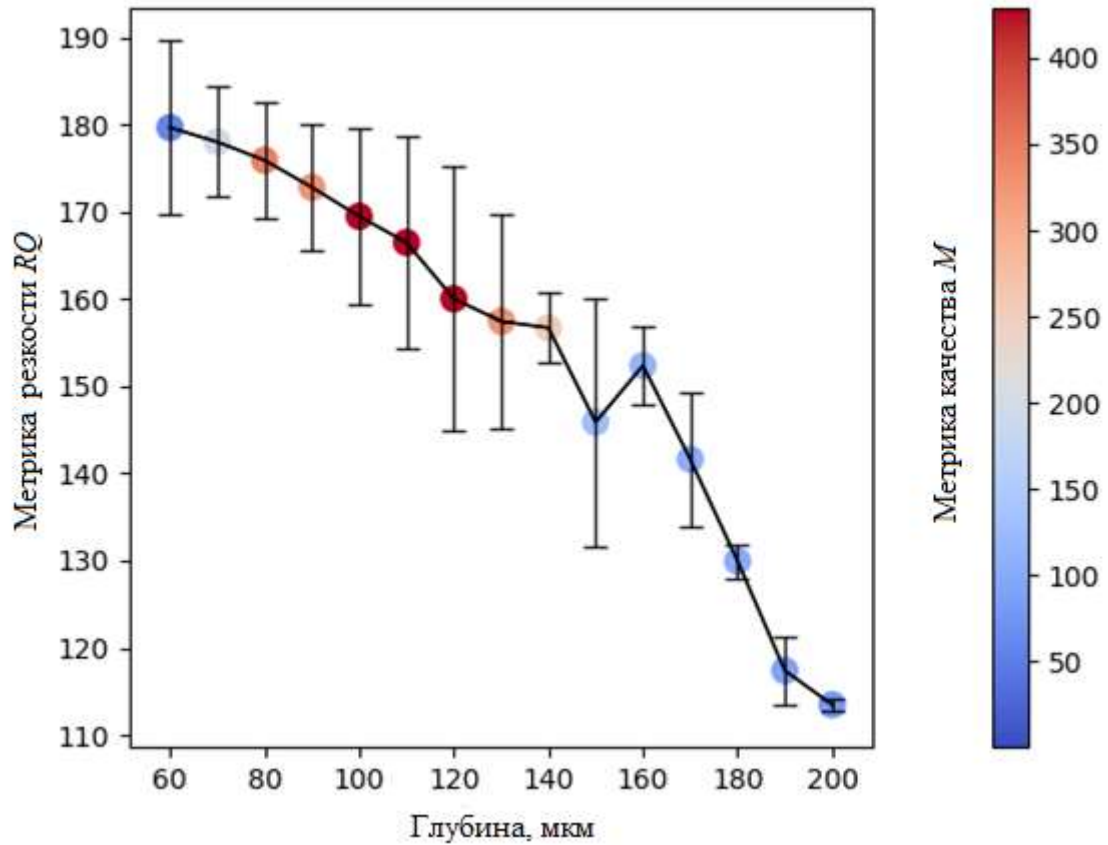


Рисунок 15 – Зависимость качества изображения ГВГ от глубины для времени экспозиции 15 секунд и мощности лазера накачки 20-50 мВт

При сканировании изображений с длительным временем экспозиции, возникают артефакты, связанные с естественной подвижностью конечности в процессе сканирования (на рисунке 16 изображен пример изображения с артефактами, полученный на глубине 100 мкм при времени экспозиции 45 секунд и мощности 50 мВт).

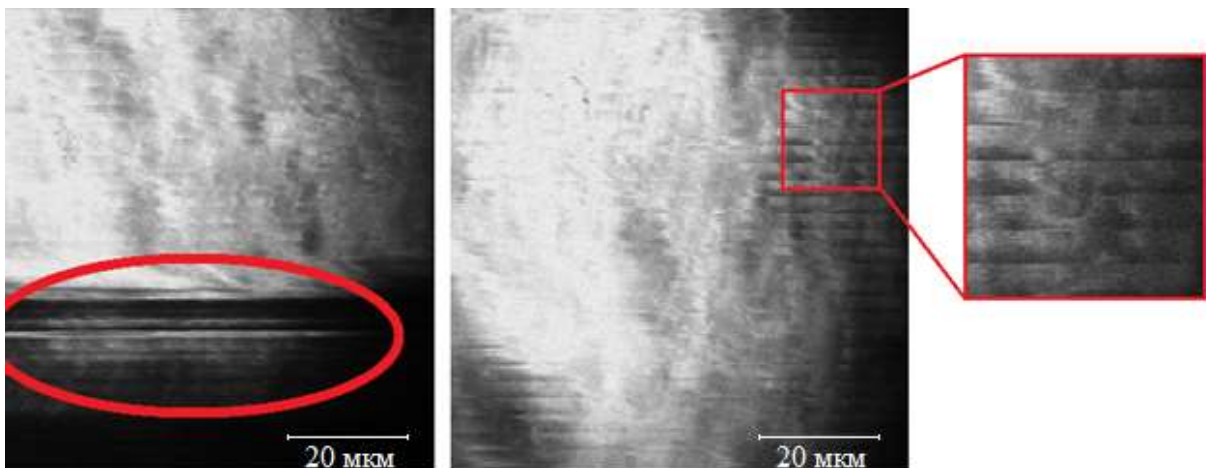


Рисунок 16 – Примеры изображений с артефактами, возникшими из-за движения конечности в процессе сканирования

Для того, чтобы оценить параметры мощности и времени экспозиции, проводилась серия измерений и находились значения метрик  $M$  и  $RQ$ . Использовались следующие значения времени экспозиции: 5, 15, 30 и 45 секунд, параметр мощности менялся в диапазоне от 20 до 50 мВт с шагом 10 мВт. В таблицах 6 и 7 отражены результаты вычисления метрики  $M$  и  $RQ$  для кожи человека на глубине 100 мкм с разными параметрами мощности и времени экспозиции.

Таблица 6 – Метрика качества  $M$  в зависимости от времени экспозиции и мощности сканирования

Время экспозиции	Мощность, мВт			
	20	30	40	50
5	100±31	121±33	138±38	168±39
15	243±65	274±63	294±71	374±91
30	370±87	430±93	428±101	481±123
45	400±104	470±143	501±173	573±153

Результаты, приведенные в таблице, показывают, что с увеличением времени экспозиции и мощности излучения, метрика  $M$  увеличивается.

Таблица 7 – Метрика резкости  $RQ$  в зависимости от времени экспозиции и мощности сканирования

Время экспозиции	Мощность, мВт			
	20	30	40	50
5	103±41	123±53	148±38	163±47
15	165±32	172±36	173±41	175±37
30	154±37	168±43	170±51	172±34
45	157±53	164±53	163±53	168±31

Как видно из таблиц, количество шумов становится меньше при большем времени экспозиции и мощности, резкость на изображении растет при увеличении времени экспозиции, однако при времени экспозиции, больше 15с, значительно не увеличивается, более того появляются артефакты при времени экспозиции 30с и более. Соответственно, целесообразно использовать малое время экспозиции.



## Раздел 2.2 Методы предварительной обработки данных

### 2.2.1 Подходы к обработке FLIM данных

Существуют, по крайней мере, два способа анализа кривой FLIM: экспоненциальная аппроксимация [271] или ее преобразование в фазорную плоскость (phasor plot) [272].

При регистрации данных FLIM, флуоресценция детектируется с ненулевой шириной функции отклика прибора, которую так же называют «импульсной переходной функцией» (ИПФ, impulse response function, IRF). Ширина ИПФ определяется как сумма квадратов отдельных вкладов временного разброса: ширина оптического импульса возбуждающего света, разброс времени прохождения детектора, джиттер электроники детекции и синхронизации [273]. Экспериментально ИПФ функцию определяют путем измерения рэлеевского рассеяния коллоидных частиц [274]. ИПФ так же можно смоделировать из предположения о гауссовой природе этой функции [275]. Последнее обычно используется в коммерческих пакетах подсчета одиночных фотонов с временной корреляцией, таких как SPCImage (Becker & Hickl) [276].

Таким образом, зарегистрированный сигнал FLIM является результатом свертки истинной функции затухания флуоресценции и ИПФ:

$$I_m(t) = \int_{\tau=0}^t I(\tau) \cdot IRF(t - \tau) d\tau, \quad (7)$$

где  $I_m(t)$  – измеренный сигнал флуоресценции,  $I(\tau)$  – истинная кривая FLIM,  $IRF(t - \tau)$  - ИПФ.

Поиск истинной кривой FLIM совершается процедурой подгонки: определяется модельная ИПФ затухания флуоресценции, вычисляется интеграл свертки модельной функции и ИПФ, и результат сравнивается с измеренными данными. Обычно для ДФМ ИПФ аппроксимируется функцией Гаусса с полушириной равной 230пс с положением пика в 50-м (2,45нс) интервале времени [277].

При экспоненциальной аппроксимации экспериментальных данных FLIM, подбирают параметры модели, так чтобы добиться наилучшего совпадения (для оценки близости обычно используется критерий Пирсона) [276]. Много-экспоненциальная модель описывается формулой:

$$I(t) = \sum_{i=1}^N a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (8)$$

где  $N$  - число флуорофоров,  $\tau_i$  – время жизни флуоресценции,  $a_i$  – амплитудные коэффициенты. Двух-экспоненциальная модель описывается уравнением (8) при  $N = 2$ . Принято обозначать время жизни флуоресценции так чтобы  $\tau_1 < \tau_2$ , а сами коэффициенты называют коротким и длинным временами жизни флуоресценции,  $a_1, a_2$  – амплитуды каждой из компонент. В рамках

данного подхода используют:  $\tau_1, \tau_2$ , отношение медленной и быстрой амплитуд флуоресценции  $\frac{a_1}{a_2}$ . Среднее время жизни флуоресценции  $\tau_m$ , определяется формулой:

$$\tau_m = (\tau_1 a_1 + \tau_2 a_2) / (a_1 + a_2). \quad (9)$$

Проектирование данных FLIM в фазорную плоскость осуществляется преобразованием Фурье:

$$T(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} I(t) e^{-j\omega t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt - j \int_{-\infty}^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt \quad (10)$$

где  $j$  – мнимая единица,  $\omega$  – частота,  $I(t)$  – истинная кривая FLIM (см. (7)). Как оказалось [278], хорошее представление кривой FLIM получается уже использованием (10) на основной частоте  $\omega = \frac{2\pi}{T}$  (первая компонента Фурье), где  $T$  – значение интервала кривой FLIM. Для MPTflex это значение равно 12.5нс. Полученное комплексное число отображается на двумерном графике, где ось абсцисс представляет действительную составляющую, а ось ординат – мнимую. При таком подходе учитывают неотрицательность параметра  $t$  и нормируют на суммарное количество фотонов, равных  $\int_0^{\infty} I(t)$ , а оси абсцисс и ординат обозначают символами  $g$  и  $s$ , соответственно, где:

$$g(\omega) = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t)}, \quad s(\omega) = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t)}. \quad (11)$$

Данный подход удобен тем, что кривой FLIM ставится в соответствие точка на фазорном графике.

С учетом (8), выражение (10) можно переписать следующим образом:

$$g(\omega) = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t)} = \frac{\int_0^{\infty} a \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \left( \frac{e^{-j\omega t} + e^{j\omega t}}{2} \right) dt}{\int_0^{\infty} a \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} dt} = \frac{1}{2} \frac{\int_0^{\infty} e^{-(\frac{1}{\tau} + j\omega)t} dt + \int_0^{\infty} e^{-(\frac{1}{\tau} - j\omega)t} dt}{\int_0^{\infty} e^{-\frac{t}{\tau}} dt} =$$

$$\frac{\left| \frac{e^{-(\frac{1}{\tau} + j\omega)t}}{-(\frac{1}{\tau} + j\omega)} \right|_0^{\infty} + \left| \frac{e^{-(\frac{1}{\tau} - j\omega)t}}{-(\frac{1}{\tau} - j\omega)} \right|_0^{\infty}}{2 \left| e^{-\frac{t}{\tau}} \right|_0^{\infty}} = \frac{\left[ \left( \frac{e^{-\infty} - e^0}{-(\frac{1}{\tau} + j\omega)} \right) + \left( \frac{e^{-\infty} - e^0}{-(\frac{1}{\tau} - j\omega)} \right) \right]}{2 \left( \frac{e^{-\infty} - e^0}{-\frac{1}{\tau}} \right)} = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{1 + j\omega\tau} \right) + \frac{1}{2} \left( \frac{1}{1 - j\omega\tau} \right) = \frac{1}{2} \cdot \frac{1 - j\omega\tau + 1 + j\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} = \frac{1}{1 + \omega^2\tau^2}$$

аналогично для  $s$ :

$$s(\omega) = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t)} = \frac{\int_0^{\infty} a \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \left( \frac{e^{-j\omega t} - e^{j\omega t}}{2j} \right) dt}{\int_0^{\infty} a \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} dt} = \frac{1}{2j} \left( \frac{1}{1 + j\omega\tau} \right) - \frac{1}{2j} \left( \frac{1}{1 - j\omega\tau} \right) = \frac{1}{2} \left( \frac{1}{j - \omega\tau} \right) - \frac{1}{2} \left( \frac{1}{j + \omega\tau} \right) =$$

$$\frac{(j + \omega\tau - j + \omega\tau)}{2(1 + \omega^2\tau^2)} = \frac{\omega\tau}{(1 + \omega^2\tau^2)}.$$

Комбинируя фазорный подход с много-экспоненциальной моделью, данные формулы можно переписать в виде:

$$g(\omega) = \sum_{i=1}^N \frac{f_i}{1 + \omega^2\tau_i^2}, \quad s(\omega) = \sum_{i=1}^N \frac{f_i\omega\tau_i}{1 + \omega^2\tau_i^2} \quad (12)$$

где  $N$  — число флуорофоров,  $f_i$  — относительный вклад  $i$ -го флуорофора с временем жизни флуоресценции  $\tau_i$  в общую интенсивность флуоресценции.

Для одно-экспоненциальной модели значение  $\tau$  может быть непосредственно определено значениями координат вектора  $g$  и  $s$ . Точки, соответствующие кривой FLIM, расположены на полуокружности, проходящей через точки  $(0, 0)$ ,  $(1, 0)$  и  $(1/2, 1/2)$  фазорного графика. Такую полуокружность называют универсальной, и она представляет собой все возможные пространственно-инвариантные однокомпонентные модели FLIM [279].

Определим вклад  $f_1$  и  $f_2$  (12) в случае двух-экспоненциальной модели:

$$g(\omega) = \frac{\frac{1}{2} a_1 \int_0^\infty e^{-\left(\frac{1}{\tau_1} + j\right)t} dt + a_1 \int_0^\infty e^{-\left(\frac{1}{\tau_1} + j\omega\right)t} dt + a_2 \int_0^\infty e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} - j\omega\right)t} dt + a_2 \int_0^\infty e^{-\left(\frac{1}{\tau_2} - j\omega\right)t} dt}{a_1 \int_0^\infty e^{-\frac{t}{\tau_1}} dt + a_2 \int_0^\infty e^{-\frac{t}{\tau_2}} dt} =$$

$$\frac{1}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2} \left[ \frac{a_1}{2} \left( \frac{\tau_1}{1 + j\omega \tau_1} \right) + \frac{a_1}{2} \left( \frac{\tau_1}{1 - j\omega \tau_1} \right) + \frac{a_2}{2} \left( \frac{\tau_2}{1 + j\omega \tau_2} \right) + \frac{a_2}{2} \left( \frac{\tau_2}{1 - j\omega \tau_2} \right) \right] =$$

$$\frac{1}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2} \left[ \frac{a_1 \tau_1}{2} \left( \frac{1 - j\omega \tau_1 + 1 + j\omega \tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} \right) + \frac{a_2 \tau_2}{2} \left( \frac{1 - j\omega \tau_2 + 1 + j\omega \tau_2}{1 + \omega^2 \tau_2^2} \right) \right] = \frac{1}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2} \left[ \frac{a_1 \tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + \frac{a_2 \tau_2}{1 + \omega^2 \tau_2^2} \right] = \frac{a_1 \tau_1}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2} + \frac{a_2 \tau_2}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2} \frac{1}{1 + \omega^2 \tau_2^2},$$

таким образом, получаем, что  $f_1 = \frac{a_1 \tau_1}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}$ ,  $f_2 = \frac{a_2 \tau_2}{a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2}$ .

Как упоминалось выше, фиксируя  $\omega = \frac{2\pi}{T}$ , получаем разложение вектора сложного вида  $(g, s)$  в виде линейной комбинации нескольких векторов, каждый из которых представляет отдельный флуорофор (Рисунок 17). Положение кривой FLIM отдельного флуорофора на плоскости в случае одно-экспоненциальной модели определяется выражением  $\frac{1}{1 + \omega^2 \tau^2}$  (см. формулу (12)). Следовательно, для двух-экспоненциальной модели коэффициенты  $f_1$  и  $f_2$  показывают долю отдельных флуорофоров на фазорной плоскости.

Наиболее важной особенностью такого анализа является простое графическое представление измеренных данных. Правила интерпретации данных в фазорной плоскости [272]:

1. Одиночные флуорофоры, описываемые одно-экспоненциальной моделью, лежат на окружности.
2. В случае двух-экспоненциальной модели точки находятся внутри окружности и представляют собой линейную комбинацию их одиночных экспоненциальных составляющих FLIM

Схематично данные правила представлены на рисунке 17.

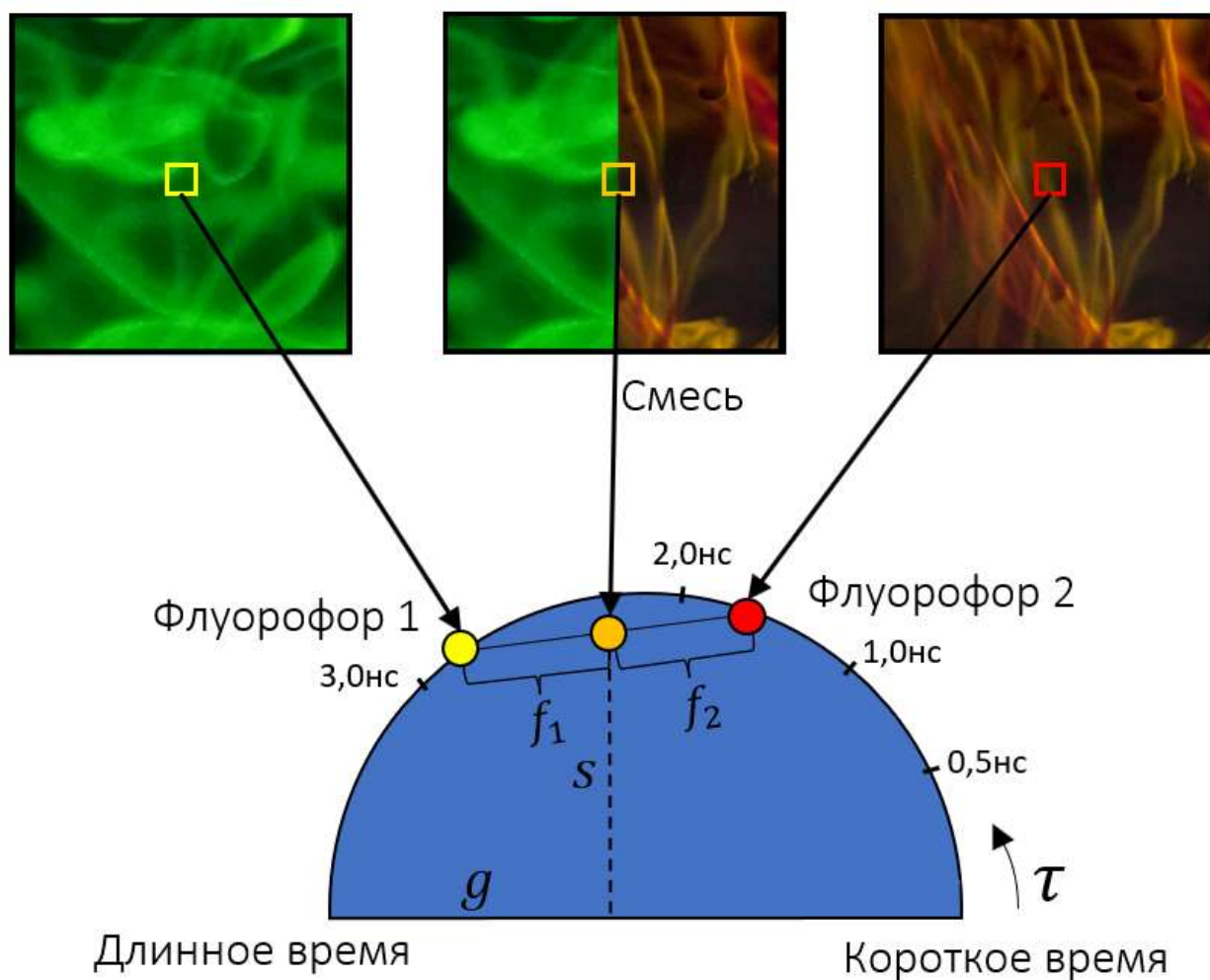


Рисунок 17 – Пример применения фазового подхода

Представленные подходы (двух-экспоненциальная аппроксимация и фазорный подход) позволяют проводить оценку кривых FLIM, эти подходы дополняют друг друга.

### 2.2.2 Применение фильтрации для улучшения ДФМ изображений

Данные FLIM часто регистрируются не в одной точке, а в некоторой пространственной области, чтобы улучшить отношение «сигнал-шум». Другой способ решения данной задачи состоит в фильтрации данных. Методы фильтрации FLIM данных аналогичны фильтрации простых изображений, с некоторыми дополнениями, так как фильтрация может быть осуществлена и во временной области.

В случае FLIM данных речь идет о трехмерной матрице  $F(x, y, t)$ , которая дает информацию о количестве фотонов, зарегистрированных в определенном месте в определенное время. Для учета аддитивного случайного шума измеренный сигнал можно представить как сумму основного сигнала  $G(x, y, t)$  и шумовой составляющей  $N(x, y, t)$ :

$$F(x, y, t) = G(x, y, t) + N(x, y, t).$$

Аддитивный шум хорошо фильтруется при помощи пространственных фильтров. Самыми распространёнными пространственными фильтрами являются: усредняющие фильтры (в качестве среднего может быть выбрано арифметическое, взвешенное, геометрическое, гармоническое, контрагармоническое), основанные на порядковых статистиках (медианный, ранговый и выборе максимального и минимального значения), адаптивные (фильтр Малика-Перона) [185]

Усредняющие фильтры используют локальное усреднение для подавления импульсных и аддитивных шумов. Математическое описание пространственного арифметического усредняющего фильтра имеет вид [185]:

$$F(x, y, t) = \frac{1}{4 \cdot w_x \cdot w_y} \sum_{(\tilde{x}, \tilde{y})=(-w_x, -w_y)}^{(w_x, w_y)} G(x - \tilde{x}, y - \tilde{y}, t),$$

где  $w_x, w_y$  – размер локальной области, по которой происходит усреднение по  $x$  и  $y$  соответственно. Усредняющие фильтры сглаживают локальные вариации яркости на изображении, и в результате происходит уменьшение шума.

Геометрический усредняющий фильтр имеет вид [185]:

$$F(x, y, t) = \left[ \prod_{(\tilde{x}, \tilde{y})=(-w_x, -w_y)}^{(w_x, w_y)} G(x - \tilde{x}, y - \tilde{y}, t) \right]^{\frac{1}{4 \cdot w_x \cdot w_y}}.$$

Фильтр на базе геометрического среднего оставляет больше деталей, однако более чувствителен к резким перепадам яркости.

Среднегармонический фильтр имеет вид [185]:

$$F(x, y, t) = \frac{4 \cdot w_x \cdot w_y}{\sum_{(\tilde{x}, \tilde{y})=(-w_x, -w_y)}^{(w_x, w_y)} \frac{1}{G(x - \tilde{x}, y - \tilde{y}, t)}}.$$

Такой фильтр значительно улучшает качество изображений в случае «белого» шума (под «белым» шумом понимается появление белых точек на изображении), но не работает в случае «черного» шума (под «черным» шумом понимается появление черных точек на изображении). В свою очередь контрагармонический фильтр не имеет таких недостатков при выборе положительных значений параметра  $Q$ :

$$F(x, y, t) = \frac{\sum_{(\tilde{x}, \tilde{y})=(-w_x, -w_y)}^{(w_x, w_y)} G(x - \tilde{x}, y - \tilde{y}, t)^{Q+1}}{\sum_{(\tilde{x}, \tilde{y})=(-w_x, -w_y)}^{(w_x, w_y)} G(x - \tilde{x}, y - \tilde{y}, t)^Q},$$

где  $Q$  - порядок фильтра. Данный фильтр убирает «белый» шум при отрицательных значениях  $Q$  и «черный» шум при положительных значениях. Так же можно отметить, что при значении  $Q = 0$  данный фильтр сводится к арифметическому фильтру, а при  $Q = -1$  к среднегармоническому.

Взвешивающие фильтры представляют собой усреднение с учетом весового коэффициента для каждой точки окрестности. Математически это можно описать следующим образом:

$$F(x, y, t) = \frac{1}{4 \cdot w_x \cdot w_y} \sum_{(\tilde{x}, \tilde{y})=(-w_x, -w_y)}^{(w_x, w_y)} K(\tilde{x}, \tilde{y}) G(x - \tilde{x}, y - \tilde{y}, t),$$

где  $K(x, y)$  – функция весов. В случае Гауссова фильтра, данная функция имеет вид:

$$K(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma} e^{-(x^2+y^2)/2\sigma^2},$$

где  $x, y$  — координаты точки,  $\sigma$  — среднеквадратическое отклонение функции Гаусса.

Результат работы усредняющих фильтров зависит от окружения рассматриваемой точки, и может быть реализован как по пространству, так и по времени. Вычисление одной точки в усредняющем фильтре (один шаг) называют скользящим окном. Наглядная схема скользящего окна представлена на рисунке 18 [185].

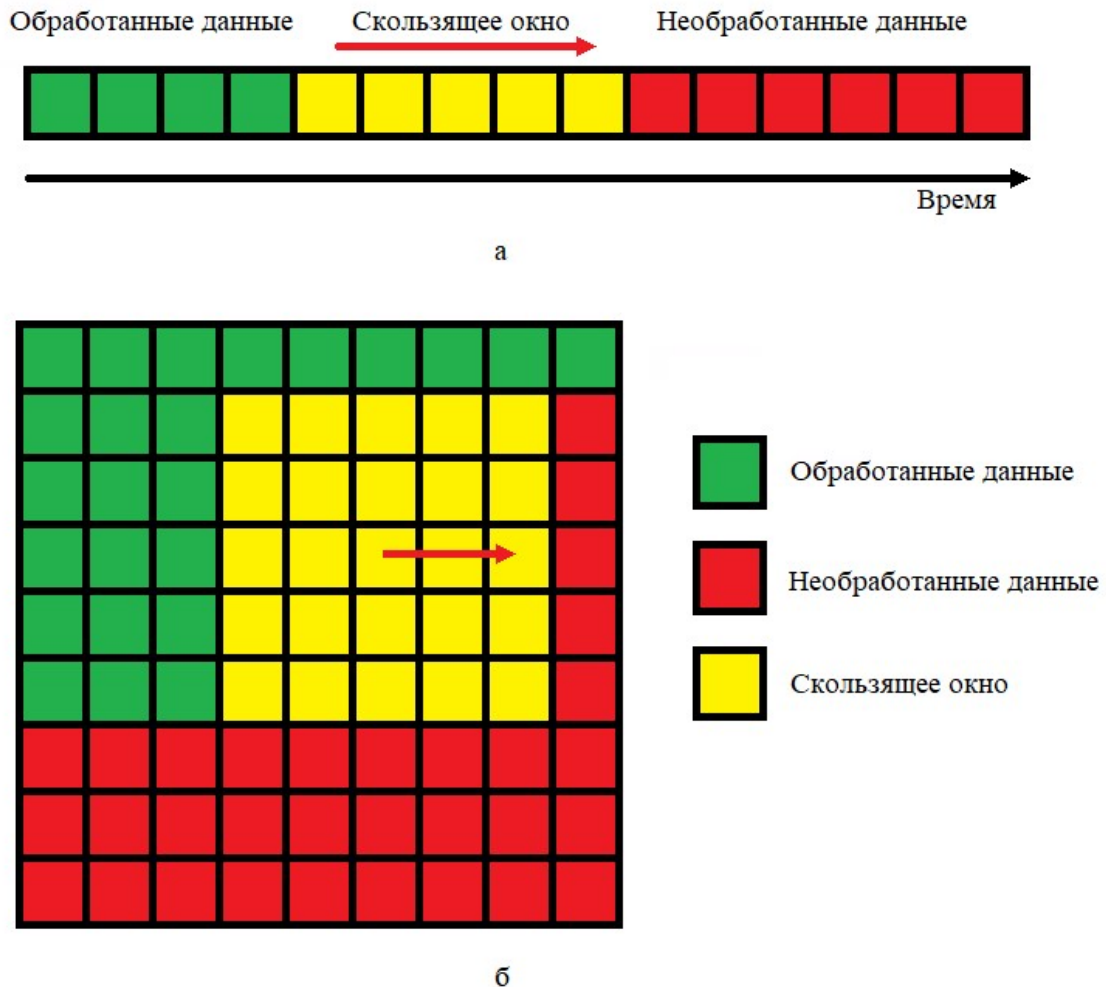


Рисунок 18 – Схема алгоритма, скользящего окна во временной области (а), в пространственной области (б)

Фильтры, основанные на порядковых статистиках, требуют ранжирования точек в окне. Например, медианный фильтр упорядочивает все точки в окне, и после этого выбирается центральное значение в качестве результата фильтрации [185], [280]:

$$F(x, y, t) = \text{med}_{(\tilde{x}, \tilde{y})=(-w_x, -w_y)}^{(w_x, w_y)} \{G(x - \tilde{x}, y - \tilde{y}, t)\}.$$

Ранговый фильтр определяется номером (рангом) выбираемого элемента из упорядоченной последовательности. Ранговый фильтр можно рассматривать как обобщение морфологического фильтра [185], [281].

Идея частотных фильтров основана на удалении шумов в определенном диапазоне частот. Частотные фильтры делят обычно на три категории: режекторный, полосовой и узкополосный. Режекторный подавляет сигнал на определенной частоте, узкополосный – в узкой полосе частот, а полосовой оставляет сигнал в заданной полосе частот [185]

Пример фильтрации данных АФ и ГВГ показан на рисунке 19. Здесь использовано изображение АФ и ГВГ кожи человека, полученное на глубине 100мкм. Видно, что ранговый и, в частности, медианный фильтры сохраняют больше всего деталей на изображении, при этом снижая шумовую составляющую. Фильтр Гаусса и арифметический фильтр часто значительно снижают качество изображения.

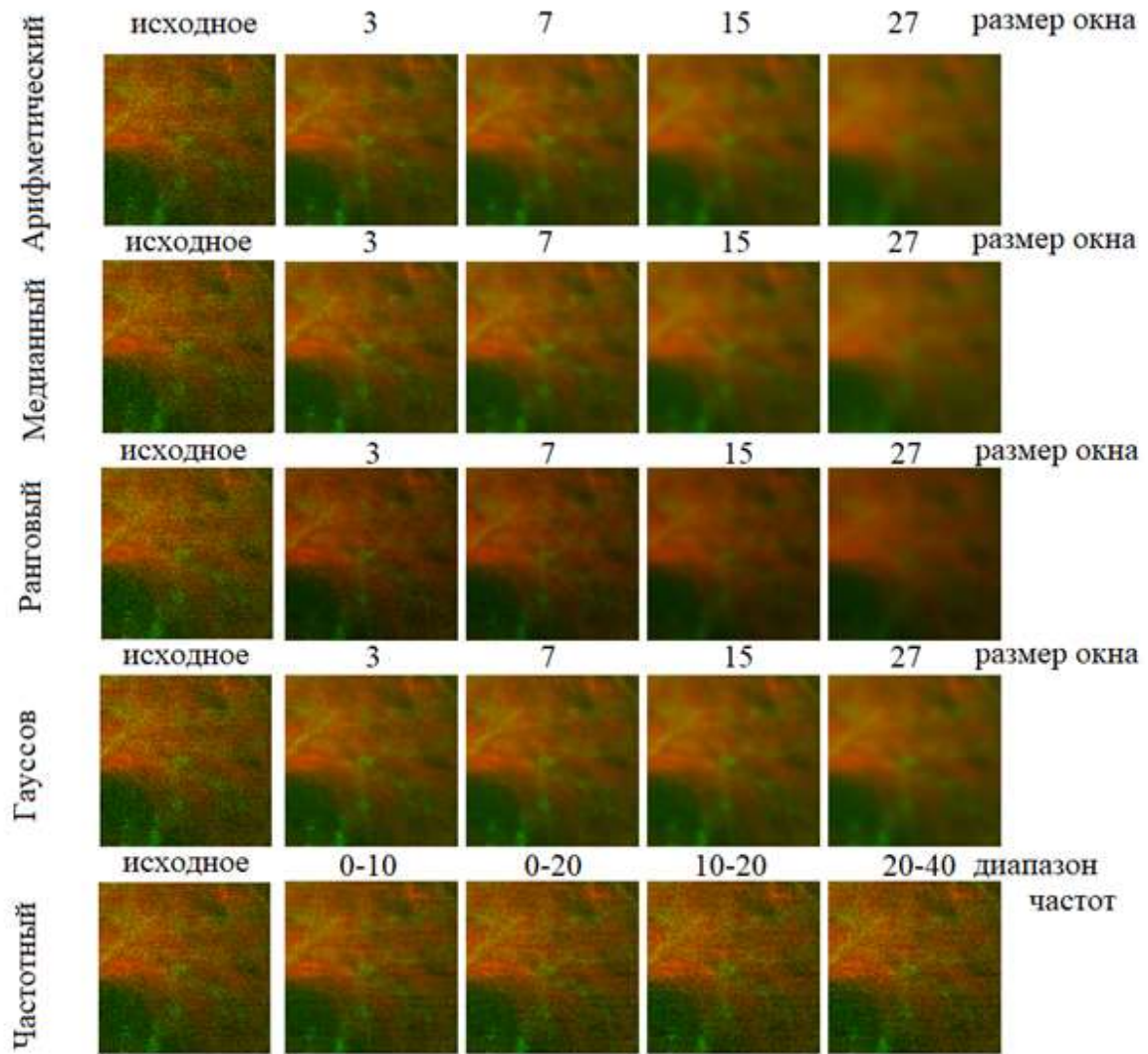


Рисунок 19 – Пример фильтрации исходного изображения арифметическим, медианным, ранговым, гауссовым, частотным фильтрами с параметрами: арифметический, медианный: размер окна 3,7,15,27, ранговый: размер окна 3,7,15,27 ранг 1,2,4,7, Гауссов: размер окна 3,7,15,27, сигма 0.8,1.4,2.6,4.4, частотный фильтр: частоты 0-10,0-20,10-20,20-40

Чтобы оценить качество работы фильтров, было просканировано 5 объектов небольшого размера, и построены эталонные изображения путем ручного удаления шумов (рисунок 20 иллюстрирует примеры эталонных изображений), затем отфильтрованное изображение сравнивалось с эталонным. В качестве метрики сравнения использовалось евклидово расстояние, которое вычислялось по всем пикселями изображения.



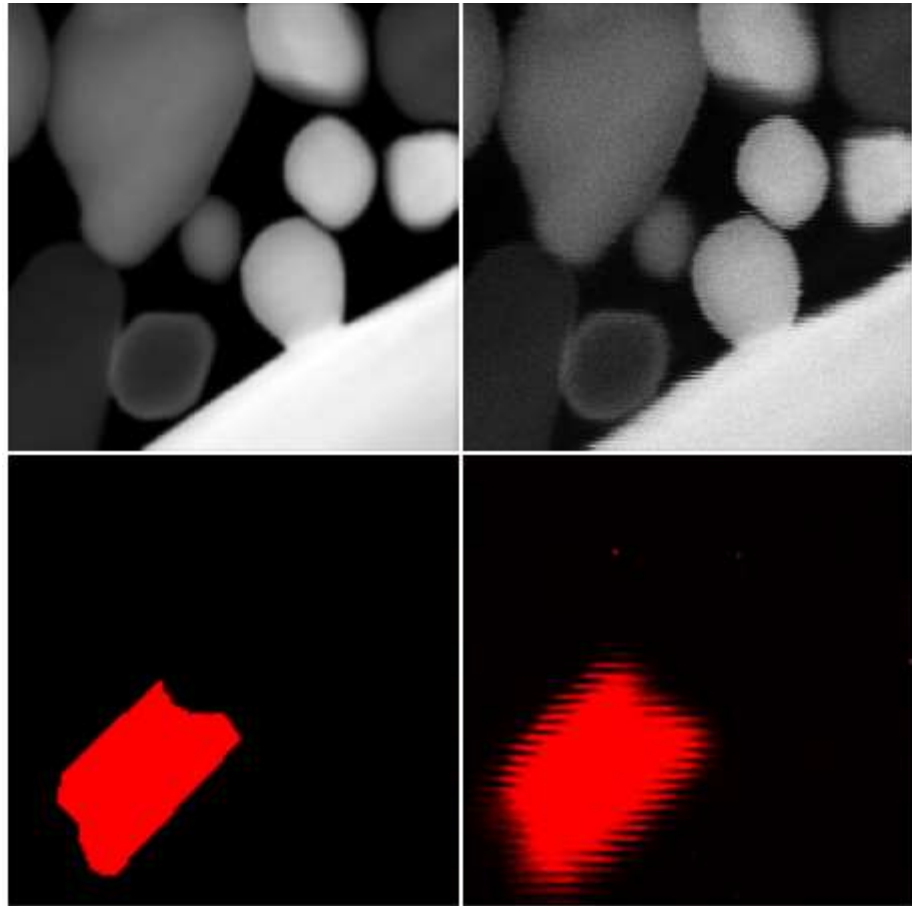


Рисунок 20 – Изображение реального ДФМ изображения и построенного по нему эталона (левый столбец – эталонные изображения, справа – реальные изображения)

Для каждого фильтра был осуществлен перебор основных параметров, и вычислена метрика качества работы фильтра (расстояние Евклида). Результаты применения перебора параметров для фильтров, которые дали высокое сходство, представлены на рисунке 21.

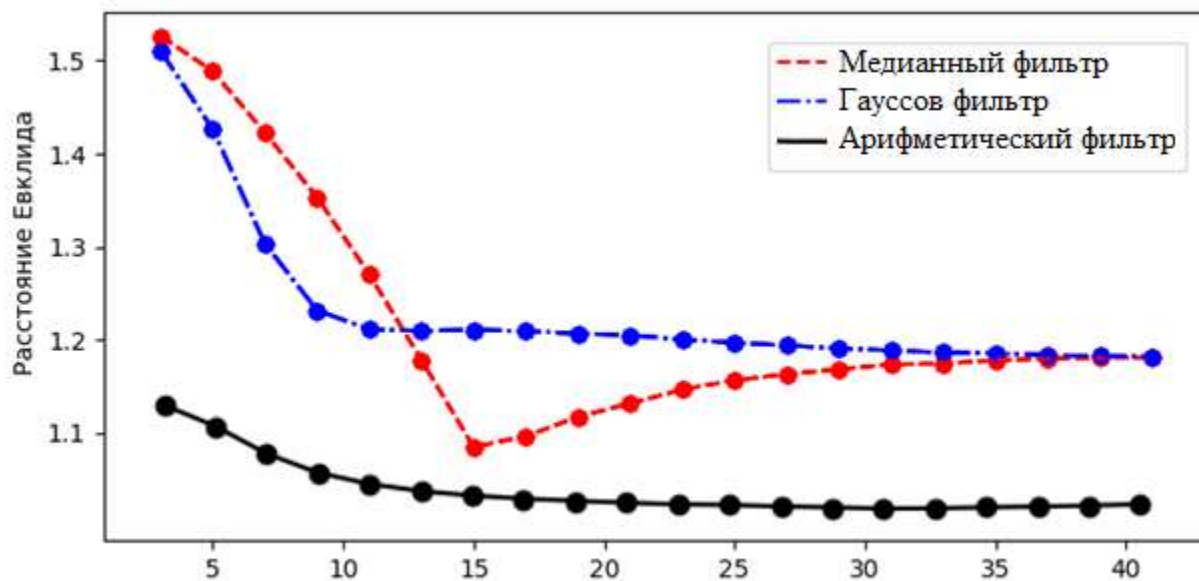


Рисунок 21 – Расстояние Евклида между фильтрованными изображениями и эталонами

Для того чтобы оценить действие фильтра на реальных данных, анализировались изображения ДФМ, полученные при сканировании кожи добровольцев разных возрастных групп. Всего в испытании приняло участие 10 человек ( $n=10$ ), возраст участников менялся от 22 до 68 лет. В группе молодых добровольцев было 6 человек, в группе возрастных – 4 человека. Средний возраст первой группы 27 лет с разбросом от 22 до 33, второй группы 58 лет от 53 до 68.

Измерения были проведены на ДФМ MPTflex. Для каждого испытуемого получено 10 изображений сигналов АФ и ГВГ на глубине 100мкм. Область сканирования 75x75 мкм записывалась на матрицу 512x512 пикселей. Всего проанализировано 100 изображений. Полученные изображения разбивались на блоки размером 32x32 пикселя. Далее оценивались значения отношения ГВГ к АФ и индекса SAAID (описание данного параметра приведено в следующем подразделе) для каждого блока до и после фильтрации (см. таблицу 8). Было рассмотрено два лучших фильтра выбранных ранее: гауссов фильтр с размером окна равным 3, сигмой равной 0.8 и медианный фильтр с размером окна равным 3. После фильтрации расстояние между первым и третьим квартилем уменьшилось, следовательно, уменьшился разброс в данных, что подтверждает улучшение качества данных.

Таблица 8 - Оценка отношения сигналов АФ и ГВГ и индекса SAAID [280]

	Отношение сигналов АФ и ГВГ/ индекс SAAID Исходные данные		Отношение сигналов АФ и ГВГ/ индекс SAAID Данные после гауссовой фильтрации		Отношение сигналов АФ и ГВГ/ индекс SAAID Данные после медианной фильтрации	
	Отношение коллагена к эластину /SAAID					
	Молодые волонтеры	Возрастные волонтеры	Молодые волонтеры	Возрастные волонтеры	Молодые волонтеры	Возрастные волонтеры
<b>Среднее значение</b>	1,62 / 0,33	2,01 / 0,45	1,63 / 0,33	2,00 / 0,44	1,63 / 0,33	1,99 / 0,43
<b>Первый квартиль</b>	1,32 / 0,21	1,83 / 0,38	1,32 / 0,21	1,84 / 0,38	1,34 / 0,23	1,83 / 0,38
<b>Третий квартиль</b>	2,10 / 0,43	2,42 / 0,53	2,01 / 0,40	2,38 / 0,52	2,05 / 0,40	2,36 / 0,50

Подбор фильтра для анализа FLIM изображений осуществлялся по результатам двух-экспоненциальной аппроксимации эталонного изображения (в качестве эталона использовалась кривая FLIM полученная при времени сканирования 45с) и изображения низкого качества (время сканирования 5с). Качество оценивалось как среднеквадратичное отклонение от кривой FLIM полученной для эталонного изображения. Результаты такой аппроксимации представлены на рисунке 22.

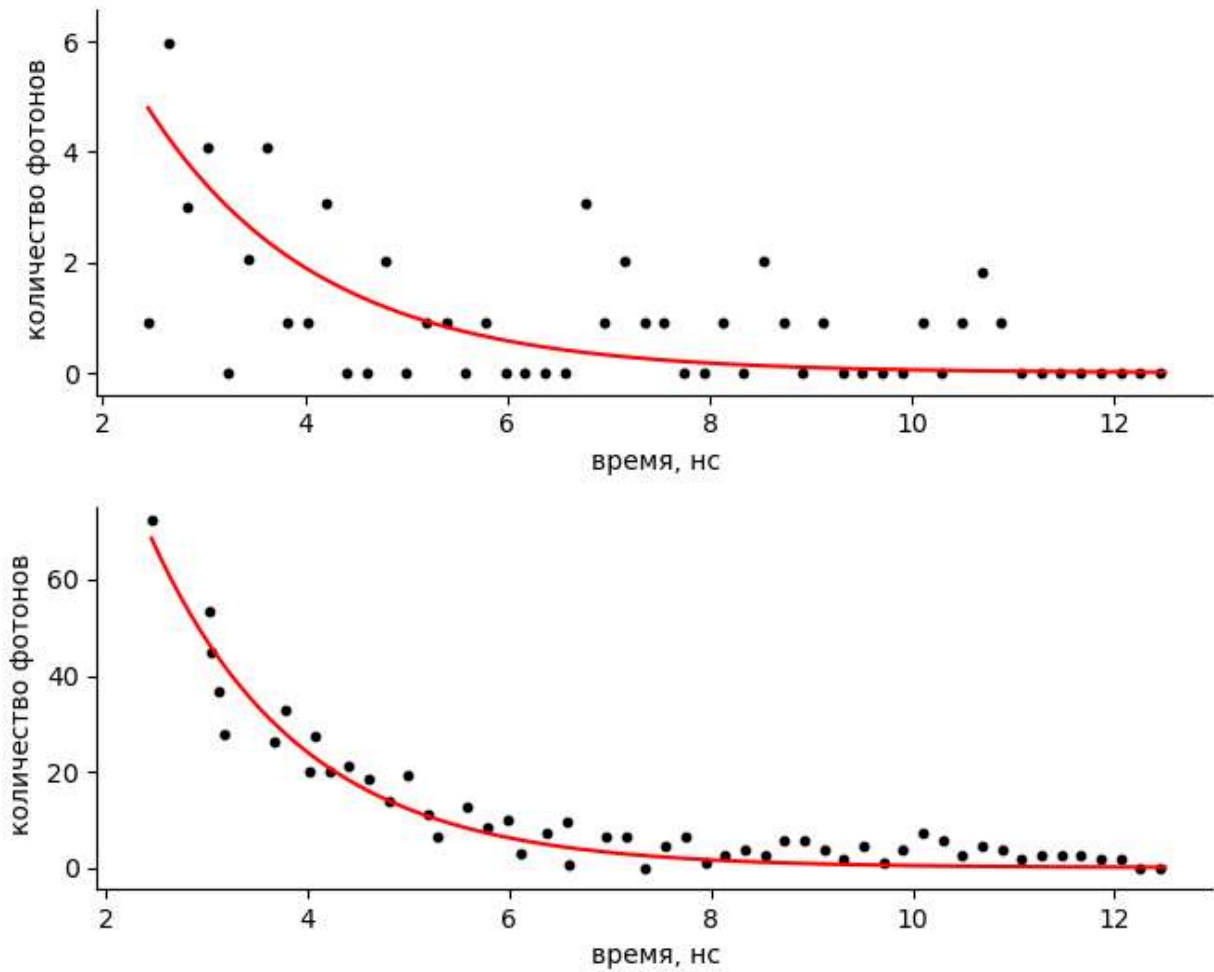


Рисунок 22 – Кривая FLIM. Верхний график соответствует времени сканирования 5 секунд, нижний рисунок – 45 секунд

Как сказано ранее для оценки качества подгонки обычно используют критерий Пирсона, параметром в данном критерии является значения  $\chi^2$ :

$$\chi^2 = \sum_t \frac{I(t) - I_m(t)}{I_m(t)},$$

где  $I(t)$  – фактическое значение,  $I_m(t)$  – модельное значение. Чем ближе полученное значение  $\chi^2$  к единице тем точнее подобраны параметры модели. В таблице 9 отражены максимальные значения метрики  $\chi^2$  для разных фильтров. Арифметически и гармонический являются частным случаем контргармонического фильтра и не приведены в таблице, медианный является частным случаем рангового фильтра и так же не представлен в таблице.

Таблица 9 – Максимальное значение  $\chi^2$  при переборе параметров фильтров

<b>Фильтры</b>	$\chi^2$	<b>Значение параметров</b>
<b>Геометрический</b>	0.94	Размер окна 5
<b>Контгармонический</b>	0.95	Размер окна 5, порядок 2
<b>Ранговый</b>	0.99	Размер окна 7, ранг 3
<b>Частотный</b>	0.96	Диапазон частоты (10-20)

Для анализа FLIM данных, измерения проводились на тех же группах добровольцев (6 молодых добровольцев и 4 возрастных) на устройстве MPTflex. Для каждого испытуемого получено 10 изображений на глубине 30мкм (данная глубина описывает зернистый слой кожи, который заполнен кератиноцитами). Всего проанализировано 100 изображений сигналов FLIM. Область сканирования 75x75мкм записывалась на матрицу 128x128 пикселей. При регистрации FLIM данных использовалась процедура накопления (в литературе часто используют термин биннинг от англ. binning) в блоке. При значении биннинга, равным 1, рассматривается область 3x3 пикселя, все полученные данные имели не менее 150 фотонов в одном пикселе [282]. Временные измерения при частоте лазера 80МГц позволяют фиксировать интервал от 0 до 12.5нс, при этом весь временной интервал разбит на 256 частей (по ~49пс).

На примере анализа кератиноцитов кожи человека, полученных с глубины 30мкм, показано уменьшение разброса для кривой FLIM, что выразилось в уменьшении различий между кривой и ее экспоненциальной аппроксимацией (см. рисунок 23), так и при проектировании этой кривой в фазорную плоскость (см. рисунок 23). Видно, что ранговый фильтр с размером окна 7 и рангом, равным 3, дает лучшую фильтрацию данных.

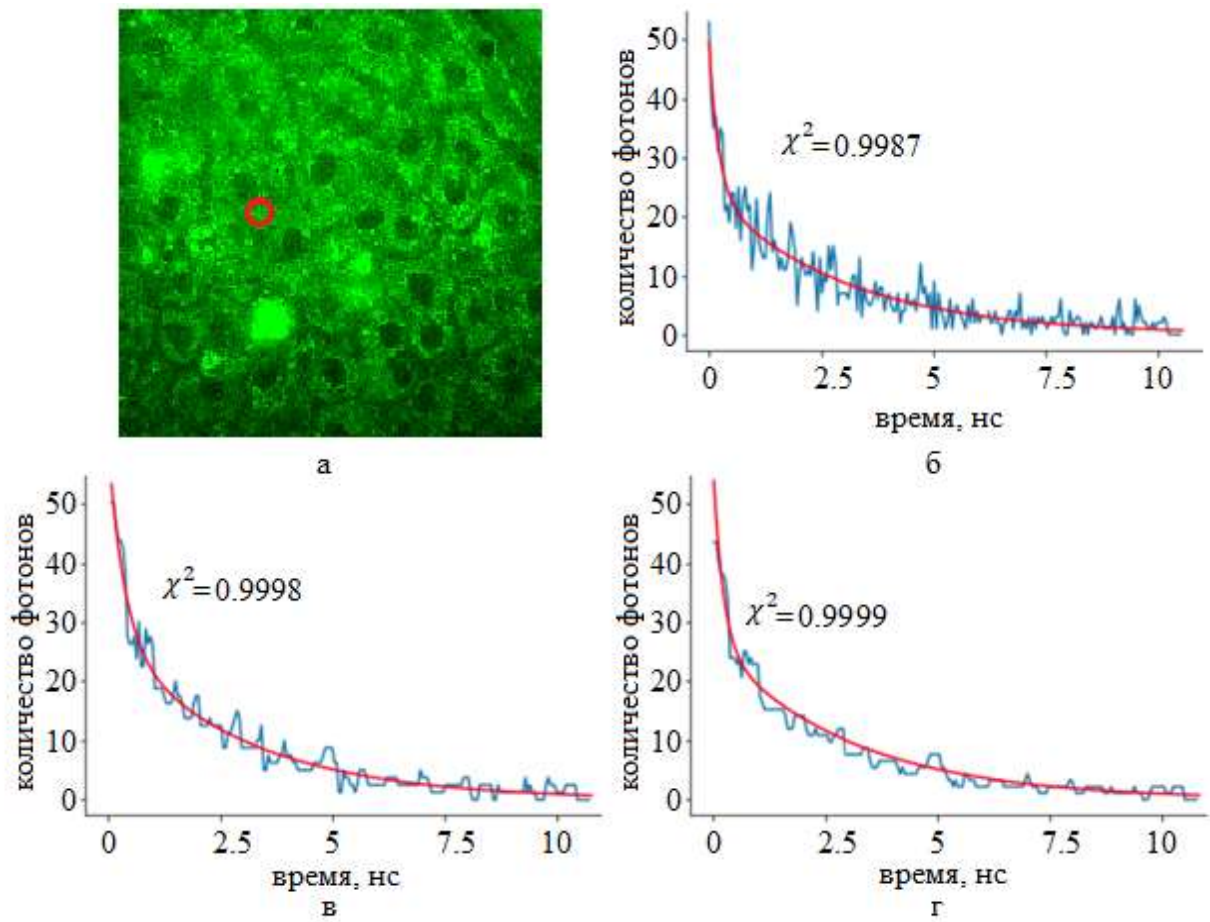


Рисунок 23 – Кривая FLIM: а) изображение кожи на глубине 30мкм, красным выделена область рассмотрения б) данные без фильтрации в) данные после применения рангового фильтра с окном размера равным 4 и рангом равным 2 г) данные после применения рангового фильтра с окном размера равным 7 и рангом 3

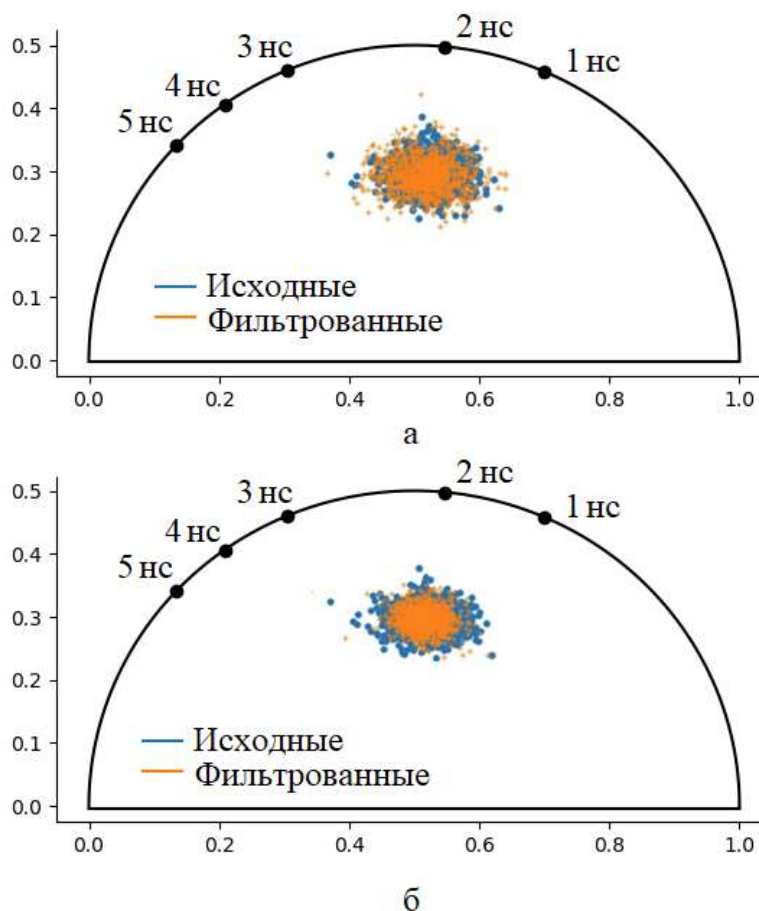


Рисунок 24 – Фазорная плоскость для FLIM данных до и после применения рангового фильтра с параметрами (а) – размер окна 4, ранг 2, (б) – размер окна 7, ранг 3

Таким образом, выбраны два фильтра: один для пространственной фильтрации изображений, второй для фильтрации FLIM данных во временной области. Для пространственной фильтрации выбран медианный фильтр с размером окна равным 3, для FLIM данных - ранговый фильтр с размером окна равным 7, рангом равным 3.

## Раздел 2.3 Выделение информативных признаков

### 2.3.1 Индекс старения как характеристика состояния кожи

Так как папиллярная дерма, в основном, состоит из фибрилл коллагена и эластина, отношение сигналов АФ, ГВГ позволяет оценивать ее состояние [227], [283]. В 2005 году Лин предложил [283] использовать нормализованный параметр - индекс старения дермы (Second harmonic generation to Autofluorescence Aging Index of Dermis, SAAID). SAAID [36], [170], [284], [285], определяемый соотношением:

$$SAAID = \frac{ГВГ - АФ}{ГВГ + АФ}$$

Индекс старения дермы SAAID является объективным параметром оценки статуса коллагена I в дерме *in vivo* [258], [286]–[288]. Была показана возможность применения данного индекса для анализа поврежденной кожи, кожи с патологиями (сравнивались здоровая дерма с границей опухоли / стромы, регионами и подтипами тканей [289], [290], аденокарциномой [291]), после воздействия лекарственных средств [292], после терапевтического воздействия лазером [293]. Данный индекс позволяет определять статус не только кожи, но и роговицы [294].

### 2.3.2 Адаптация метода гистограмм ориентированных градиентов для количественного описания пространственной структуры коллагена.

Коллагеновые волокна в дерме человека имеют высоко ориентированную структуру, которая имеет тенденцию к постепенному нарушению порядка с увеличением площади визуализации [295].

Метод гистограмм ориентированных градиентов строит вектор признаков на основании анализа пространственной ориентации поля локальных градиентов [229], [296], [297]. Впервые данный подход описан Навнитом Далалом и Биллом Триггсом в 2005 году [199]. Однако, применение данного метода для выделения информативных признаков группы изображений требует его адаптации. Для адаптации метода HOG проведена модификация вектора признаков, чтобы различать высоко ориентированные и неорганизованные группы «волокон».

Адаптация метода проводилась с использованием модельных данных, в которых степень дезорганизации задавалась вручную. В модели «волокон» коллагена использовалось их представление в виде набора отрезков линий с заданной длиной, шириной, ориентацией и цветом. Дезорганизация в основном определяется углом линейных сегментов, поэтому на первом этапе сгенерированы доминирующие ориентации со случайным наклоном линии в заданном диапазоне углов. Для каждого изображения параметры генерировались случайным образом (представлены в таблице 10).

Таблица 10 - Параметры генерации модельных данных

<i>Название параметра</i>	<i>Диапазон значений</i>
<i>угол наклона линии</i>	[0, 180)
<i>ширина линии</i>	[1,5]
<i>значение цвета</i>	[0.6, 0.99]
<i>координаты линии</i>	[0, ширина изображения]
<i>точка пересечения</i>	[0, (высота изображения) / 2]



Показатель дезорганизации рассчитывался с использованием тангенса угла наклона набора отрезков. Если его величина изменяется в небольшом диапазоне, т.е.  $(0, 0.1)$ , то такие линии считаются упорядоченными, а если изменения в диапазоне  $(0.1, 1)$ , то они считаются неупорядоченными. Чтобы получить плотное изображение, количество генерируемых линий на изображении составляло 2000. Каждое изображение (фрагмент) модели имело размер  $64 \times 64$  пикселей.

Для каждого такого фрагмента происходило вычисление признака по следующему алгоритму: каждый фрагмент разделялся на неперекрывающиеся ячейки  $n \times n$  пикселей ( $2n$  ячеек во фрагменте), затем для каждой ячейки рассчитывалась величина градиента яркости в диапазоне  $[0, 180]$  градусов, который затем проецировался на заданное количество направлений с весовыми коэффициентами, которые составили  $M$ -биновую гистограмму (значение  $M$  – выбиралось экспериментально из диапазона от 2 до 36 направлений). Затем величины бинов нормировались в диапазоне  $[0,1]$  для обеспечения инвариантности, и квантовались по уровню значений градиентов (рассматривался диапазон от 10 до 100 уровней). После этого из  $3 \times 3$  ячеек образовался блок размером  $3n \times 3n$  пикселей (см. рисунок 25). Наконец, 4 перекрывающихся блока покрывали участок размером от  $2n \times 2n$  пикселей. Перебор величины  $n$  выбран в диапазоне от 4 до 32 пикселей.

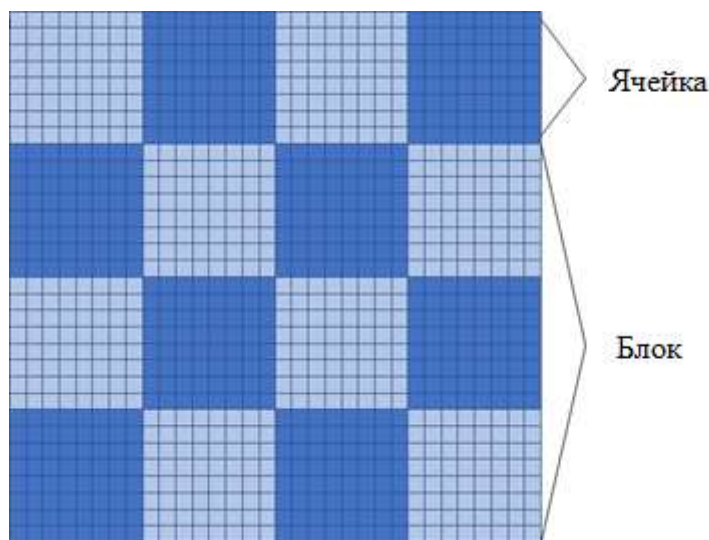


Рисунок 25 – Фрагмент изображения разделен на ячейки размером  $8 \times 8$  пикселей, которые объединены в блок размером  $24 \times 24$  пикселей (а)

Для полученных векторов признаков строилось распределение ориентаций в зависимости от степени дезорганизации. На рисунке 26 продемонстрировано данное распределение для структур с низкой и высокой степенью дезорганизации при фиксированном значении параметров

(количество ориентаций выбрано 9, размер блока 64x64 пикселей, количество уровней градиентов яркости 100).

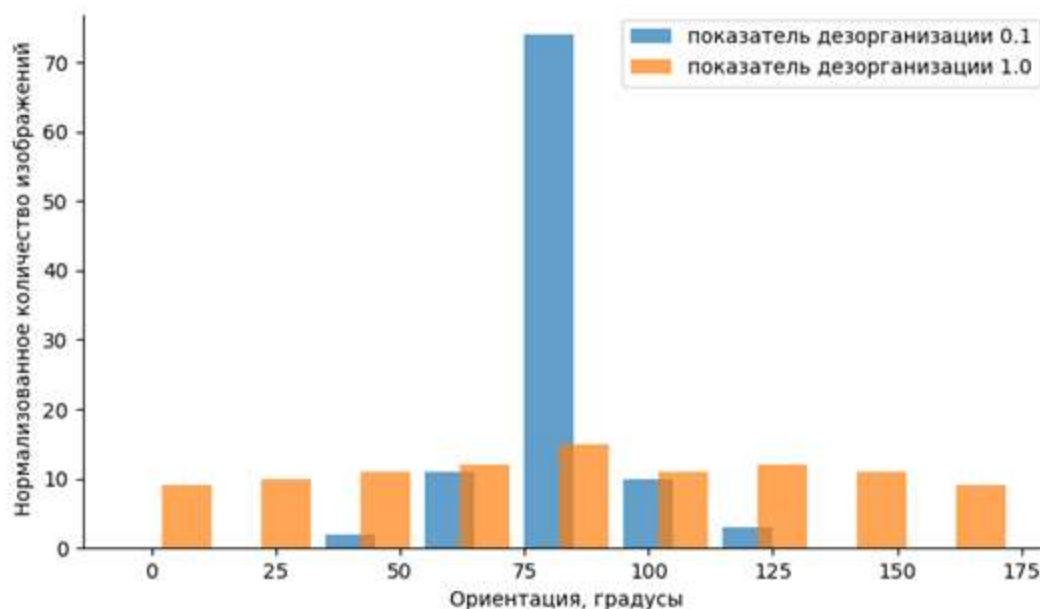


Рисунок 26 – Распределение изображений по определенным ориентациям

Полученные модельные данные разделялись на группы «положительных» и «отрицательных» образцов. Изображения, заполненные линиями с индексом дезорганизации в диапазоне  $(0; 0,1)$  считались положительными образцами, изображения с линиями с индексом дезорганизации в диапазоне  $(0,1; 1,0)$  считались отрицательными образцами (см. рисунок 27). Набор обучающих образов включал 28800 положительных и 28800 отрицательных случайно выбранных образцов, и такое же количество образцов было в тестовом наборе [298]. Случайное разделение модельных выборок на обучающие и тестовые наборы повторялось 50 раз. Классификация осуществлялась с использованием МОВ с РБФ ядром. Параметры классификатора подбирались перебором. Точность классификации оценивалась как количество верно классифицированных изображений по отношению к общему количеству изображений.

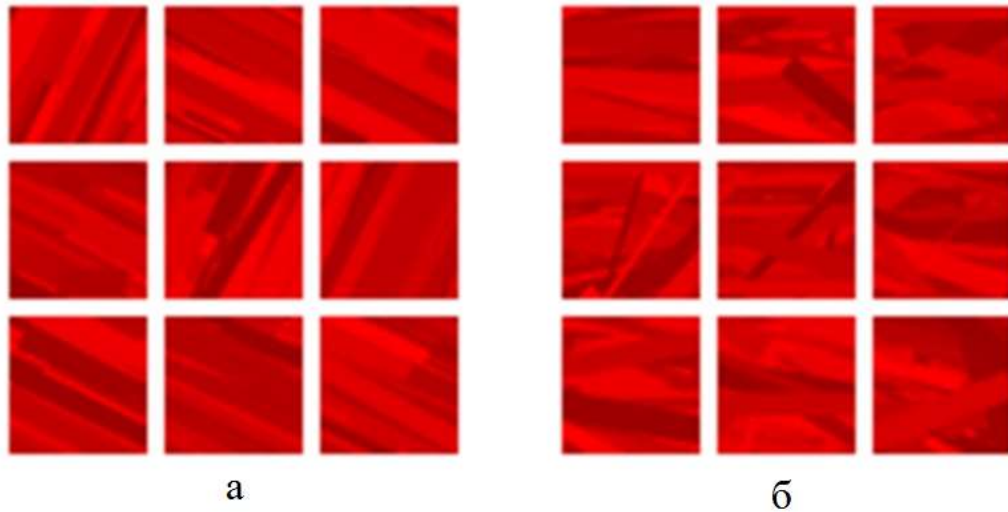


Рисунок 27 – Пример модельных данных: (а) - организованные волокна, положительные образцы, (б) - неорганизованные волокна, отрицательные образцы

В расчетах для МОВ классификатора перебор параметров был осуществлен в следующих пределах: параметр регуляризации менялся от 0.1 до 1 с шагом 0.1 и от 1 до 1000 с шагом 1, параметр гамма менялся от 0.1 до 10.0 с шагом 0.1.

Результаты анализа точности разделения положительных и отрицательных образцов в зависимости от уровней дискретизации ориентаций, амплитуд и размеру блоков показаны на рисунке 28. Небольшой разброс точности обнаружения положительных и отрицательных образцов при изменении уровней дискретизации связан с хорошим пространственным разделением групп образцов в пространстве признаков. В этом случае небольшое отклонение является значительным.

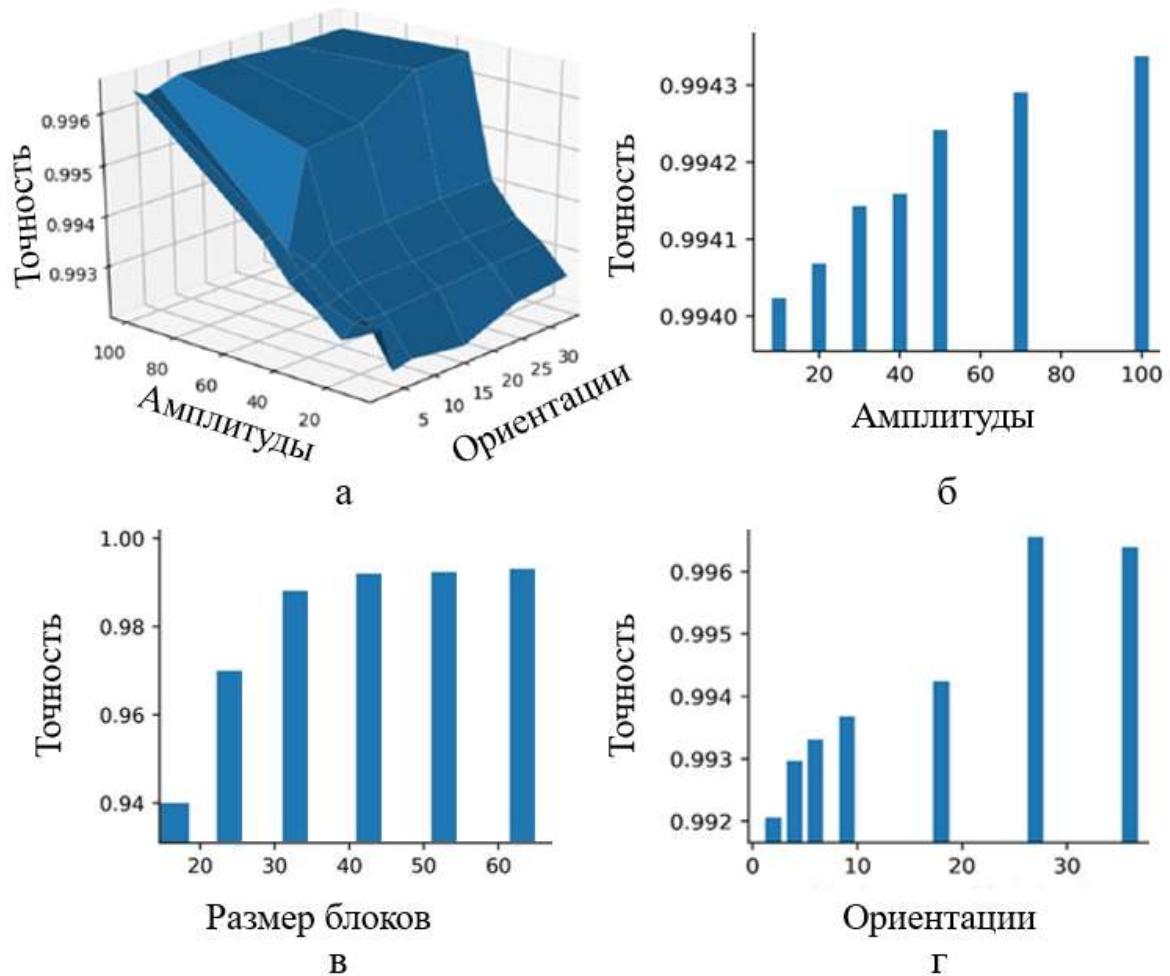


Рисунок 28 – Анализ оптимального уровня дискретизации ориентаций и амплитуд градиентов яркости вместе (а) и по отдельности (б, г) и оптимального размера блока (в)

Оптимальным оказалось использование РБФ ядра со значениями параметра регуляризации, равным 0,1, и параметра гамма, равным 1,0. По результатам моделирования, выбраны следующие параметры: количество ориентаций 9, количество уровней градиентов 50, размер блока 32x32 пикселя ( $n = 8$ ). Эти параметры использовались при дальнейшем анализе реальных ГВГ изображений папиллярной дермы человека и крысы.

## Раздел 2.4. Заключение к главе 2

В данной главе определены режимы (параметры лазера: мощность, длина волны, время экспозиции; размеры области и глубина сканирования) ДФМ микроскопа для сканирования папиллярной дермы. Определены основные параметры для предварительной обработки изображений. Показано, что для пространственной фильтрации лучше всего подходит

медианный фильтр с небольшим размером окна. Для фильтрации FLIM данных подходит ранговый фильтр с размером окна равным 7 и рангом равным 3. Описан метод НОГ и проведена его адаптация для определения степени дезорганизации коллагена. Показано, что для полностью дезорганизованной структуры плотность вероятности имеет вид равномерного распределения, для полностью ориентированной структуры – вид дельта-функции. По результатам написания данной главы доказано второе защищаемое положение. Для модельных данных выбраны оптимальный уровень дискретизации ориентаций, амплитуды градиентов яркости, оптимальные размеры блоков.

### ГЛАВА 3. Разработка предиктивной модели для диагностики лимфедематозной ткани с использованием ДФМ и машинного обучения

#### Раздел 3.1 Описание группы участников

В исследовании участвовали группа пациентов в возрасте от 23 до 68 лет (8 человек) с лимфедемой конечностей II-III стадии (как пример - фотография верхней конечности одного из пациентов представлена на рисунке 29) и группа добровольцев в возрасте от 19 до 65 лет (8 человек). Пациенты с лимфедемой набирались из числа амбулаторных пациентов НИИ микрохирургии, Томск, Россия. В целевой группе представлены 2 пациента с первичной лимфедемой нижних конечностей, 2 пациента с вторичной лимфедемой верхних конечностей (после подмышечной лимфаденэктомии, вызванной раком груди) и 4 пациента с вторичной лимфедемой нижних конечностей вызванные следующими причинами: обширной лимфаденэктомией: ожоги кожи (1 случай), после травм (1 случай) и после хирургического лечения рака шейки матки в сочетании с лучевой терапией (2 случая).

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом НИИ Микрохирургии 27.06.2017 No.01-31979/17, каждый доброволец подписал информационное согласие на проведение исследования. Бланк информационного согласия приведен в приложении 1 настоящей диссертации.



Рисунок 29 – Фото лимфедемы верхних конечностей II стадии, возникшей после хирургического лечения рака груди

### Раздел 3.2 Протокол исследования кожи человека *in vivo* методом ДФМ

Во второй главе представлена базовая часть протокола исследования кожи с использованием ДФМ (параметры мощности, времени экспозиции, глубины сканирования). Ниже представлено описание итогового протокола исследования кожи здоровых добровольцев и пациентов с лимфедемой.

Покровное стекло размещалось на металлическом держателе и фиксировалось двойным скотчем. С внутренней стороны держателя на покровное стекло наносилась капля иммерсионной смеси Zeiss Immersol 518N. Этот шаг необходим для устранения слоя воздуха между покровным стеклом и линзой объектива, который отличается по своим физическим свойствам от стекла и рассеивает, преломляет и отражает свет. Металлический держатель покровного стекла приклеивался к коже на двухсторонний скотч, чтобы не было смещения кожи во время измерений.

На ровную поверхность стола/стула укладывалось полотенце, на которое сверху размещалась пленка. Конечность располагалась на пленке, подвижный рукав устройства МРТflex размещался на коже предварительно увлажненной дистиллированной водой для лучшего контакта между покровным стеклом и кожей (см. рисунок 30).



Рисунок 30 – Фотография процесса измерения предплечья

Измерительная головка, представляющая собой объектив с металлическим держателем для покровного стекла и расположенная на подвижном рукаве, устанавливалась на кожу и накрывалась сверху тканью для уменьшения засветки, перед измерениями свет в комнате выключался. На первом шаге находилось первое появление рогового слоя, затем регистрировались изображения ГВГ и АФ на глубине 100-120 мкм (что соответствует уровню



папиллярной дермы) с шагом 10мкм, каждое полученное изображение записывалось на матрице 512×512 пикселей, размер области сканирования 75×75мкм.

Измерения проводились на длине волны 760нм, при этом мощность выбиралась в зависимости от глубины сканирования от 5мВт (для рогового слоя) до 50мВт (в папиллярной дерме), время сканирования одного кадра выбиралась 15секунд. Примеры полученных изображений на разной глубине приведены на рисунке 31.

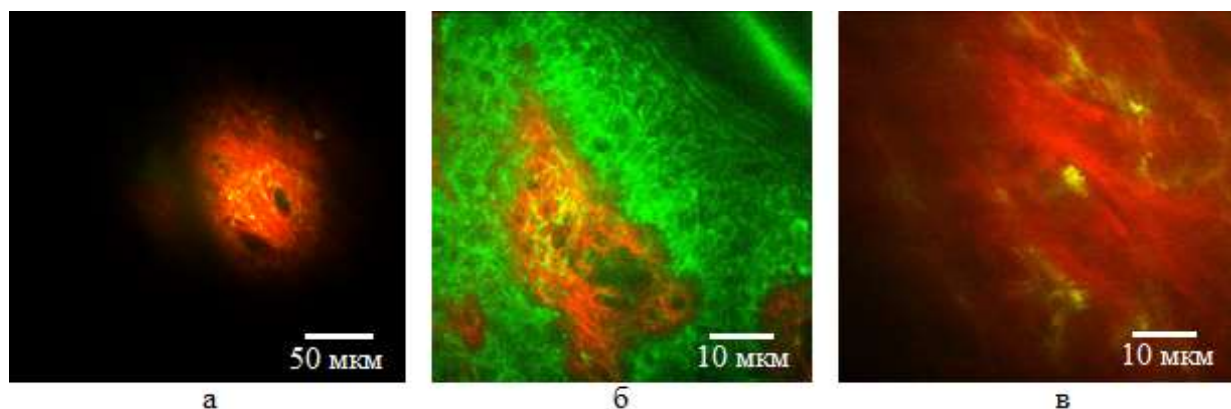


Рисунок 31 – ДФМ изображение (АФ отображено зеленым, ГВГ – красным) предплечья с разным размером области сканирования и глубиной (а) глубина 100мкм, (б) глубина 80мкм, (в) глубина 120мкм

Рисунок 32 иллюстрирует примеры ДФМ изображений рогового слоя (глубина сканирования 3мкм) и слоя папиллярной дермы (глубина сканирования 100мкм), временем сканирования 15секунд, мощностью 5 и 50мВт соответственно.

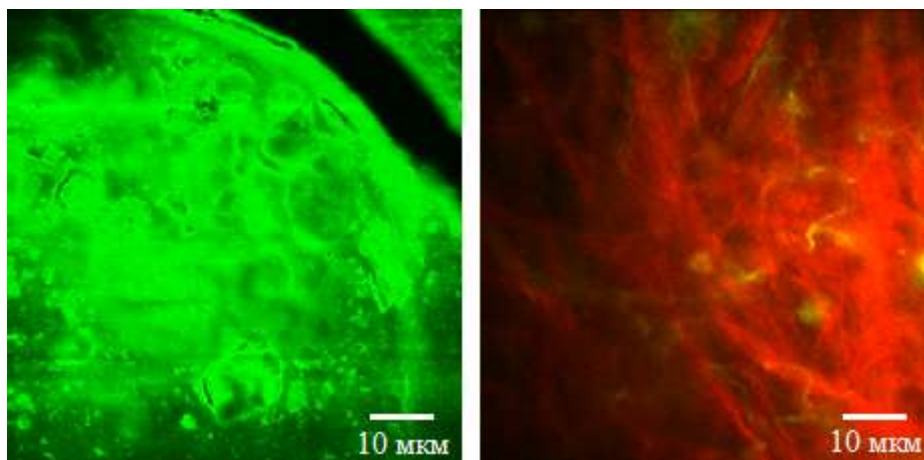


Рисунок 32 – Изображение рогового слоя кожи (слева) и слоя папиллярной дермы, АФ сигнал изображен зеленым цветом, ГВГ – красным



Были зарегистрированы изображения 5 областей для каждого участника, каждое измерение представляло сохранение стека из трех изображений на глубинах 100мкм, 110мкм и 120мкм. Всего получено 120 изображений для здоровой кожи и 120 изображений для лимфедематозной кожи. Каждое исходное изображение разделялось на неперекрывающиеся фрагменты размером 32x32 пикселя. «Пустые» области (см. рисунок 33) были удалены с использованием порогового фильтра (порог яркости составлял 80 по шкале серого от 0 до 255).

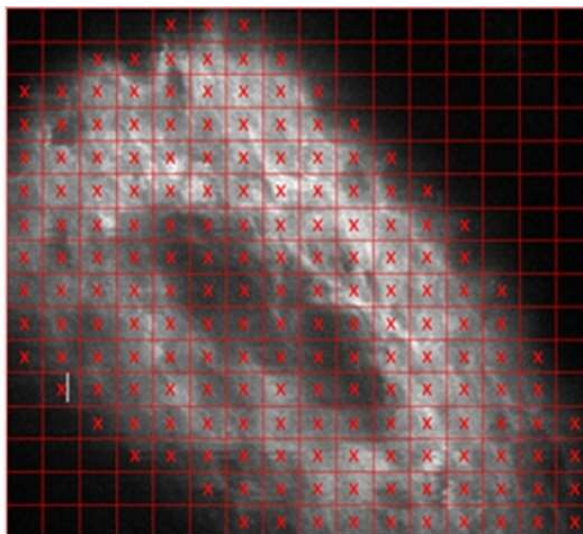


Рисунок 33 – Изображение сигнала ГВГ кожи добровольца, разделенный на фрагменты размером  $32 \times 32$  пикселей

В результате подготовлено 3578 изображений, из них: 1641 – фрагментов лимфедематозной ткани, 1937 – здоровой ткани.

### Раздел 3.3 Применение SAAID для оценки состояния дермы

Примеры ГВГ—изображений папиллярного слоя кожи предплечья для здоровых добровольцев и людей с лимфедемой показаны на рисунке 34.

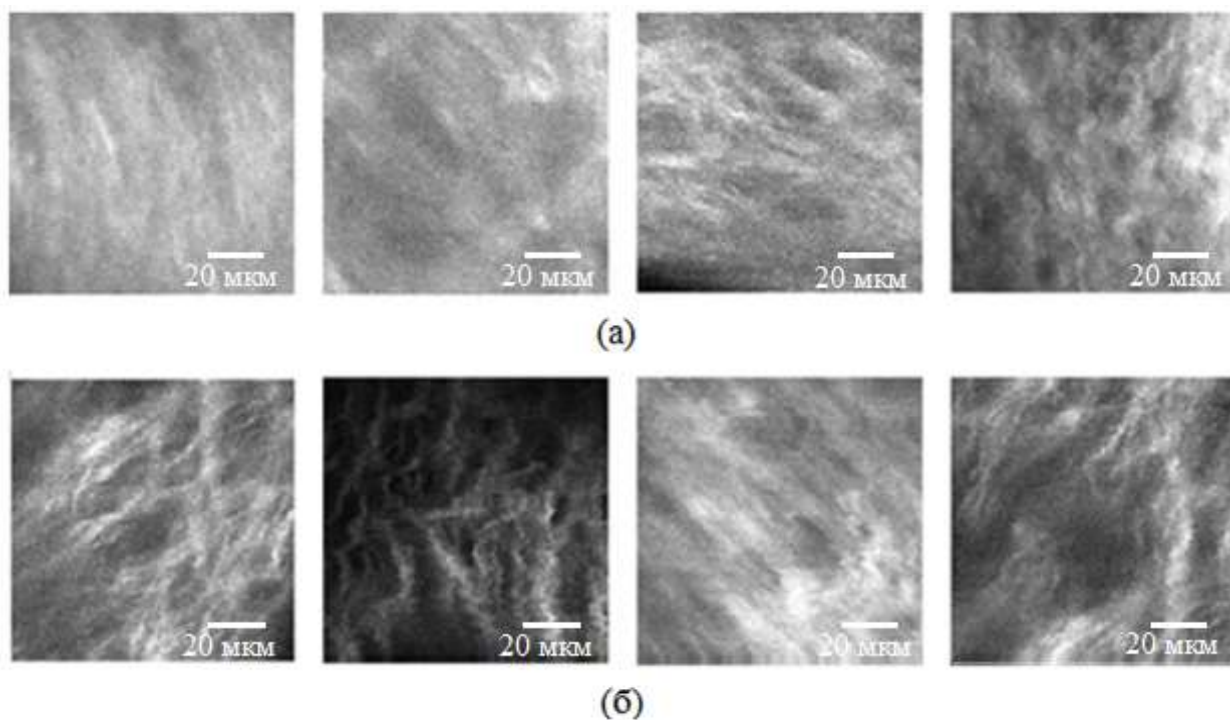


Рисунок 34 – ГВГ изображение здоровой (а) и лимфедематозной (б) кожи на глубине 100мкм

Вклад в АФ дает не только эластин, но и другие флуорофоры (капилляры, лимфатические сосуды, нервы и т.д.) [289], [290]. При этом в папиллярной дерме клетки могут быть легко отфильтрованы по форме, капилляры имеют невысокую интенсивность, а как сказано в главе 1, основной состав папиллярной дермы — это коллаген и эластин. Кроме того, во множестве работ сигнал АФ в папиллярной дерме рассматривается только как характеристика эластина [150], [299], [300]. Таким образом для полученных данных рассматривались только фрагменты АФ, на которых нет клеток.

Оценка уровня сигнала ГВГ и сигнала АФ (в относительных единицах) в коже показана в таблице 11. Предварительно ко всем изображениям применялся медианный фильтр с размером окна равным 3. Далее вычислялось среднее значение по всем ГВГ и АФ изображениям кожи, полученным для каждого добровольца. Критерий Манна-Уитни с уровнем значимости менее 0.05% применяли для оценки различий между группами.

Таблица 11 - Оценка содержания коллагена и эластина в тканях, Me [Q25; Q75].

	Здоровые добровольцы	Пациенты с лимфедемой II стадии
<b>Сигнал ГВГ, отн. ед.</b>	100,48 [87,76; 111,49]	113,89 [100,39; 127,21] *
<b>Сигнал АФ, отн. ед.</b>	46,35 [39,84; 64,96]	42,15 [33,73; 48,90] *
<b>Отношение ГВГ к АФ</b>	1,96 [1,52; 2,55]	2,42 [2,25; 3,20] *
<b>SAAID</b>	0,35 [0,25; 0,47]	0,45 [0,36; 0,52] *

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с группой добровольцев (U-критерий Манна-Уитни)

Приведенные результаты демонстрируют значительное увеличение средних значений отношения ГВГ/АФ для лимфедематозной ткани по сравнению к нормальной. Ранее независимо исследователями установлено, что на глубине 100 мкм значения SAAID (описан в разделе 2.3.1) для здоровой кожи человека в центральной области внешней стороны правого плеча и предплечья имеет значения в диапазоне от 0,2 до 0,4 [285], [301]. В нашем случае для здоровой ткани значения SAAID так же лежат в данном диапазоне, однако для лимфедематозной ткани эти значения находятся в диапазоне от 0,36 до 0,52. Эти различия статистически значимы по критерию Манна-Уитни с уровнем значимости  $< 0.05$ . Таким образом SAAID может быть использован для выявления лимфедематозной кожи.

#### **Раздел 3.4 Анализ структуры коллагена в лимфедематозной коже с использованием градиентных методов**

Были рассмотрены следующие градиентные методы: оператор Собеля, детектор границ Канны, оператор лапласиан гауссианов, математическая морфология [302]. На Рисунок 35 показаны примеры применения градиентных методов к изображениям ГВГ, полученным для здоровой и лимфедематозной кожи.

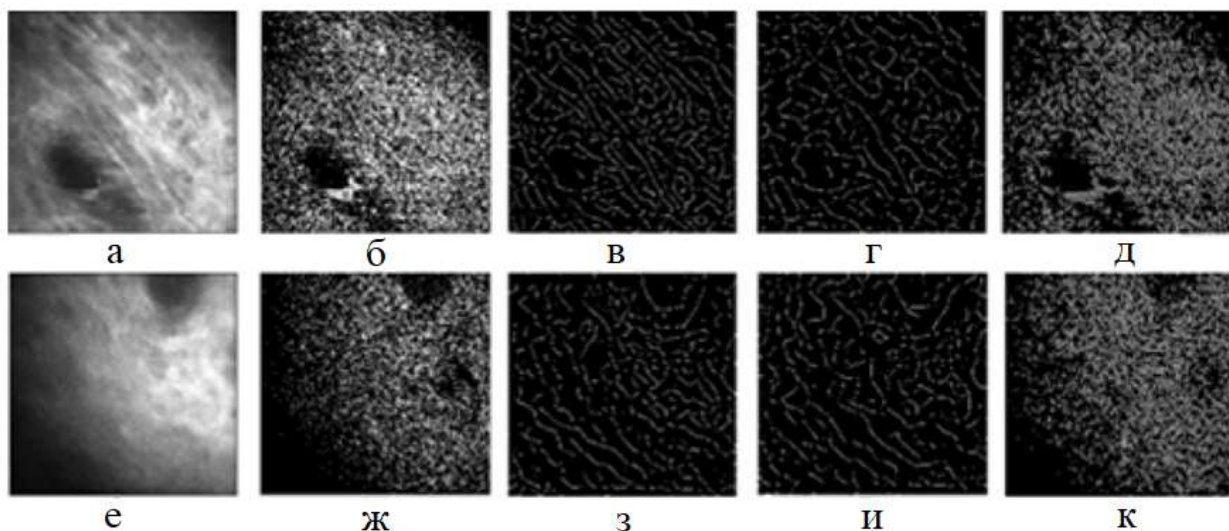


Рисунок 35 – Примеры обработки градиентными методами ГВГ изображений, лимфедематозной ткани (верхний ряд) и здоровой ткани (нижний ряд): исходные изображения (а, е), результаты обработки исходного изображения: (б, ж) - оператором Собеля, (в, з) - детектором границ Канни, (г, и) - методом морфологии, (д, к) – оператором лапласиан гауссианов

Приведенные результаты показывают, что операторы Собеля и лапласиан гауссианов более чувствительны к шуму (Рисунок 35 б, д, ж, к), что усложняет анализ. Детектор границ Канни (Рисунок 35 г, и) и метод морфологии (Рисунок 35 в, з) дают аналогичные результаты и с меньшей толщиной границ (по сравнению с операторами Собеля и лапласиана гауссианов).

Общее количество точек градиента (ОКТГ) можно использовать для сравнения плотности найденных границ на изображении. Данная функция вычисляется как сумма всех границ во фрагменте. В данной диссертации апробирован подход для классификации границ на основе оценки ОКТГ изображения с использованием градиентных методов. ОКТГ рассчитывался как отношение количества ярких пикселей к общему количеству пикселей во фрагменте. Гистограмма значения ОКТГ строилась по всем фрагментам из соответствующих групп (Рисунок 36).

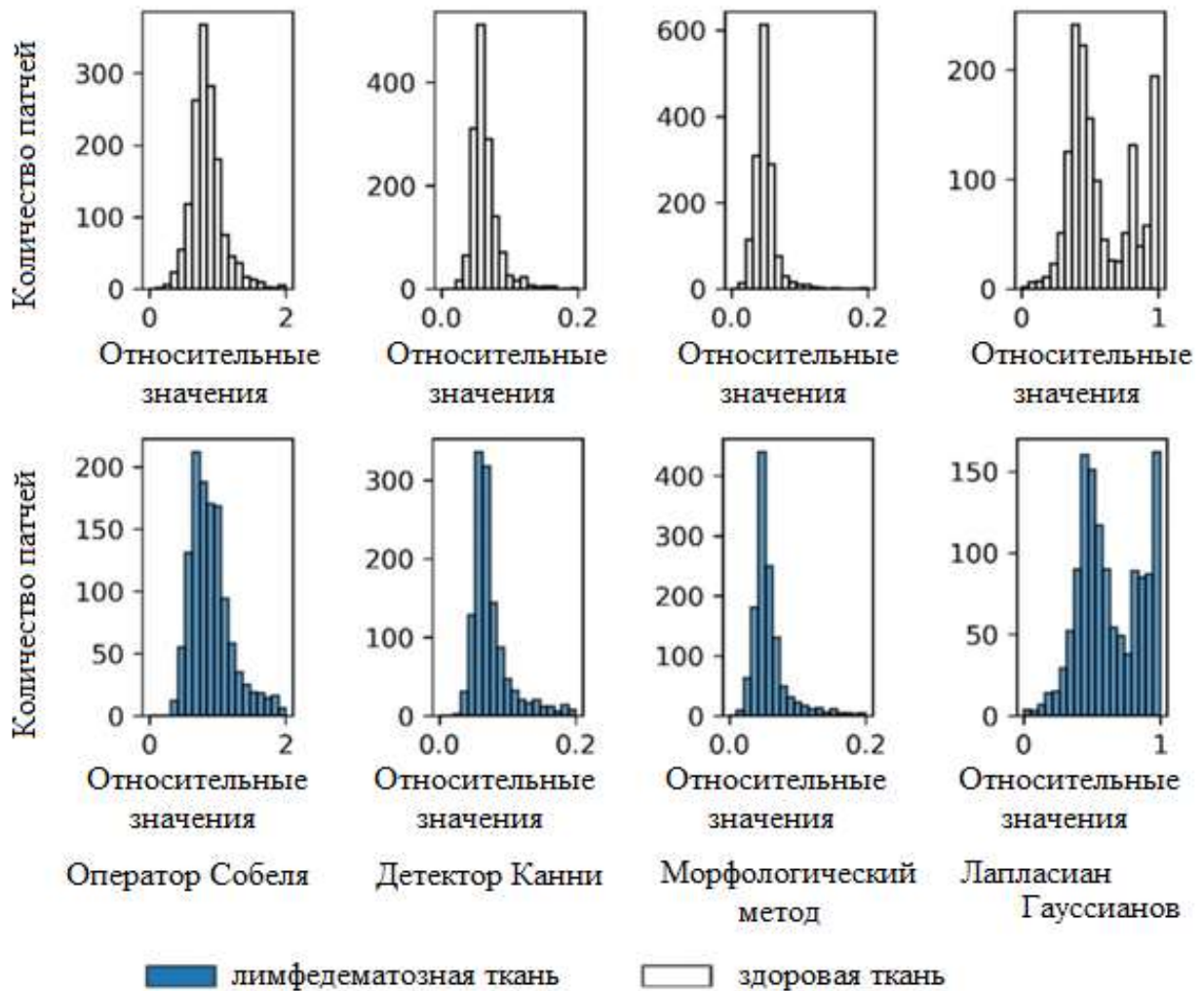


Рисунок 36 – Распределение ОКТГ для здоровой и лимфедематозной ткани, рассчитанная после применения: оператора Собеля, детектора границ Канни, метода морфологии и лапласиан гауссианов

Независимо от применяемого градиентного метода, гистограмма ОКТГ для лимфедематозной ткани имеет большую ширину, чем для здоровой ткани. Также имеет место увеличение максимального значения гистограмм для лимфедематозной ткани по сравнению со здоровой тканью.

Для проверки возможности диагностики лимфедематозной ткани на основе применения градиентных методов и ОКТГ, разработан классификатор на основе МОВ. Гистограмма каждого изображения ОКТГ использовалась как вектор признаков, используемый для классификации. После фильтрации фрагментов с малым сигналом получено от 102 до 320 фрагментов. Изображения разделялись на две группы: отрицательный набор («здоровые») – гистограммы, полученные для здоровой кожи, положительный набор («лимфедема») – для лимфедематозной кожи. Разбиение выборки при ее малых размерах обычно реализуется по принципу Парето -

правилу 80/20, (т.е. 80% изображений использовалось в обучающей выборке, а 20% - тестовой) [303].

Проведено 50 испытаний классификации МОВ, и оценены лучшие параметры. Перебор параметров и ядер реализован так же, как и в главе 2. Валидация выполнена с использованием процедуры скользящего контроля  $N - 1$  (процедура Leave-one-out описана ранее в разделе 1.7), с  $N = 5$ .

Точность классификации рассчитана по формуле:

$$\text{Точность} = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN)$$

где  $TP$  - количество истинно положительных результатов классификации, а  $FN$  - количество ложно отрицательных результатов классификации,  $TN$  - количество верно найденных отрицательных результатов,  $FP$  - количество ложно найденных положительных результатов. Для всей серии скользящего контроля вычислялось среднее значение и стандартное отклонение полученной точности, результаты приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Точность классификации ОКТГ характеристики изображений для здоровой и лимфедематозной тканей.

Алгоритм	Точность классификации							
	Линейное		РБФ (gamma=1, C=0.1)		РБФ (gamma=1, C=0.5)		РБФ (gamma=1, C=1.0)	
	$\langle A \rangle$	$\sigma$	$\langle A \rangle$	$\sigma$	$\langle A \rangle$	$\sigma$	$\langle A \rangle$	$\sigma$
<b>Оператор Собеля</b>	0.511	0.077	0.590	0.077	0.553	0.101	0.541	<b>0.082</b>
<b>Детектор границ Канни</b>	0.523	0.083	0.571	0.083	0.565	0.092	0.584	<b>0.062</b>
<b>Морфологический метод</b>	0.531	0.059	0.620	0.059	0.591	0.074	0.574	<b>0.073</b>
<b>Лапласиан гауссианов</b>	<b>0.563</b>	<b>0.049</b>	<b>0.571</b>	<b>0.049</b>	<b>0.543</b>	<b>0.079</b>	<b>0.555</b>	<b>0.061</b>

где  $\langle A \rangle$  - среднее значение,  $\sigma$  – стандартное отклонение

Из результатов видно, что вне зависимости от выбранного ядра, точность классификации низка. Очевидно, что значение ОКТГ слишком грубо описывает структуру изображений ГВГ. Чтобы повысить точность классификации, необходимо учитывать дополнительные параметры изображения.



### Раздел 3.5 Применение метода опорных векторов для построения прогностической модели с вектором признаков на базе адаптированного метода НОГ

В данном разделе представлены результаты использования адаптированного метода НОГ для формирования вектора признаков. Разбиение выборки и параметры классификатора МОВ были аналогичными разделу 3.4 данной диссертации. Качество классификации оценивалось с использованием следующих параметров [304]:

$$\text{Чувствительность} = TP / (TP + FN);$$

$$\text{Специфичность} = TN / (FP + FN).$$

Лучшие результаты показал МОВ с РБФ ядром, параметром регуляризации, равным 1.0, параметром гамма, равным 0.1. При этом чувствительность была равна  $0.79 \pm 0.11$  и специфичность -  $0.77 \pm 0.10$ .

Очевидно, что зарегистрированные ГВГ изображения лимфедематозной кожи могут содержать как здоровые, так и лимфедематозные фрагменты. Для учета этого обстоятельства, использовалась комбинация МОВ и метода «голосования большинством». Процедура «голосования большинством» заключалась в следующем: если количество фрагментов изображения, классифицированных как «лимфедематозная ткань», превышало то же самое для «здоровой ткани», это изображение считалось соответствующим лимфедематозной ткани. Идея подхода проиллюстрирована на рисунке 37.

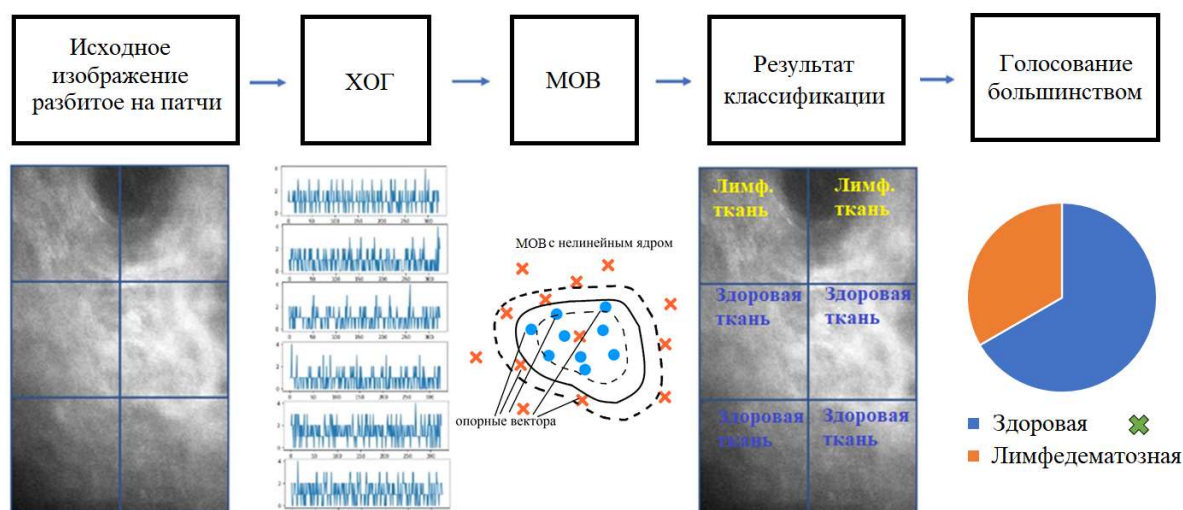


Рисунок 37 – Схема классификации ГВГ изображений

В итоге проведена групповая классификация изображений ГВГ с использованием метода «голосования большинством». Такой подход позволил достичь точности  $0.96 \pm 0.11$ , при этом чувствительность равнялась  $99\% \pm 0.1$ , а специфичность равнялась  $90\% \pm 0.2$ .

### **Раздел 3.6 Разработка метода классификации лимфедемы на основании FLIM данных**

Как отмечалось выше, основной вклад в АФ дают эластиновые волокна, следовательно, можно использовать усреднение по широкой области пространства при анализе кривой FLIM. Соответственно, значение параметра биннинга (см. главу 2) было выбрано равным 3, т.е. в анализе участвовала область  $7 \times 7$  пикселей.

Проанализированы распределения времени жизни флуоресценции в зависимости от общего количества пикселей на изображении. Области с большим количеством клеток (круглых ярких флуоресцирующих объектов) были исключены из анализа. Пространственное распределение, представленное на рисунке 38, демонстрирует значения флуоресценции для здоровой (а) и лимфедематозной (в) тканей, а также значения среднего времени флуоресценции  $t_m$  для здоровой (б) и лимфедематозной (г) тканей соответственно. Видно, что наиболее часто встречаются значения  $t_m$  порядка 1200-1500пс. Как показано ранее, время жизни флуоресценция эластина имеет центральный пик в районе 1300пс [170], что близко к полученному результату.



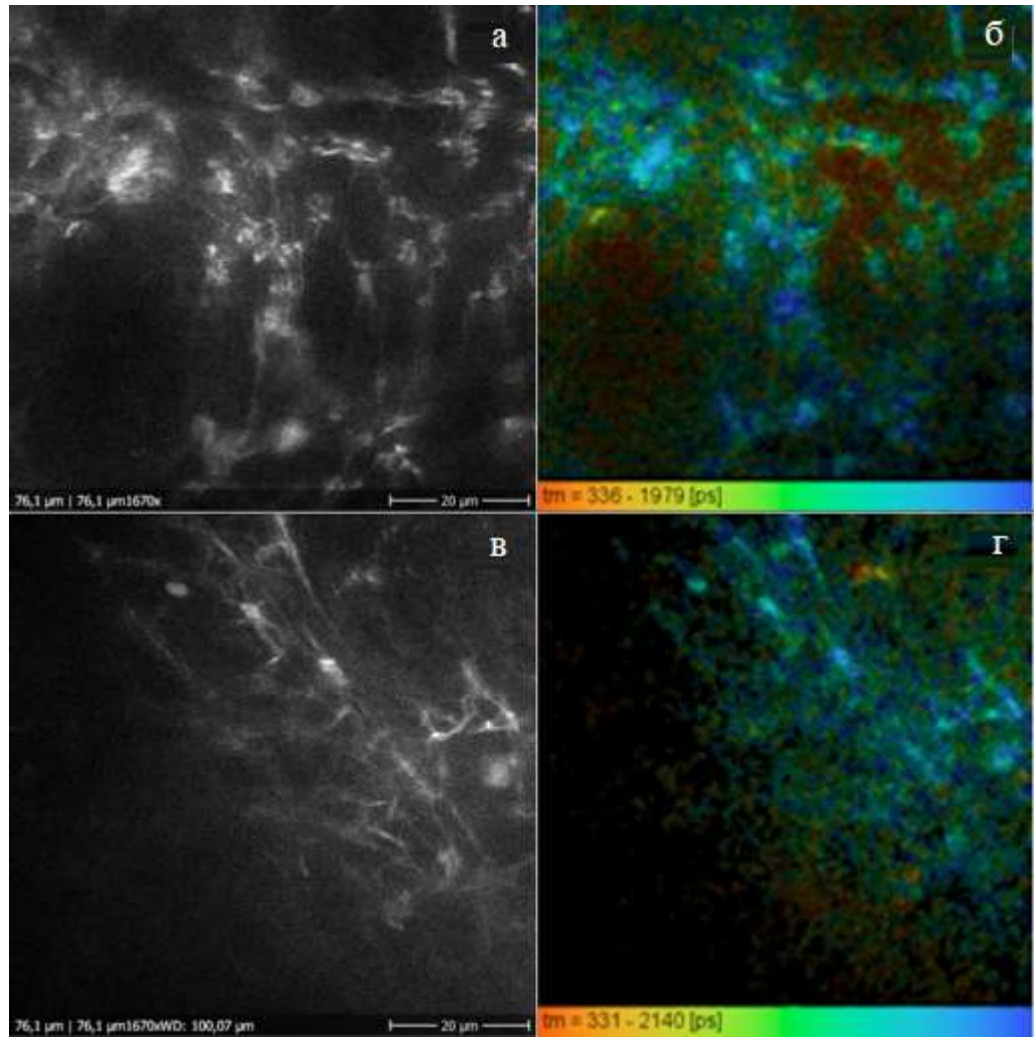


Рисунок 38 – Пример анализа FLIM для лимфедематозной (верхний ряд) и здоровой (нижний ряд) ткани: изображения АФ (а, в),  $t_m$  изображения (б, г)

Полученные изображения разбивались на фрагменты. Фрагменты, содержащие клетки и имеющие низкую яркость, исключались из рассмотрения. Далее применялась двух-экспоненциальная аппроксимация, оценивались распределения параметров  $t_1, t_2, t_m, a_1/a_2$  (см. рисунок 39). Приведенные графики показывают небольшие отличия в данных, которые не являются значимыми [305].

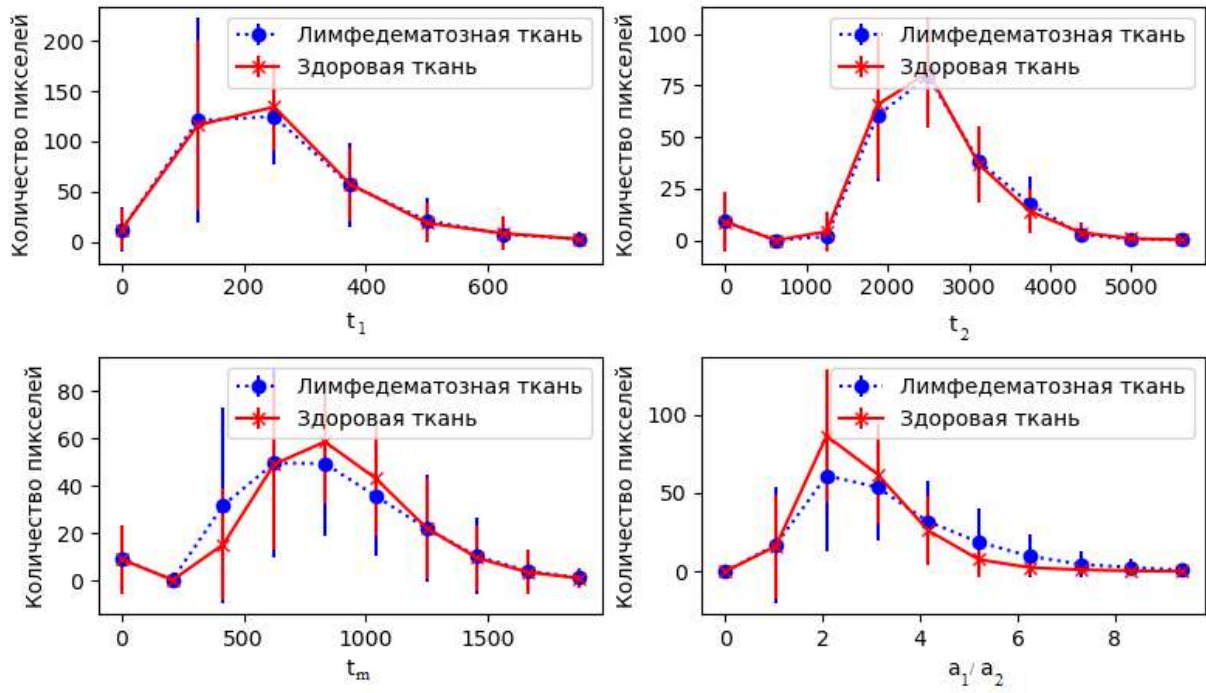


Рисунок 39 – Среднее значение и стандартное отклонение для параметров  $t_1, t_2, t_m, a_1/a_2$

Результаты применения фазорного подхода показаны на рисунке 40. Видно, что данный подход также не позволяет различить группы тканей.

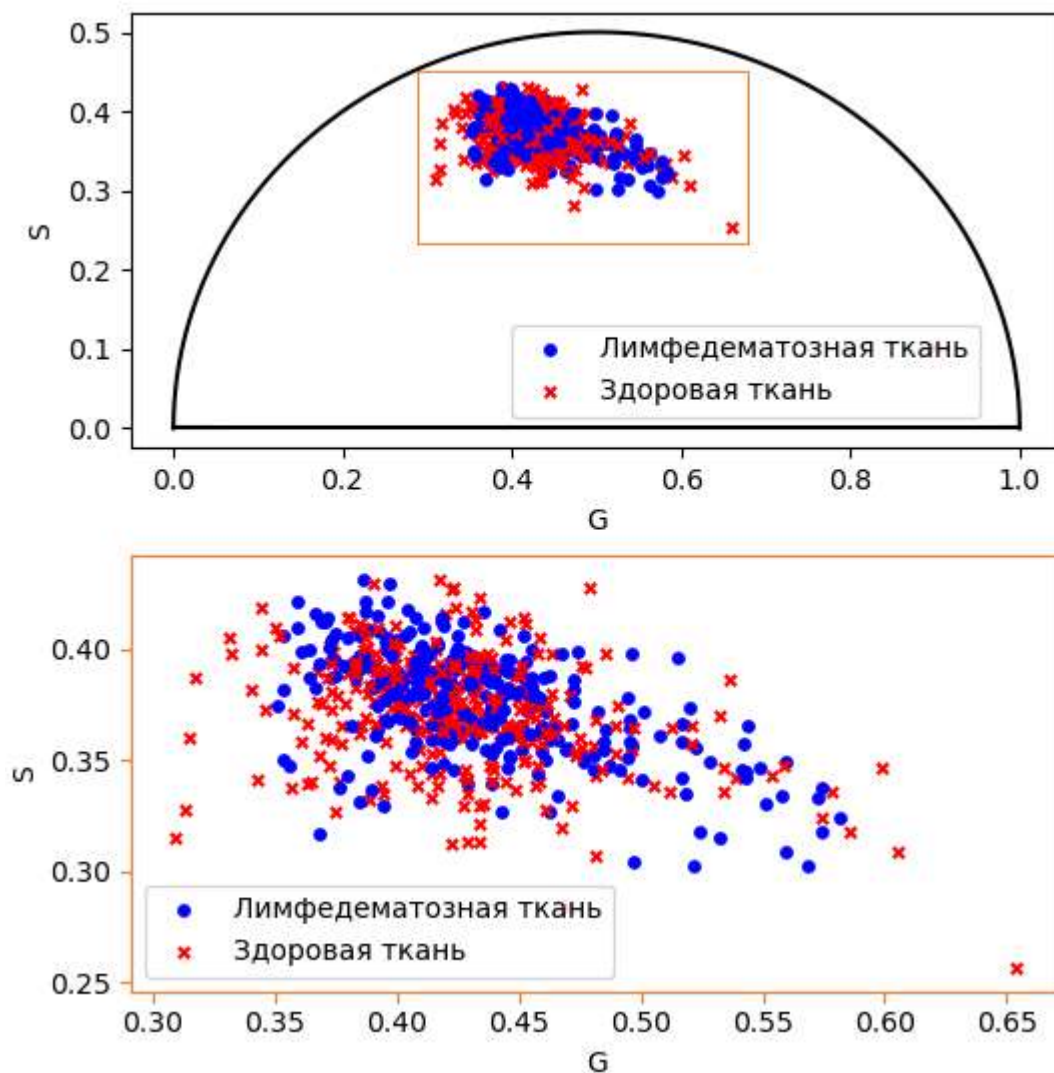


Рисунок 40 – Фазорный подход для данных здоровой и лимфедематозной ткани

Для более детального анализа кривых FLIM был использован метод МГК. Предварительно, данные обрабатывались ранговым фильтром с размером окна, равным 7, и рангом, равным 3. На рисунке 41 показаны две первые главные компоненты для здоровой и лимфедематозной тканей. Эллипсы покрывают 70% точек из каждой группы. Площадь пересечения эллипса лимфедематозной ткани с эллипсом здоровой ткани более 95%, однако она меньше площади здоровой ткани на 60%. Таким образом, разброс точек для здоровой ткани больше, что вероятно отражает меньшую вариативность параметров лимфедематозной ткани по сравнению со здоровой.

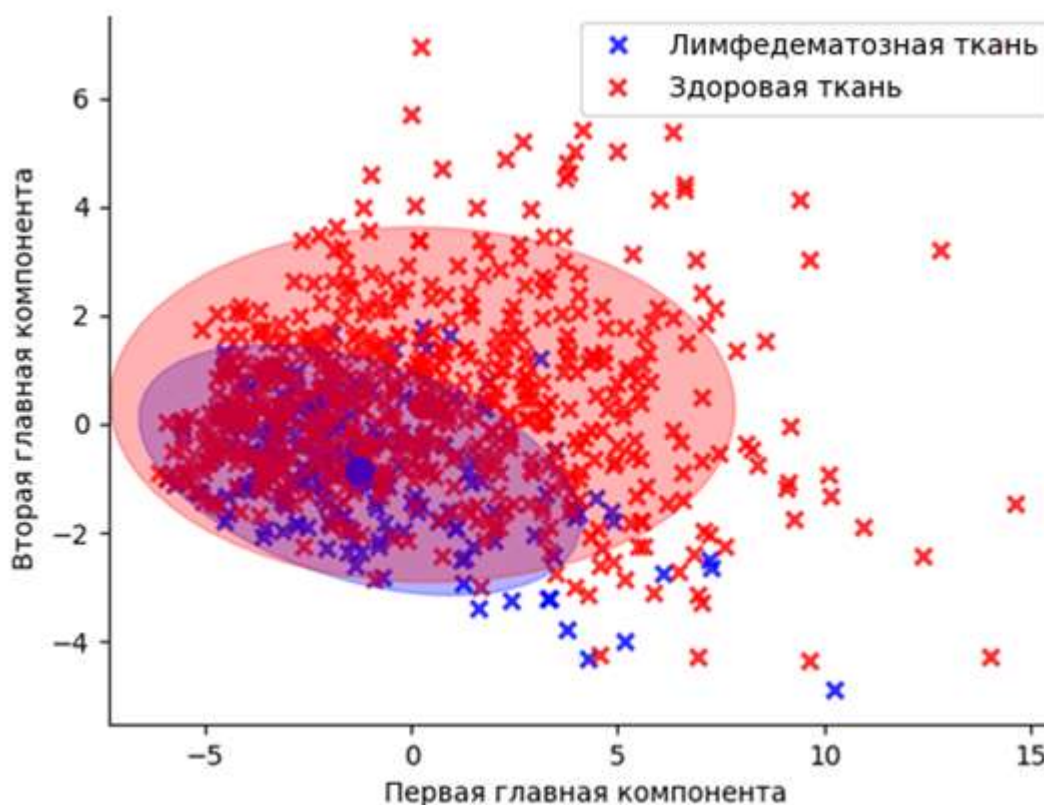


Рисунок 41 – Две первых главные компоненты для FLIM данных, полученные для здоровой и лимфедематозной тканей

### Раздел 3.7 Заключение к главе 3

В данной главе рассмотрен подход для диагностики лимфедемы, который включает оценку дезорганизации коллагена в тканях человека *in vivo* с помощью ДФМ и машинного обучения. По результатам написания данной главы доказано два защищаемых положения данной диссертации.

Показано, что значение SAAID со значения  $0.36 \pm 0.14$  для здоровой ткани значительно увеличивается до  $0.45 \pm 0.13$  для лимфедематозной ткани с уровнем значимости  $<0.05$  по критерию Манна-Уитни.

Для количественной оценки дезорганизации структуры коллагена в лимфедематозной ткани использовался ряд детекторов границ. Показано, что распределение ОКТГ изображений становится шире со сдвигом медианы распределения в сторону больших значений. Такие изменения распределений ОКТГ изображений связаны с дезорганизацией пространственной структуры коллагеновых волокон.

Показано, что разработанная предиктивная модель диагностики лимфедемы основанная на регистрации сигнала второй гармоники кожи методом ДФМ, выявлении информативных

признаков модифицированным методом HOG, классификации информативных признаков обученной машины опорных векторов с радиальным базисным ядром (параметр регуляризации равен 1.0, параметр гамма равен 0.1) и метода голосования большинством обеспечивает точность диагностики лимфедемы 96% на использованной экспериментальной выборке.

## ГЛАВА 4. Разработка модели лимфедемы на мелких животных

### Раздел 4.1. Обзор литературы по теме создания модели лимфедемы

Одна из первых опубликованных работ по созданию модели лимфедемы на задних конечностях крыс опубликована в 1958 году [306]. Для провоцирования лимфедемы использовалась инъекция каолина, которую вводили один или два раза, в случае двойной дозы первая инъекция вводилась в начале исследования, вторая инъекция - через 54 дня. Для другой группы крыс вводилась только одна инъекция каолина. В работе показано, что такой способ дает небольшое увеличение объема конечности (от 1.5 до 15%) по сравнению с контрольной конечностью. При этом однократная доза дает менее выраженное увеличение объема. Измерения проводились на 119-й и 63-й день измерений для первой и второй групп, соответственно. Позже подобные подходы были подвергнуты критике в виду недоказанности клинического развития лимфедемы и малой статистической разницы в объеме конечности [307].

Другой подход связан с резекцией (удалением) лимфоузлов на конечностях крыс. В работе Кантером и др.[307] после удаления лимфатических узлов около задней конечности использовалась лучевая терапия в дозе 45 Гр. Показано, что комбинация паховой резекции, периферического удаления кожи, подкожной клетчатки и лучевой терапии может успешно вызвать лимфедему нижних конечностей у крыс [308]. Показано, что, когда иссечение мягких тканей не производится, лимфедема не развивается. Подобный результат описан в работе [309], [310], однако в приведенных работах ничего не говорится об устойчивости отеков.

Мендес и др. [311] иссекли подмышечные лимфатические узлы с целью развития лимфедемы на передних конечностях крыс. После удаления лимфоузлов и реабилитации после операции в течение 66 дней, авторы применили Оксазолон, который вызывает контактную гиперчувствительность, иммунологический ответ на чужеродное химическое вещество. Авторы отмечают отличие острой лимфедемы и отека, вызванный воспалением и лимфатической недостаточностью в передних конечностях крыс. Последняя не зависит от процесса заживления ран, а зависит только от функционального состояния лимфатической системы передних конечностей. Данный автор также использовал блеомцин, который усиливал фиброз ВКМ [312]. Данная группа подходов основана на введение веществ в ВКМ, которые вызывают воспаление, такие вещества провоцируют образование фиброзной ткани, что может быть никак не связано с развитием лимфедемы.

Также после удаления лимфоузлов, чтобы предотвратить эпителизацию, наносились царапины на заживающую ткань один раз в три дня [313]. Такой подход так же вызывает воспалительные процессы, которые изменяют ВКМ и могут быть причиной увеличения объема конечности.

Стабильная модель лимфедемы на крысах без использования лучевой терапии представлена в работе [314]. Авторы делали окрашивание при помощи индоцианинового зеленого и вертикально ориентированный разрез в средней части паха и иссекали полосу кожи и подкожной клетчатки шириной 8–10мм по окружности до фасции, после чего иссекали глубокие лимфатические сосуды в дополнение к подколенным и паховым лимфатическим узлам. Данный подход способен генерировать статистически значимое увеличение объема конечности, сохраняющееся не менее 48 дней, результаты так же подтверждены гистологически. Данная модель требует удаления достаточного большой области ткани вокруг конечности, что является нестандартной ситуацией при формировании лимфедемы у человека.

Заключение о появлении и развитии отека в тканях животного реализуют на основании либо данных гистологического исследования биопсий, либо при помощи методов анализа лимфотока. В работе [315] используется лимфофлюорография для доказательства нарушения оттока лимфы на ранних сроках после лимфаденэктомии в сочетании с лучевой терапией.

При развитии лимфедемы отмечаются изменения в эпидермисе, дерме и гиподерме [316]. Изменения в эпидермисе характеризуются развитием гиперкератоза, который проявляется утолщением рогового слоя и исчезновением плетеных волокон. Отмечается гипергранулез, характеризующийся появлением базофильных пикнотических ядер в слое кератиноцитов, и акантоз (увеличение толщины мальпигиевого слоя). В поверхностной дерме появляется фиброламеллярная гиперплазия – четкие коллагеновые пучки, параллельные базальному эпидермальному слою; наличие мононуклеарных воспалительных клеток, включая лимфоциты и макрофаги. При II стадии лимфедемы отмечаются плазматические клетки.

Все описанные выше работы позволяют создать лимфедему на конечностях мелких животных, однако каждый из подходов обладает своими недостатками. Представленные модели формируют лимфедему, которая наблюдается в первые два-три месяца после начала формирования, однако в некоторых случаях слабый статистический анализ не позволяет говорить о достоверности описанных результатов, также в большинстве работ нет информации о стабильности полученных результатов. Работа [314] опубликованная в 2020 году описывает создание стабильной лимфедемы, однако такой подход требует значительного удаления ткани вокруг конечности.

В клинической практике у человека обычно лимфедема возникает при лечении раковых заболеваний (например, рак молочной железы провоцирует лимфедему рук), в этом случае происходит удаление лимфоузлов конечности с последующей лучевой терапией. В данной главе рассмотрена модель лимфедемы, являющаяся прототипом возникновения и развития лимфедемы у человека, реализованная в течение длительного периода времени, сочетающая резекцию лимфоузлов с повторной лучевой терапией для того, чтобы добиться стабильной лимфедемы.

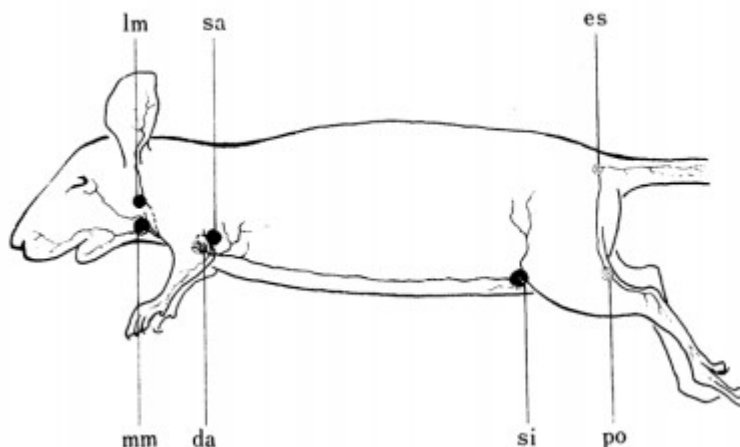
## Раздел 4.2. Протокол создания модели лимфедемы на задних конечностях крыс

В основе разработанной модели лимфедемы послужила гипотеза о том, что развитие данного заболевания требует наличия триггера – воздействие внешнего фактора (провокации). Например, таким фактором может служить повторное облучение. Для исключения воздействий иных факторов (например, воспаление, травмы кожи), первое облучение проводилось спустя 1.5 месяца после хирургической операции, повторное облучение проведено спустя 10 месяцев после операции, все измерения проводились через две недели после облучения.

Исследование проводилось на самцах крыс Wistar в возрасте 8-10 недель (масса 200-250 г), 15 голов. Крысы содержались в изолированном вентилируемом помещении вивария Института биологии и биофизики Томского государственного университета. В помещении поддерживалась температура  $20 \pm 2.0^\circ\text{C}$ , влажность воздуха 60%, а также 12 часов - свет/ 12 часов - темнота. Все животные были промаркированы и содержались в течение 7 суток на карантине по 5 крыс в одной клетке, при свободном доступе к воде и пище (стандартный рацион для крыс). Все экспериментальные процедуры утверждены в Комиссии по этическим правилам обращения с животными Института биологии и биофизики Томского государственного университета. Протокол исследования одобрен Комитетом по биоэтике НИ ТГУ (выписка из протокола № 1 заседания комитета по биоэтике НИ ТГУ от 23.11.2018).

На первом этапе у крыс удаляли подколенный узел (*Inn. popliteus*) на одной лапе, а вторая лапа использовалась как контрольная. Данная операция проводилась под общей анестезией, которая реализована внутримышечным наркозом (2мг/кг массы животного «Золетил» и 1,5-2мг/кг массы животного Рометар («Золетил» + «Рометар» 1:1 (0,02+0,02мл)). После обработки операционного поля водным раствором «Хлоргексидина», осуществлялось введение 0,1мл 0,1% раствора метиленового синего подкожно в тыльную поверхность задней лапы. После введения контраста лапу массировали в течение 1-2 минут. Из подкожно-жировой клетчатки контраст попадал в глубокие лимфатические коллекторы и доходил до подколенных лимфатических узлов (рисунок 42).





mm – медиальный нижнечелюстной узел, lm – латеральный нижнечелюстной узел, da – глубокие подмышечные узлы, sa – поверхностные подмышечные узлы, si – узел, расположенный под подвздошной костью, po – подколенный узел, es – наружный крестцовый узел

Рисунок 42 – Лимфатические узлы и сосуды тела крысы

После окрашивания 0,01% раствором метиленового синего глубоких лимфатических коллекторов и подколенных лимфатических узлов, выполняли разрез кожи до 1,5см в подколенной области. При ревизии выделяли окрашенные подколенные лимфатические узлы, к которым шли глубокие лимфатические коллекторы задней конечности.

Послеоперационное облучение на область задней конечности проводили через 1 месяц с момента операции. Данный перерыв обоснован тем, что в течение 3 недель с момента операции в тканях обычно наблюдается послеоперационный отек.

Близкофокусная рентгенотерапия проводилась на аппарате X-Strahl 200, технические характеристики прибора: анодное напряжение от 20 до 200кВ, анодный ток 0-20мА, максимальная выходная мощность 3кВт. Поглощенная доза составила 20 Грей за 20 минут, рассчитывалась в соответствии с модифицированной и дополненной моделью ВДФ (время - доза - фракционирование) для коротко-дистанционной рентгенотерапии в доз-эквивалентных режимах.



Рисунок 43 – Близкофокусная рентгенотерапия

После введения наркоза крыса размещалась на пенопластовой подложке в горизонтальном положении (см. рисунок 43), оперированная лапа фиксировалась для исключения произвольных движений во время проведения облучения. Фокус аппарата X-Strahl 200 максимально приближался к левой задней конечности крысы для получения нужной дозы облучения, так как при отведении фокуса даже на небольшое расстояние, доза облучения будет ниже, чем требуется для исследования. Лучевое воздействие на лабораторную крысу делали дробно: 4 раза по 5 минут с интервалом между облучениями примерно в 2 минуты. Лучевое воздействие проводили в закрытом помещении, за лабораторной крысой наблюдение осуществлялось из диспетчерской через видеокамеру в режиме реального времени (см. рисунок 44).

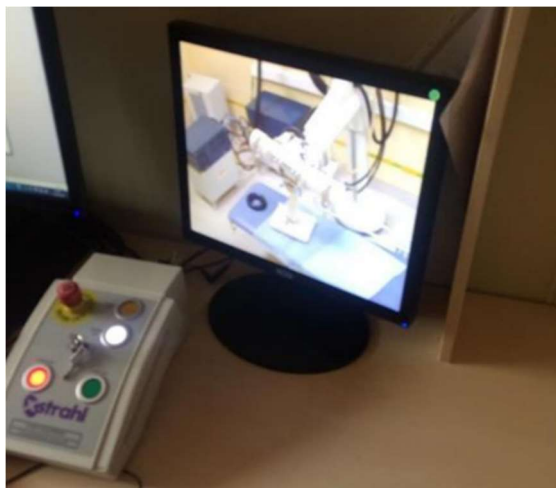


Рисунок 44 – Наблюдение за ходом лучевой терапии

В послеоперационном периоде через 1 месяц с момента операции и через 2 недели с момента лучевой терапии (1,5 месяца с момента эксперимента), проводили измерение окружности прооперированной задней конечности в сравнении со здоровой конечностью. Результаты приведены в следующем разделе. Исследования ДФМ проводились каждый месяц, начиная со второй недели после облучения. Гистологические исследования проводились до облучения, после первого облучения и после второго облучения. Общая схема протокола измерений представлена на рисунке 45.

День операции	1 месяц после операции	1 месяц после операции	2 месяца после операции	3 месяца после операции	4 месяца после операции	6 месяцев после операции	10 месяцев после операции	11 месяцев после операции
		гистология 3 крысы	гистология 3 крысы	гистология 3 крысы	гистология 3 крысы	гистология 4 крысы		гистология 4 крысы
Операция	Облучение	ДФМ	ДФМ	ДФМ	ДФМ	ДФМ	Облучение	ДФМ

Рисунок 45 – Схематичное представление протокола исследования

### Раздел 4.3. Протокол исследования задних конечностей крыс *in vivo* методом ДФМ

Исследования при помощи ДФМ проводилось после первого и второго облучения. Процедура измерений аналогична протоколу на людях, описанному в главе 3. Основные отличия

касаются глубины сканирования и способа фиксации крысы на подложке, о чем будет сказано ниже.

Перед измерениями взрослая особь крыс наркотизировалась, через 5 минут с поверхности внешней стороны бедер осуществлялась депиляция с помощью крема Veet, после чего участки кожи протирались влажными салфетками для удаления остатков крема [317]. Особь помещалась на платформу, представленную на рисунке 46а. В исследовании использовалась платформа из пенопласта, которая является теплоизолирующим слоем, и оказывается удобной для закрепления конечности крысы.



Рисунок 46 – Пример фиксации крысы на пенопластовой подложке (а) и пример фиксации лапы крысы (б)

Фиксация конечности осуществлялась при помощи шерстяных ниток (см. рисунок 46б), таким образом, чтобы внешняя сторона бедра была развернута параллельно платформе и перпендикулярно измерительному рукаву.

Согласно литературному обзору, приведенному в главе 1 была выбрана глубина сканирования 30,40,50 мкм. В таблице 13 показано общее количество изображений АФ и ГВГ, полученных в результате измерений.

Таблица 13 – Количество изображений полученных методом ДФМ

День измерения	Контроль	После первого облучения	После второго облучения
до операции	45 (3 особи)	-	-
через 1мес.	150 (10 особей)	180 (12 особей)	-
через 2мес.	135 (9 особей)	135 (9 особей)	-
через 3мес.	90 (6 особей)	90 (6 особей)	-
через 4мес.	60 (4 особи)	60 (4 особи)	-
через 6мес.	60 (4 особи)	60 (4 особи)	-
После повторного облучения через 11 мес.	60 (4 особи)	-	60 (4 особи)
Итого	600	525	60

#### Раздел 4.4. Результаты исследования длины окружности задней конечности при лимфедеме

Через 1 месяц с момента операции и через 2 недели с момента лучевой терапии (1,5 месяца от начала эксперимента) проводили измерение окружности прооперированной задней конечности в сравнении со здоровой задней конечностью этого же животного. Первая точка измерения размечалась на 1см выше пяточной кости. Рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили для каждого измерения. По формуле усеченного конуса рассчитывали объем голени от первой до пятой точки в см<sup>3</sup> (для достоверности вычисляли два объема – от первого до третьего измерения и от третьего до пятого измерения, а затем проводили их сложение). Так как объем выборок был мал, для дальнейшего сравнения использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Таблица 14 – Окружности (см) и объем (см<sup>3</sup>) задней конечности крысы в области голени при создании модели лимфедемы, Me [Q<sub>25</sub>; Q<sub>75</sub>]

Группа	Окружности конечности, см					Объем, см <sup>3</sup>
	P1	P2	P3	P4	P5	
голень контроль	3,85 [3,20;3,90]	4,65 [4,00;4,90]	6,10 [5,10;7,10]	7,55 [7,00;7,80]	7,65 [7,50;8,00]	5,83 [4,32;6,72]
голень операция (1 месяц)	3,45 [3,20;3,60]	4,55 [4,20;5,00]	6,10 [6,00;6,50]	7,30 [6,70;7,80]	7,90 [7,00;8,10]	5,79 [5,66;5,93]
голень контроль	3,00 [2,90;3,20]	4,00 [3,50;5,30]	6,50 [5,60;7,60]	7,00 [6,90;7,50]	8,20 [7,80;8,20]	6,03 [5,35;7,31]
голень операция + лучевая терапия (1,5месяца)	3,10 [3,00;3,20]	4,40* [4,00;5,20]	5,50* [5,00;6,00]	6,90 [6,00;7,60]	8,20 [7,50;8,20]	5,71 [4,87;7,73]
голень контроль	2,9 [2,70;3,10]	4,10 [3,60;5,30]	6,60 [5,50;7,40]	7,00 [6,80;7,40]	7,50 [7,20;8,10]	6,18 [5,35;7,31]
голень операция + двойная лучевая терапия (11 месяцев)	2,9 [2,90;3,10]	4,30* [4,00;4,80]	5,80* [5,30;6,00]	6,80 [6,10;7,40]	7,60 [7,40;8,20]	5,84 [4,87;7,73]

Примечание: \* - достоверность различий в сравнении с группой контроля (при  $p < 0,05$ ).

При внешнем осмотре задних конечностей крыс через 1,5 месяца с момента начала эксперимента (1 месяц с момента операции и 2 недели с момента облучения) и через 11 месяцев с начала эксперимента (повторное облучение через 9 месяцев после первого облучения), не отмечалось видимой разницы в объеме прооперированной и облученной конечности в сравнении со здоровой. При расчете медиан, верхнего и нижнего квартилей для окружностей в разных точках области голени задней конечности и для объемов голени в этой области не выявлено существенных отличий между здоровой конечностью и конечностью с моделью хронического лимфатического отека (см. таблицу 14). Однако стоит отметить, при удалении лимфатических узлов конечности так же удалялась подкожно-жировая клетчатка.

#### Раздел 4.5. Результаты гистологического исследования

Для комплексного исследования тканевых и сосудистых реакций при развитии лимфедемы в тканях задней конечности крысы проводили стандартное гистологическое исследование образцов кожи с внутренней поверхности задней конечности животных через

1мес., 2мес., 3мес., 4мес. и 6мес. Биоптаты забирали под внутримышечным наркозом 2 мг/кг массы животного «Золетил» и 1,5-2мг/кг массы животного Рометар («Золетил» + «Рометар» 1:1 (0,02+002мл). Контролем выступали фрагменты тканей с внутренней поверхности задней конечности интактных животных ( $n = 6$ ). Взятые биоптаты тканей фиксировали в 10–12%-м растворе нейтрального формалина (BioVitrum Россия) в течение 24ч., промывали и дегидратировали, а затем заливали в парафин.

Изготавливали парафиновые срезы толщиной 5–7мкм при помощи ротационного микротомы Асси-Cut SRM™200 (Sakura, Япония) и окрашивали гистологические препараты, используя несколько методов:

1) окраска гематоксилином и эозином для обзорного исследования происходящих в тканях лоскута морфологических изменений (оценка клеточной инфильтрации, отека тканей, состояния структуры коллагена и сосудистого компонента) [318];

2) импрегнация серебром для оценки ретикулярных волокон и других аргирофильных элементов (ретикулярные и нервные волокна черные, соединительная ткань – коричневая, коллаген – золотисто-желтый) [319]. Обезвоженные и просветленные срезы заключали в канадский бальзам. На гистологических препаратах проводили морфометрический анализ тканевых и сосудистых реакций в дерме и гиподерме задней конечности крысы при развитии лимфедемы.

С помощью цифровой фотокамеры «Canon PowerShot G10» производили съемку гистологических препаратов биопсий для каждой контрольной точки, с которых снимали по 7–10 случайных полей зрения для каждого биоптата (ув. 100, ув. 200). Для статистической обработки использовался пакет программ Statistica 7.0.

На гистологических препаратах проводили морфометрический анализ сосудистых и тканевых реакций в дерме и гиподерме задней конечности крысы при развитии лимфатического отека [320].

Цифровые фотографии подвергали морфометрическому исследованию с использованием компьютерной программы ImageJ 1.43. Подсчет проводили в 50 полях зрения. За единицу измерения принимали 1мм<sup>2</sup> ткани биоптата. С помощью метода точечного счета Автандилова с использованием Plugin «Grid» в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали объемную плотность сосудов микроциркуляторного русла (%) и диаметр просвета сосуда (мкм) [318], [319], [321].

При гистологическом исследовании кожи внутренней поверхности задней конечности крыс через 1 месяц с момента оперативного вмешательства до начала лучевой терапии гиподерма по сравнению с группой контроля характеризовалась выраженным фиброзом и присутствием лишь единичных адипоцитов (см. рисунок 47). В сетчатом слое дерма сильно васкуляризована,



что является признаком усиленного ангиогенеза, сосуды полнокровны из-за повышенного давления. По данным литературы, данное явление характеризуется как лимфатическая гемангиопатия [322].

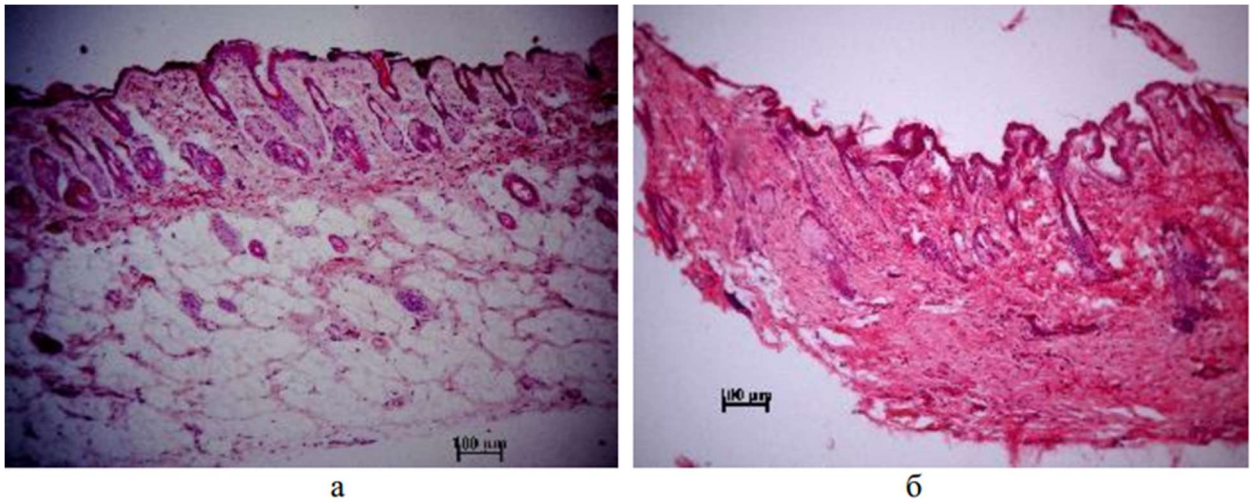


Рисунок 47 – Кожа внутренней поверхности задней конечности крыс: а – контроль; б – 1 месяц с момента операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов).

Окраска: гематоксилин – эозин, ув. х 100

В сосочковом слое дермы выявлено избыточное скопление жидкости, в сетчатом слое – нерегулярные межфибрилярные пространства (см. рисунок 48).

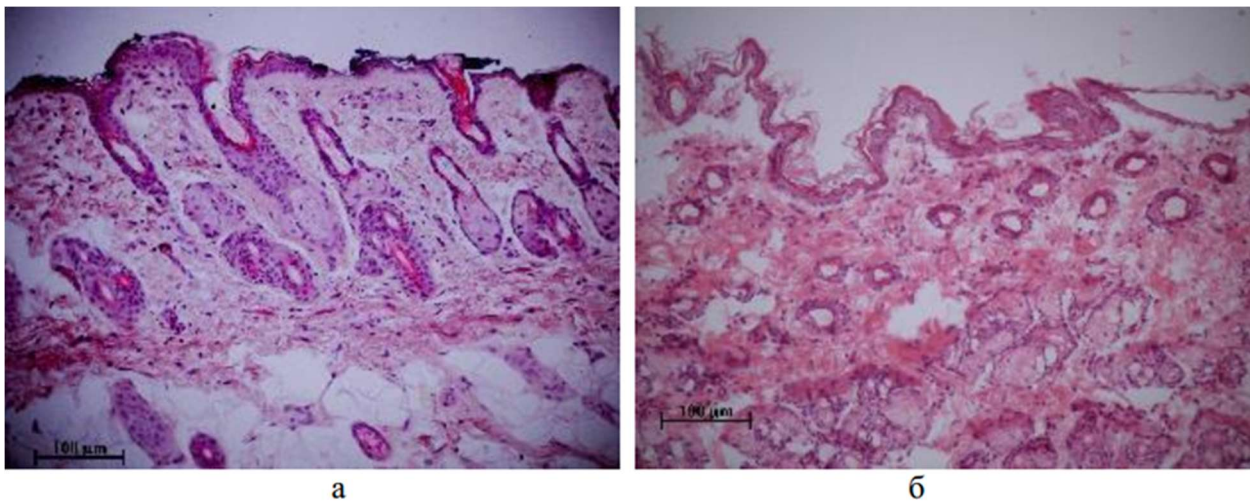


Рисунок 48 – Кожа внутренней поверхности задней конечности крыс: а – контроль; б – 1 месяц с момента операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов).

Окраска: гематоксилин – эозин, ув. х 200

Через 2 месяца в эпидермисе лап с развивающейся лимфедемой выявлен гиперкератоз, в поверхностной дерме – участки скопления тканевой жидкости, неоангиогенез с полнокровием,



участки гиперконденсации коллагена (развитие фиброза), гиподерма замещена коллагеновыми волокнами, васкуляризована (см. рисунок 49)

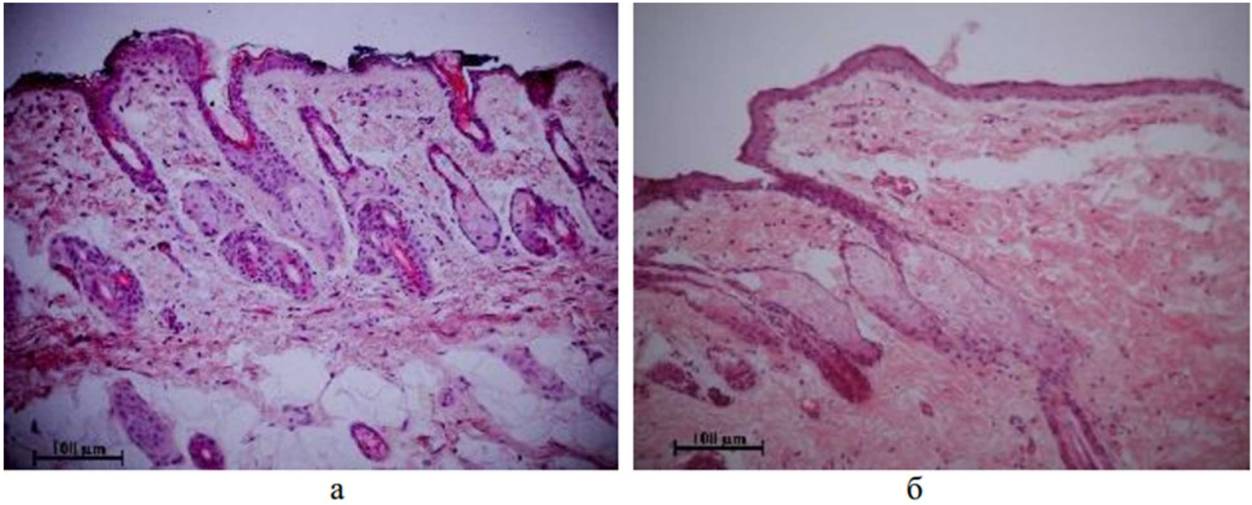


Рисунок 49 – Кожа внутренней поверхности задней конечности крыс: а – контроль; б – 2 месяца с момента операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов в комбинации с лучевой терапией). Окраска: гематоксилин – эозин, ув. х 200

Через 3 месяца в эпидермисе лап с развивающейся лимфедемой выявлен гиперкератоз, увеличение толщины мальпигиевого (росткового) слоя (акантоз), в дерме отмечается фиброламеллярная гиперплазия, вокруг потовых желез и сальных желез участки гиперконденсации коллагена (периаднексальный фиброза), атрофия потовых желез, гиподерма замещена коллагеновыми волокнами, пучки коллагена утолщены, отмечается их сгущение (гиперконденсация коллагена) (см. рисунок 50)

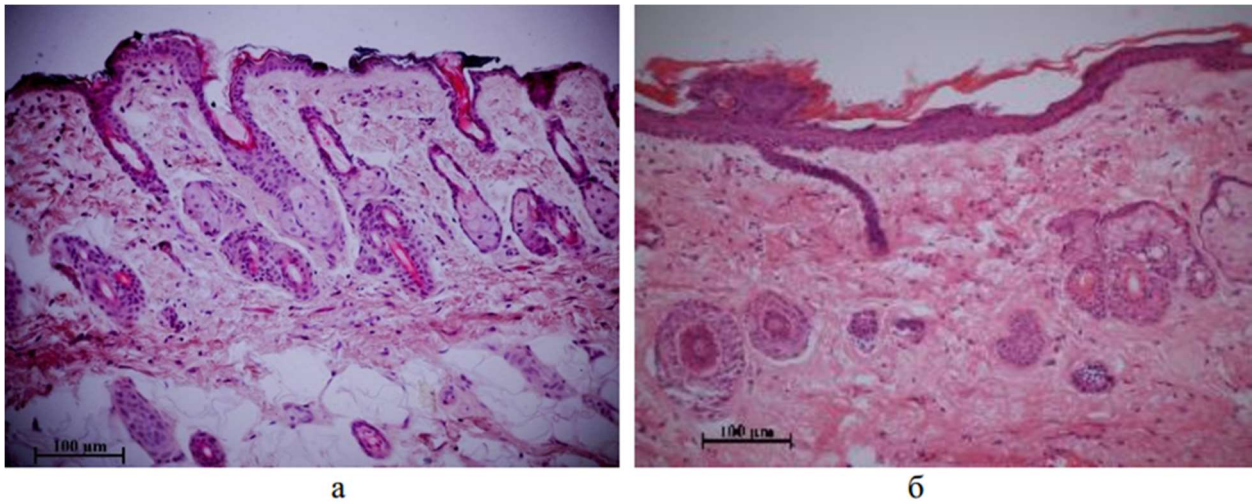


Рисунок 50 – Кожа внутренней поверхности задней конечности крыс: а – контроль; б – 2 месяца с момента операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов в комбинации с лучевой терапией). Окраска: гематоксилин – эозин, ув. x200

Через 4 месяца выявлен гиперкератоз, акантоз, в поверхностной дерме – участки скопления тканевой жидкости, атрофия сальных и потовых желез, участки гиперконденсации коллагена, фиброламеллярная гиперплазия, вокруг единично сохранных потовых и сальных (периаднексальный фиброза), гиподерма замещена гиперконденсированными коллагеновыми волокнами (см. рисунок 51).

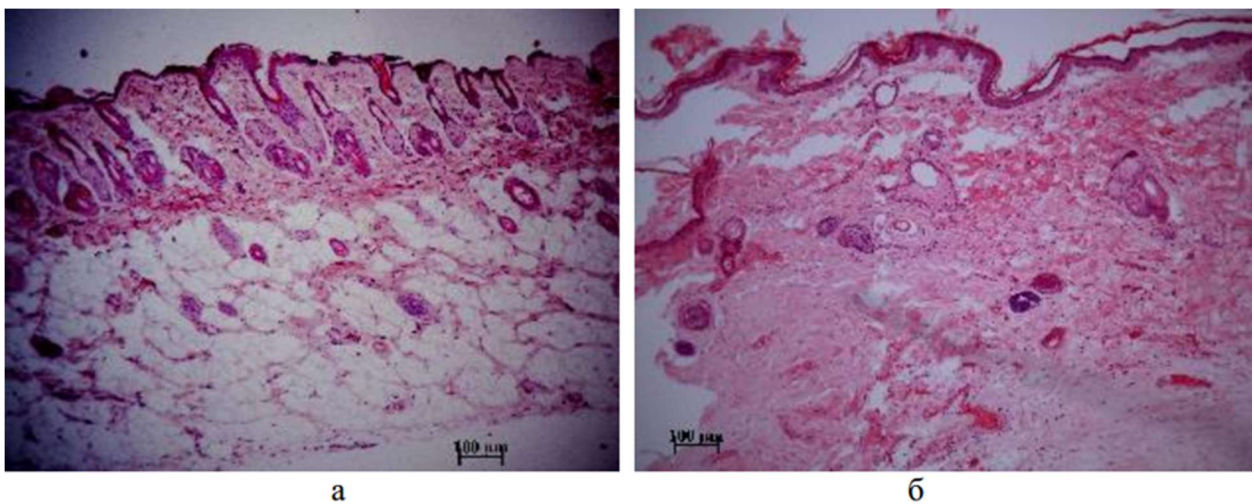


Рисунок 51 – Гистологические срезы кожи внутренней поверхности задней конечности крыс. Окраска: гематоксилин – эозин, ув. x100 а) контроль; б) 4 месяца с момента операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов в комбинации с лучевой терапией)

Через 6 месяцев в коже лап с развивающейся лимфедемой отмечается истончение эпидермиса, атрофия сальных и потовых желез, деструкция пучков коллагена, коллагеновые волокна расположены хаотично, местами разволокнены (фибриноидное набухание), избыточным скоплением тканевой жидкости между пучками коллагена, гиалиноз сосудов (см. рисунок 52).

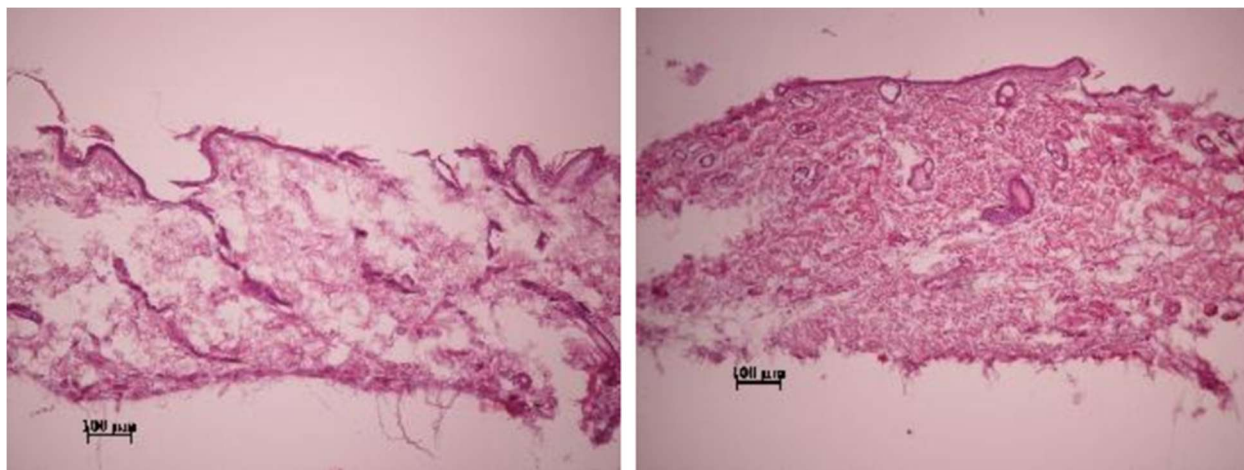


Рисунок 52 – Гистологические срезы кожи внутренней поверхности задней конечности крыс через 6 месяцев с момента операции (лимфодиссекция подколенных и паховых лимфатических узлов в комбинации с лучевой терапией). Окраска: гематоксилин - эозин, ув. x100

Таким образом, по результатам гистологического исследования, через 1 месяц с момента лимфодиссекции подколенных и паховых лимфатических узлов в коже прооперированной задней конечности крысы отмечался отек тканей, наличие полимеризации коллагеновых микрофибрилл, васкуляризация дермы с развитием полнокровия (лимфоидная гемангиопатия), замещение адипоцитов коллагеновыми массами, мукоидное набухание. Через 2 месяца после оперативного вмешательства и через месяц после воздействия лучевой терапии в коже экспериментальных животных развитие гиперкератоза, гиперконденсации коллагеновых волокон. Через 3 месяца процесс прогрессирует с развитием акантоза, периаднексального фиброза, атрофии потовых желез. К 4-му месяцу изменения более выражены – атрофия сальных и потовых желез, вокруг единично сохранных потовых и сальных желез периаднексальный фиброза. Изменения в коже при развитии лимфедемы со 2-го по 4-й месяц характеризуются наличием дистрофических процессов. К 6-му месяцу в тканях отмечается наличие межклеточной жидкости, деструкция коллагена (фибриноидное набухание), гиалиноз сосудов, прогрессирование фиброза.

Результаты гистологического анализа свидетельствуют о развитии лимфедемы в ткани исследованных крыс [320].



#### Раздел 4.6. Результаты исследования модели лимфедемы методом ДФМ

Для оценки состояния ткани (в частности отношения сигналов АФ и ГВГ, а также морфологических изменений коллагена) согласно протоколу, описанному в разделе 4.3 была проведена серия измерений кожи крыс. В результате проведения измерений было получено 1185 изображений АФ и ГВГ папиллярной дермы на глубине от 30 до 50мкм (600 изображений контрольной группы, 525 - первой стадии, 60 - второй стадии). Предварительно для каждого изображения применялся медианный фильтр с размером окна равным 3. Аналогично протоколу, описанному в разделе 3.2 изображение разбивалось на фрагменты 32x32 пикселя. Для каждого фрагмента вычислялось значение SAAID (способ вычисления описан в главе 2) и строились распределения (гистограммы) полученных значений SAAID от количества фрагментов для каждой из групп. На рисунке 53 приведены нормированные распределения значений индекса SAAID для изображений здоровой ткани и лимфедематозной ткани на разных этапах эксперимента.

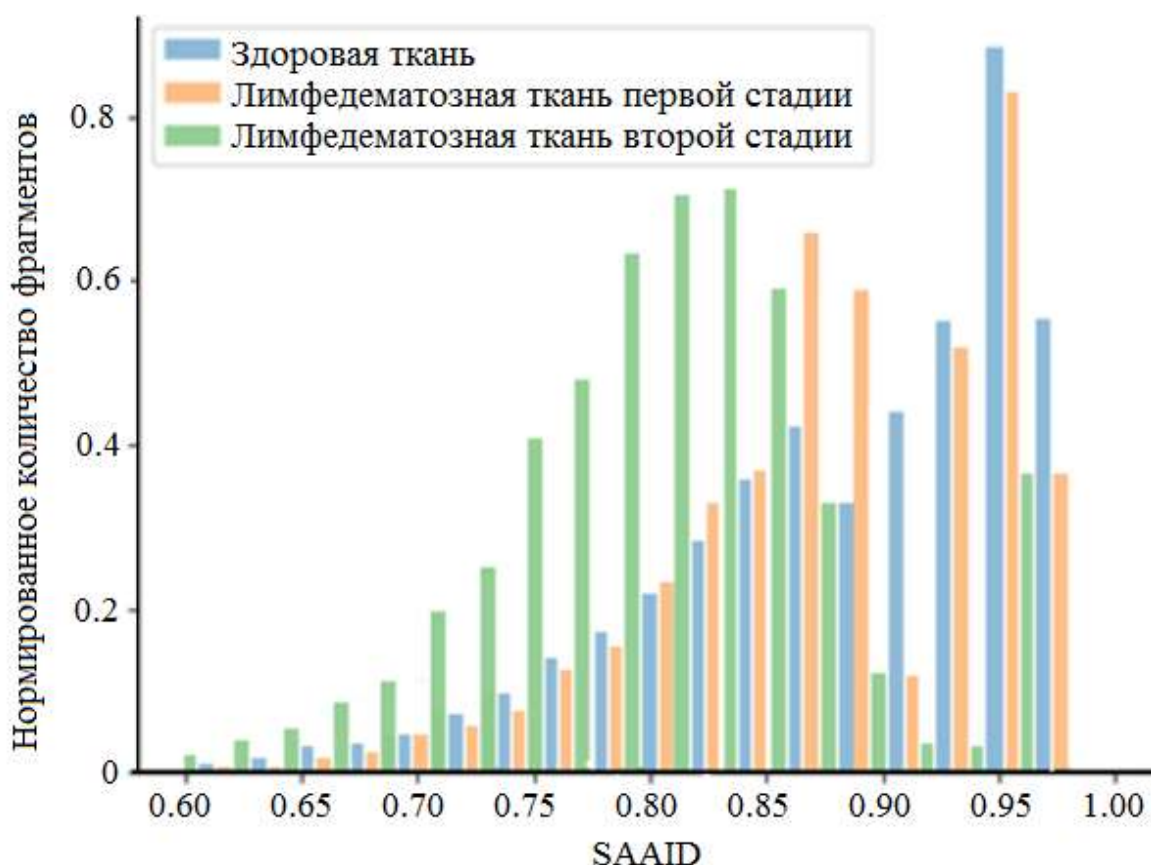


Рисунок 53 – Гистограммы среднего значения индекса SAAID для фрагментов здоровой и лимфедематозной кожи на первой и второй стадиях

На полученных гистограммах (см. рисунок 53) видна разница в распределениях индекса SAAID: амплитуды пиков имеют значительные различия. При этом расположение пиков близко, т.е. системные изменения в тканях могут мало зависеть от отношения сигнала ГВГ и АФ, также не все участки кожи могут быть повреждены [323], [324]. Различия были оценены критерием Манна Уитни с уровнем значимости  $< 0.05$ . Оценка показала значимость различий между группами.

Для оценки динамики развития лимфедемы производилась классификация данных, для здоровой и лимфедематозной тканей после первого и второго облучения. Оценка проводилась на изображениях целиком и на фрагментах 32x32, способ разбиения описан в главе 3. При классификации изображений в обучающих примерах было 1185 изображений (600 изображений здоровой ткани, 525 изображений для лимфедематозной ткани после первого облучения, 60 изображений – после второго облучения), тестирование проводилось на оставшихся изображениях. Разбиение на группы осуществлялось 50 раз, для каждого раза было оценено качество классификации. В случае обучения на фрагментах, их количество варьировалось в зависимости от выбранных изображений. Аналогично результатам, приведенным в главе 3 учет ориентаций, осуществлен алгоритмом HOG, перебор параметров обучения МОВ был следующим: параметр регуляризации менялся от 0.1 до 10 с шагом 0.1, параметр гамма менялся от 0.1 до 10.0 с шагом 0.1. Результаты классификации на фрагментах изображений представлены в таблице 15, а в таблице 16 обученные на полных изображениях.

Таблица 15 – Результаты классификации векторов признаков HOG полученных для фрагментов изображений в тестовой выборке МОВ с РБФ ядром с параметрами гамма 0.1 и параметром регуляризации равным 1.

	Кожа крысы с первой стадией лимфедемы		Кожа крысы со второй стадией лимфедемы	
	Чувствительность	Специфичность	Чувствительность	Специфичность
Здоровая Ткань	0.78 ± 0.23	0.63±0.26	0.83 ± 0.14	0.72±0.21

Таблица 16 – Результаты классификации векторов признаков НОГ полученных для изображений в тестовой выборке МОВ с РБФ ядром с параметрами гамма 0.1 и параметром регуляризации равным 1.

	Кожа крысы с первой стадией лимфедемы		Кожа крысы со второй стадией лимфедемы	
	Чувствительность	Специфичность	Чувствительность	Специфичность
Здоровая Ткань	$0.79 \pm 0.16$	$0.64 \pm 0.19$	$0.81 \pm 0.14$	$0.74 \pm 0.16$

Приведенные в таблицах результаты показывают, что в динамике точность классификации увеличивается. Это позволяет сделать вывод о том, что различия между здоровой и лимфедематозной кожей увеличиваются в процессе прогрессирования заболевания [325]. При этом величины чувствительности и специфичности для второй стадии больше, а разброс в значениях меньше. Таким образом, показано, что существуют значимые различия между здоровой кожей и кожей после операции. Стоит отметить, что после повторного облучения разброс в данных уменьшается, что свидетельствует о прогрессировании заболевания.

#### Раздел 4.7. Заключение к главе 4

В данной главе разработан протокол экспериментальной модели развития лимфедемы задних конечностей крыс Wistar путем облучения конечности и резекции лимфатических узлов с последующим облучением в качестве провокации для развития отечности. 1. Методами гистологии и ДФМ показано, что лабораторная модель лимфедемы на задней конечности крысы реализуется путем резекции подколенного и ближайшего пахового лимфатического узлов с последующим облучением рентгеновым излучением оперированной конечности крысы через 1 и 10 месяцев после резекции с дозой облучения 20 грей в каждом сеансе, полученной по следующему протоколу: облучение 4 раза по 5 минут, интервалом между облучениями - 2 минуты. Т.е. доказано четвертое защищаемое положение данной диссертации.

## Заключение

В данной диссертационной работе при помощи методов ДФМ были исследованы изменения кожи на модели лимфедемы реализованной на мелких животных и для пациентов, страдающих данным заболеванием.

В работе предложено использовать модифицированный метод НОГ для оценивания структуры коллагена. Показана применимость такого подхода на модельных данных коллагена с разной степенью дезорганизации. Продемонстрировано, что для полностью дезорганизованной структуры плотность вероятности имеет вид равномерного распределения, для полностью ориентированной структуры – вид дельта-функции.

Разработана предиктивная модель для диагностики лимфедематозной ткани с использованием ДФМ и машинного обучения. В качестве классификатора использовался МОВ с РБФ ядром. Связка метода НОГ и МОВ является классической в задаче поиска объектов на изображении, в данном случае использовался модифицированный метод НОГ, описывающий информация не об объекте в целом, а общем количестве направлений градиентов изображения.

На экспериментальных данных ДФМ для здоровых добровольцев и пациентов с лимфедемой показано, что отношение сигналов автофлуоресценции и генерации второй гармоники, а также методы анализа градиентов позволяют классифицировать здоровую и лимфедематозную ткани.

Из предположения о необходимости триггера для прогрессирования заболевания на мелких животных была реализована модель лимфедемы с повторным облучением в качестве провокации. Гистологически верифицировано, что развитие лимфедемы сопровождается дезориентацией коллагена, что подтверждает полученные ранее результаты.

Таким образом результаты работы показали возможность *in vivo* исследования состояния папиллярной дермы при лимфедеме на микроскопическом уровне. Полученные результаты дают возможность неинвазивной диагностики заболевания на ранних стадиях заболевания, что важно для ранней и эффективной терапии. Математические подходы анализа ДФМ изображений, базирующиеся на методах машинного обучения, позволяют проводить экспресс диагностику, которая в дальнейшем может быть введена в клиническую практику.

Автор выражает благодарность своему научному руководителю и заведующему лаборатории биофотоники ТГУ, д.ф.- м.н., профессору Кистеневу Юрию Владимировичу за неоценимую помощь, советы и поддержку на всех этапах подготовки диссертации. Автор выражает благодарность за помощь в реализации протокола создания модели лимфедемы на мелких животных и последующего гистологического анализа Курочкиной Оксане Сергеевне и

Кривовой Наталье Андреевне. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории биофотоники за разностороннюю помощь при выполнении работы.



## Приложение 1

### Согласие на участие в клиническом исследовании

Название исследования: многофотонная томография кожи и подкожно-жировой клетчатки на аппарате «MPTflex» компании (JenLab GmbH, Германия).

Я, нижеподписавшийся(аяся), (Ф.И.О.) \_\_\_\_\_

даю добровольное согласие принять участие в исследовании: **многофотонная томография кожи и подкожно-жировой клетчатки на аппарате «MPTflex» компании JenLab GmbH.**

Я получил(а) исчерпывающие разъяснения от сотрудника о целях исследования, процедуре исследования. Специалист, проводящий исследование, сообщил мне обо всех возможных воздействиях на здоровье и самочувствие, которые могут возникнуть в результате участия в исследовании.

Я подтверждаю, что я полностью прочитал(а) и понял(а) прилагаемую информацию. Мне была предоставлена полная и понятная информация для участника исследования. У меня была возможность задать все возникшие вопросы.

Я понимаю, что участие в этом исследовании добровольное. Я могу в любое время и без объяснения причин забрать свое согласие, и это не повлечет никаких нежелательных последствий для моего дальнейшего лечения.

Я понимаю, что уполномоченные представители контролирующих организаций и этического комитета могут ознакомиться с некоторыми разделами моей медицинской документации, относящейся к моему участию в данном исследовании. Своей подписью я предоставляю им право доступа к моей медицинской документации.

Я согласен(а) принять участие в данном исследовании и сотрудничать со специалистом-исследователем, а при необходимости и с другими исследователями из его группы. Я обязуюсь немедленно сообщать обо всех замеченных отклонениях от нормы.

Я получил(а) подписанный экземпляр согласия на участие в исследовании.

Ф.И.О. \_\_\_\_\_.

Подпись пациента \_\_\_\_\_ . Дата \_\_\_\_\_.

*В случае несовершеннолетнего пациента:*

*Необходима подпись родителя*

Ф.И.О. пациента \_\_\_\_\_.

Подпись пациента \_\_\_\_\_ . Дата \_\_\_\_\_.

ФИО специалиста-исследователя \_\_\_\_\_.

Подпись: \_\_\_\_\_ . Дата: \_\_\_\_\_.

ФИО врача-исследователя: \_\_\_\_\_.

Подпись: \_\_\_\_\_ . Дата: \_\_\_\_\_.

## Список литературы

- [1] M. Földi and R. Strobenreuther, *Foundations of manual lymph drainage*, St. Louis. Mosby, 2005.
- [2] A. G. Warren, H. Brorson, L. J. Borud, and S. A. Slavin, “Lymphedema,” *Ann. Plast. Surg.*, vol. 59, no. 4, pp. 464–472, Oct. 2007.
- [3] W. L. Olszewski, A. Engeset, A. Romaniuk, I. Grzelak, and A. Ziolkowska, “Immune cells in peripheral lymph and skin of patients with obstructive lymphedema.,” *Lymphology*, vol. 23, no. 1, pp. 23–33, Mar. 1990.
- [4] B.-B. Lee, J. Bergan, and S. G. Rockson, Eds., *Lymphedema*. London: Springer London, 2011.
- [5] J. B. Byung-Boong Lee, Stanley G. Rockson, Ed., *Lymphedema: A Concise Compendium of Theory and Practice*. London: Springer, 2011.
- [6] L. B. Mostaço-Guidolin *et al.*, “Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 2190, Dec. 2013.
- [7] V. A. Yudin and I. D. Savkin, “Treatment of lymphedema limb (literature review),” *I.P.Pavlov Russ. Med. Biol. Her.*, vol. 23, no. 4, p. 145, Dec. 2015.
- [8] T. F. O’Donnell, J. C. Rasmussen, and E. M. Seveck-Muraca, “New diagnostic modalities in the evaluation of lymphedema,” *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.*, vol. 5, no. 2, pp. 261–273, Mar. 2017.
- [9] J. B. Kinmonth, “Lymphangiography in man; a method of outlining lymphatic trunks at operation.,” *Clin. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 13–20, Feb. 1952.
- [10] A. I. Sherman and M. Ter-Pogossian, “Lymph-node concentration of radioactive colloidal gold following interstitial injection.,” *Cancer*, vol. 6, no. 6, pp. 1238–40, Nov. 1953.
- [11] R. A. Cambria, P. Gloviczki, J. M. Naessens, and H. W. Wahner, “Noninvasive evaluation of the lymphatic system with lymphoscintigraphy: A prospective, semiquantitative analysis in 386 extremities,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 18, no. 5, pp. 773–782, Nov. 1993.
- [12] International Society of Lymphology, “The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema. Consensus document of the International Society of Lymphology.,” *Lymphology*, vol. 36, no. 2, pp. 84–91, Jun. 2003.
- [13] N. Hadjis, D. Carr, L. Banks, and J. Pflug, “The role of CT in the diagnosis of primary lymphedema of the lower limb,” *Am. J. Roentgenol.*, vol. 144, no. 2, pp. 361–364, Feb. 1985.
- [14] A. P. Sander, N. M. Hajer, K. Hemenway, and A. C. Miller, “Upper-extremity volume measurements in women with lymphedema: a comparison of measurements obtained via water displacement with geometrically determined volume.,” *Phys. Ther.*, vol. 82, no. 12, pp. 1201–12, Dec. 2002.
- [15] B. M. O’Brien, P. J. Sykes, G. N. Threlfall, and F. S. C. Browning, “Microlymphaticovenous

- anastomoses for obstructive lymphedema,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 60, no. 2, pp. 197–211, Aug. 1977.
- [16] K. Rincon, P. Shah, J. Ramella-Roman, and S. Bhansali, “A Review of Engineering Approaches for Lymphedema Detection,” *IEEE Rev. Biomed. Eng.*, vol. 9, pp. 79–90, 2016.
- [17] L. C. Ward, “Early Diagnosis in Latent Phase,” in *Lymphedema*, London: Springer London, 2011, pp. 105–109.
- [18] Н. Г. Луд, Е. А. Шляхтунов, and И. Г. Семенько, *Метод комплексной ультразвуковой оценки вторичной лимфедемы верхней конечности онкологических пациентов*. Витебск, 2009.
- [19] K. G. O. Astrom, S. Abdsaleh, G. C. Brenning, and K. H. Ahlstrom, “MR imaging of primary, secondary, and mixed forms of lymphedema,” *Acta radiol.*, vol. 42, no. 4, pp. 409–416, Jul. 2001.
- [20] T. Deltombe *et al.*, “Reliability and limits of agreement of circumferential, water displacement, and optoelectronic volumetry in the measurement of upper limb lymphedema,” *Lymphology*, vol. 40, no. 1, pp. 26–34, Mar. 2007.
- [21] K. M. Patel, O. Manrique, M. Sosin, M. A. Hashmi, P. Poysophon, and R. Henderson, “Lymphatic mapping and lymphedema surgery in the breast cancer patient,” *Gland Surg.*, vol. 4, no. 3, pp. 244–56, Jun. 2015.
- [22] N. Unno *et al.*, “Quantitative Lymph Imaging for Assessment of Lymph Function using Indocyanine Green Fluorescence Lymphography,” *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 36, no. 2, pp. 230–236, Aug. 2008.
- [23] H. Brorson, H. Svensson, K. Norrgren, and O. Thorsson, “Liposuction reduces arm lymphedema without significantly altering the already impaired lymph transport,” *Lymphology*, vol. 31, no. 4, pp. 156–72, Dec. 1998.
- [24] H. Brorson, K. Ohlin, G. Olsson, and M. K. Karlsson, “Breast Cancer-Related Chronic Arm Lymphedema Is Associated with Excess Adipose and Muscle Tissue,” *Lymphat. Res. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 3–10, Mar. 2009.
- [25] A. G. Warren, B. A. Janz, S. A. Slavin, and L. J. Borud, “The Use of Bioimpedance Analysis to Evaluate Lymphedema,” *Ann. Plast. Surg.*, vol. 58, no. 5, pp. 541–543, May 2007.
- [26] S. Berlit *et al.*, “Whole-body bioelectrical impedance analysis in assessing upper-limb lymphedema after breast cancer therapy,” *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 10, pp. 4553–6, Oct. 2013.
- [27] J. M. P. De Godoy, H. J. P. De Godoy, and M. D. F. G. Godoy, “Evaluation of Impedance and Reactance in the Intensive Treatment of Lymphoedema,” *J. Clin. DIAGNOSTIC Res.*, 2019.
- [28] P. Deurenberg, “Limitations of the bioelectrical impedance method for the assessment of body fat in severe obesity,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 64, no. 3, pp. 449S–452S, Sep. 1996.
- [29] P. C. Choudhari and M. S. Panse, “Measurement of Cardiac Output using Bioimpedance Methd,”

- 2013.
- [30] I. V. Gaivoronskiy, G. I. Nichiporuk, I. N. Gaivoronskiy, and N. G. Nichiporuk, “Bioimpedansometry as a method of the component bodystructure assessment (review),” *Vestn. Saint Petersburg Univ. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 365–384, 2017.
- [31] D. Naranjo-Hernández, J. Reina-Tosina, and M. Min, “Fundamentals, Recent Advances, and Future Challenges in Bioimpedance Devices for Healthcare Applications,” *J. Sensors*, vol. 2019, pp. 1–42, Jul. 2019.
- [32] N. Unno *et al.*, “A novel method of measuring human lymphatic pumping using indocyanine green fluorescence lymphography,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 52, no. 4, pp. 946–952, Oct. 2010.
- [33] J. C. Rasmussen, I.-C. Tan, M. V Marshall, C. E. Fife, and E. M. Sevick-Muraca, “Lymphatic imaging in humans with near-infrared fluorescence,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 20, no. 1, pp. 74–82, Feb. 2009.
- [34] O. J. Pallotta, M. van Zanten, M. McEwen, L. Burrow, J. Beesley, and N. Piller, “Development and validation of a custom made indocyanine green fluorescence lymphatic vessel imager,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 6, p. 066003, Jun. 2015.
- [35] M. R. Greives, M. B. Aldrich, E. M. Sevick-Muraca, and J. C. Rasmussen, “Near-Infrared Fluorescence Lymphatic Imaging of a Toddler With Congenital Lymphedema,” *Pediatrics*, vol. 139, no. 4, Apr. 2017.
- [36] X. Wu, S. Zhuo, J. Chen, and N. Liu, “Real-time in vivo imaging collagen in lymphedematous skin using multiphoton microscopy,” *Scanning*, vol. 33, no. 6, pp. 463–467, Nov. 2011.
- [37] Z. Topping, G., Malda, J., Dawson, R., & Upton, “Development and Characterisation of Human Skin Equivalent and Their Potential Application as a Burn Wound Model,” *Prim. Intent. Aust. J. Wound Manag.*, vol. 14, no. 1, 2006.
- [38] C. Oostendorp *et al.*, “Visualisation of newly synthesised collagen in vitro and in vivo,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 18780, May 2016.
- [39] Р. П. Самусев and В. Я. Липченко, *Атлас анатомии человека*. 2002.
- [40] А. М. Чернух and Е. П. Фролов, *Кожа (строение, функция, общая патология и терапия)*. Медицина, 1982.
- [41] В. В. Тучин, *Оптика биологических тканей. Методы рассеяния света в медицинской диагностике*. Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2012.
- [42] В. В. Тучин, *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях*. Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2010.
- [43] М. Ю. Кириллин, А. В. Приезжев, and Р. А. Мюллерюля, “Роль многократного рассеяния при формировании ОКТ-изображений кожи,” *Квантовая электроника*, vol. 38, no. 6, pp. 570–575, 2008.

- [44] D. Roop, “Defects in the Barrier,” *Science* (80-. ), vol. 267, no. 5197, pp. 474–475, Jan. 1995.
- [45] Z. Nemes and P. M. Steinert, “Bricks and mortar of the epidermal barrier,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 31, no. 1, pp. 5–19, Mar. 1999.
- [46] О. Д. Мяделец, *Клеточные механизмы барьерно-защитных функций кожи и их нарушения при кожных заболеваниях*. Витебск, 2000.
- [47] Ratner B., *Biomaterials Science 3rd Edition*. Academic Press, 2012.
- [48] C. Czekalla, K. H. Schönborn, J. Lademann, and M. C. Meinke, “Noninvasive Determination of Epidermal and Stratum Corneum Thickness in vivo Using Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography: Impact of Body Area, Age, and Gender,” *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 32, no. 3, pp. 142–150, 2019.
- [49] О. Д. Мяделец and В. П. Адаскевич, *Функциональная морфология и общая патология кожи: монография*. Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 1997.
- [50] K. C. Madison, “Barrier Function of the Skin: ‘La Raison d’Être’ of the Epidermis,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 121, no. 2, pp. 231–241, Aug. 2003.
- [51] H. Yousef, M. Alhajj, and S. Sharma, *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. 2022.
- [52] Новиков, Д.К., *Медицинская иммунология*. Витебск, 2002.
- [53] Н. Н. Козлова and В. Д. Прокопенко, “Кожа как иммунный орган,” *Иммунопатология, аллергология, инфектология*, no. 4, pp. 34–40, 2006.
- [54] А. А. Заварзин, *Основы сравнительной гистологии*. Издательство Ленинградского университета, 1985.
- [55] Т. Н. Кичигина, В. Н. Грушин, И. С. Беликова, and О. Д. Мяделец, “Меланоциты: строение, функции, методы выявления, роль в кожной патологии,” *Вестник ВГМУ*, vol. 6, no. 4, 2007.
- [56] A. Desmouliere, I. A. Darby, B. Laverdet, and F. Bonté, “Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing,” *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, p. 301, Nov. 2014.
- [57] B. P., “Wound healing and the role of fibroblasts,” *J. Wound Care*, vol. 22, no. 8, pp. 407–412, Aug. 2013.
- [58] M. Hesketh, K. B. Sahin, Z. E. West, and R. Z. Murray, “Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 7, p. 1545, Jul. 2017.
- [59] S. McDougall, J. Dallon, J. Sherratt, and P. Maini, “Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 364, no. 1843, pp. 1385–1405, Jun. 2006.
- [60] S. Werner, T. Krieg, and H. Smola, “Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, no. 5, pp. 998–1008, May 2007.
- [61] D. T. Ploeger, N. A. Hosper, M. Schipper, J. A. Koerts, S. de Rond, and R. A. Bank, “Cell

- plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 11, no. 1, p. 29, 2013.
- [62] H. E. desJardins-Park, D. S. Foster, and M. T. Longaker, “Fibroblasts and wound healing: an update,” *Regen. Med.*, vol. 13, no. 5, pp. 491–495, Jul. 2018.
- [63] B. Hinz, “Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, no. 3, pp. 526–537, Mar. 2007.
- [64] I. A. Shurygina, “Fibroblasts and their role in the development of connective tissue,” *Sib. Med. J.*, vol. 110, no. 3, pp. 8–12, 2012.
- [65] M. Zeisberg, F. Strutz, and G. A. Müller, “Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis,” *J. Nephrol.*, vol. 13 Suppl 3, pp. S111-20.
- [66] R. Abe, S. C. Donnelly, T. Peng, R. Bucala, and C. N. Metz, “Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 12, pp. 7556–7562, Jun. 2001.
- [67] M. Aumailley *et al.*, “A simplified laminin nomenclature,” *Matrix Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 326–332, Aug. 2005.
- [68] R. A. Clark, “Fibronectin Matrix Deposition and Fibronectin Receptor Expression in Healing and Normal Skin,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 94, no. 6, pp. s128–s134, Jun. 1990.
- [69] Y. V. Kistenev, D. A. Vrazhnov, V. V. Nikolaev, E. A. Sandykova, and N. A. Krivova, “Analysis of Collagen Spatial Structure Using Multiphoton Microscopy and Machine Learning Methods,” *Biochem.*, vol. 84, pp. 108–123, 2019.
- [70] R. A. Reilkoff, R. Bucala, and E. L. Herzog, “Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 6, pp. 427–435, Jun. 2011.
- [71] A. B. Shekhter and Z. P. Milovanova, “[Fibroblast-fibroblast: The ultrastructural mechanisms of resorption of collagen fibers in involution of the connective tissue].,” *Arkh. Patol.*, vol. 37, no. 3, pp. 13–9, 1975.
- [72] B. Hinz, “The role of myofibroblasts in wound healing,” *Curr. Res. Transl. Med.*, vol. 64, no. 4, pp. 171–177, Oct. 2016.
- [73] A. A. Zavarzin, *Course in Histology and Microscopic Anatomy*. 1939.
- [74] R. S. Mahla *et al.*, “NIX-mediated mitophagy regulate metabolic reprogramming in phagocytic cells during mycobacterial infection,” *Tuberculosis*, vol. 126, p. 102046, Jan. 2021.
- [75] S. M. Janeway C, Travers P, Walport M, *Immunobiology (5th ed.)*. New York and London: Garland Science, 2001.
- [76] D. Maton *et al.*, *Human Biology and Health*. New Jersey: Englewood Cliffs, 1997.
- [77] S. K. Yoo, T. W. Starnes, Q. Deng, and A. Huttenlocher, “Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo.,” *Nature*, vol. 480, no. 7375, pp. 109–12, Nov. 2011.

- [78] T. G. Uhm, B. S. Kim, and I. Y. Chung, “Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma.,” *Allergy. Asthma Immunol. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 68–79, Mar. 2012.
- [79] K. Mukai and S. Galli, “Basophils,” in *eLS*, Wiley, 2013.
- [80] P. B. Gahan, B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular biology of the cell (4th edn)*. Garland Science, 2002.
- [81] T. L. Troy and S. N. Thennadil, “Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 6, no. 2, p. 167, 2001.
- [82] R. R. Anderson and J. A. Parrish, “Optical Properties of Human Skin,” in *The Science of Photomedicine*, Boston, MA: Springer US, 1982, pp. 147–194.
- [83] J. A. McGrath, R. A. J. Eady, and F. M. Pope, “Anatomy and Organization of Human Skin,” in *Rook’s Textbook of Dermatology*, Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, Inc., pp. 45–128.
- [84] E. Salomatina, B. Jiang, J. Novak, and A. N. Yaroslavsky, “Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 11, no. 6, p. 064026, 2006.
- [85] D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, “Recent progress in tissue optical clearing,” *Laser Photon. Rev.*, vol. 7, no. 5, pp. 732–757, Sep. 2013.
- [86] К. Борен and Д. Хафмен, *Поглощение и рассеяние света малыми частицами*. Мир, 1986.
- [87] R. Graaff *et al.*, “Reduced light-scattering properties for mixtures of spherical particles: a simple approximation derived from Mie calculations,” *Appl. Opt.*, vol. 31, no. 10, p. 1370, Apr. 1992.
- [88] T. Collier, M. Follen, A. Malpica, and R. Richards-Kortum, “Sources of scattering in cervical tissue: determination of the scattering coefficient by confocal microscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 44, no. 11, p. 2072, Apr. 2005.
- [89] G. Lask, S. Eckhouse, M. Slatkine, A. Waldman, M. Kreindel, and V. Gottfried, “The role of laser and intense light sources in photo-epilation: a comparative evaluation,” *J. Cutan. Laser Ther.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–13, Jan. 1999.
- [90] H. Ou-Yang, G. Stamatias, and N. Kollias, “Spectral Responses of Melanin to Ultraviolet A Irradiation,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 122, no. 2, pp. 492–496, Feb. 2004.
- [91] Л. В. Долгушина, В. В. Дрёмин, А. В. Дунаев, Е. А. Жеребцов, and К. В. Подмастерьев, “Анализ вклада рассеяния и поглощения в общее затухание сигналов в лазерной доплеровской флоуметрии при различном содержании меланина,” *Биотехносфера*, vol. 6, no. 42, 2015.
- [92] M. E. Darvin, M. C. Meinke, W. Sterry, and J. Lademann, “Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, p.

- 061230, Feb. 2013.
- [93] Y. Masuda, Y. Ogura, Y. Inagaki, T. Yasui, and Y. Aizu, “Analysis of the influence of collagen fibres in the dermis on skin optical reflectance by Monte Carlo simulation in a nine-layered skin model,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 24, no. 2, pp. 248–255, May 2018.
- [94] Ю. М. Климов, В. С. Майоров, and М. В. Хорошев, *Взаимодействие лазерного излучения с веществом*. Москва, 2014.
- [95] L. A. Sordillo, Y. Pu, S. Pratavieira, Y. Budansky, and R. R. Alfano, “Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 19, no. 5, p. 056004, May 2014.
- [96] И. В. Турчин, “Методы оптической биомедицинской визуализации: от субклеточных структур до тканей и органов,” *Успехи физических наук*, vol. 186, no. 5, 2016.
- [97] Т. М. Печень and А. М. Прудник, “Моделирование процесса взаимодействия электромагнитной волны оптического диапазона с кожей человека,” *Доклады БГУИР*, vol. 1, no. 87, 2015.
- [98] Y. M. Proshina, N. A. Razumikhina, I. L. Maksimova, and V. V. Tuchin, “Reflectance of immersed human skin: in-vivo measurements,” 1999, p. 350.
- [99] G. J. Tearney, M. E. Brezinski, B. E. Bouma, M. R. Hee, J. F. Southern, and J. G. Fujimoto, “Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography,” *Opt. Lett.*, vol. 20, no. 21, p. 2258, Nov. 1995.
- [100] A. Knüttel and M. Boehlau-Godau, “Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 5, no. 1, p. 83, 2000.
- [101] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, and X.-H. Hu, “Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, no. 6, pp. 1479–1489, Mar. 2006.
- [102] G. Roggan, A., Dorschel, K., Minet, O., Wolff, D., Muller, “The optical properties of biological tissue in the near infrared wavelength range – review and measurements,” *Laser-Induced Interstitial Thermother. Inst. Ser. Is13*, no. October, p. 564, 1995.
- [103] T. P. Sullivan, W. H. Eaglstein, S. C. Davis, and P. Mertz, “The pig as a model for human wound healing,” *Wound Repair Regen.*, vol. 9, no. 2, pp. 66–76, Mar. 2001.
- [104] M. E. Darvin *et al.*, “Comparison of in vivo and ex vivo laser scanning microscopy and multiphoton tomography application for human and porcine skin imaging,” *Quantum Electron.*, vol. 44, no. 7, pp. 646–651, Jul. 2014.
- [105] D. Subrtová, “[Ultrastructure of the epidermis in laboratory rats under normal conditions and after percutaneous administration of an organophosphate].,” *Sb. Ved. Pr. Lek. Fak. Karlovy Univerzity*



- Hradci Kralove. Suppl.*, vol. 32, no. 3, pp. 221–312, 1989.
- [106] G. Parker and C. Picut, Eds., *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. Academic Press, 2016.
- [107] T. A. Eggleston, W. P. Roach, M. A. Mitchell, K. Smith, D. Oler, and T. E. Johnson, “Comparison of two porcine (*Sus scrofa domestica*) skin models for in vivo near-infrared laser exposure.,” *Comp. Med.*, vol. 50, no. 4, pp. 391–7, Aug. 2000.
- [108] P. Avci *et al.*, “Animal models of skin disease for drug discovery,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 8, no. 3, pp. 331–355, Mar. 2013.
- [109] D. Lin, T.-H. Chun, and L. Kang, “Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 119, pp. 8–16, Nov. 2016.
- [110] O. G. Andriotis *et al.*, “Structure–mechanics relationships of collagen fibrils in the osteogenesis imperfecta mouse model,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 12, no. 111, p. 20150701, Oct. 2015.
- [111] Г. В. Симоненко and В. В. Тучин, *Основные сведения о строении различных типов биотканей (дополнительные сведения из анатомии человека)*. 2007.
- [112] Т. И. Грушина, *Реабилитация в онкологии: физиотерапия*. 2006.
- [113] O. Kapuler, B. Selskaya, A. Galeeva, and F. Kamilov, “Metabolism of collagen fibers on the background of age related changes,” *Vrach*, vol. 8, p. 6469, 2015.
- [114] K. Gelse, “Collagens—structure, function, and biosynthesis,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 12, pp. 1531–1546, Nov. 2003.
- [115] V. V. Tuchin, “<title>Controlling of tissue optical properties</title>,” 2000, pp. 30–53.
- [116] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, Y. P. Sinichkin, V. I. Kochubey, N. A. Lakodina, and V. V. Tuchin, “Glucose and Mannitol Diffusion in Human Dura Mater,” *Biophys. J.*, vol. 85, no. 5, pp. 3310–3318, Nov. 2003.
- [117] F. Palombo *et al.*, “Biomechanics of fibrous proteins of the extracellular matrix studied by Brillouin scattering,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 11, no. 101, p. 20140739, Dec. 2014.
- [118] D. E. Freund, R. L. McCally, and R. A. Farrell, “Effects of fibril orientations on light scattering in the cornea,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 3, no. 11, p. 1970, Nov. 1986.
- [119] I. S. Saidi, S. L. Jacques, and F. K. Tittel, “Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin,” *Appl. Opt.*, vol. 34, no. 31, p. 7410, Nov. 1995.
- [120] D. Arifler, I. Pavlova, A. Gillenwater, and R. Richards-Kortum, “Light Scattering from Collagen Fiber Networks: Micro-Optical Properties of Normal and Neoplastic Stroma,” *Biophys. J.*, vol. 92, no. 9, pp. 3260–3274, May 2007.
- [121] S. Roth and I. Freund, “Second harmonic generation in collagen,” *J. Chem. Phys.*, vol. 70, no. 4, pp. 1637–1643, Feb. 1979.
- [122] D. Dumas *et al.*, “Non-Invasive Second Harmonic Generation (SHG) in Macroscopy (MacroSHG) as Bio-Diagnosis to Image Collagen Network Organization in Extracellular

- Matrix,” *Engineering*, vol. 06, no. 08, pp. 485–490, 2014.
- [123] “Данные взяты из базы Uniprot для эластина человека <https://www.uniprot.org/uniprot/P15502>.”
- [124] Т. П. Вавилова, “Биохимия тканей и жидкостей полостей рта: учебное пособие,” 2008.
- [125] M. Yamauchi, Y. Taga, S. Hattori, M. Shiiba, and M. Terajima, “Analysis of collagen and elastin cross-links,” 2018, pp. 115–132.
- [126] H. Vindin, S. M. Mithieux, and A. S. Weiss, “Elastin architecture,” *Matrix Biol.*, vol. 84, pp. 4–16, 2019.
- [127] X. Liu *et al.*, “Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein,” *Nat. Genet.*, vol. 36, no. 2, pp. 178–82, Feb. 2004.
- [128] A. I. Lansing, T. B. Rosenthal, M. Alex, and E. W. Dempsey, “The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy,” *Anat. Rec.*, vol. 114, no. 4, pp. 555–575, Dec. 1952.
- [129] N. Petitdidier, “Imaging system for the characterization of skin layers using diffuse reflectance,” *Photonic. Univ. Strasbg.*, vol. 2018STRAD0, no. tel-02180958, 2018.
- [130] H. Shangguan, S. A. Pahl, S. L. Jacques, L. W. Casperson, and K. W. Gregory, “Pressure effects on soft tissues monitored by changes in tissue optical properties,” 1998, p. 366.
- [131] N. Vazquez-Portalatin, A. Alfonso-Garcia, J. C. Liu, L. Marcu, and A. Panitch, “Physical, Biomechanical, and Optical Characterization of Collagen and Elastin Blend Hydrogels,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 48, no. 12, pp. 2924–2935, Dec. 2020.
- [132] C.-L. Tsai, J.-C. Chen, and W.-J. Wang, “Near-infrared Absorption Property of Biological Soft Tissue Constituents,” *J. Med. Biol. Eng.*, vol. 21, pp. 7–14, 2001.
- [133] B. B. Aaron and J. M. Gosline, “Optical properties of single elastin fibres indicate random protein conformation,” *Nature*, vol. 287, no. 5785, pp. 865–867, Oct. 1980.
- [134] J. Aziz *et al.*, “Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin,” *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 29, no. 4, pp. 190–203, 2016.
- [135] J. M. Rutkowski, M. Moya, J. Johannes, J. Goldman, and M. A. Swartz, “Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9,” *Microvasc. Res.*, vol. 72, no. 3, pp. 161–171, Nov. 2006.
- [136] M. J. Weiler, M. T. Cribb, Z. Nepiyushchikh, T. S. Nelson, and J. B. Dixon, “A novel mouse tail lymphedema model for observing lymphatic pump failure during lymphedema development,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 10405, Dec. 2019.
- [137] Y. Lin, D. Louie, A. Ganguly, D. Wu, P. Huang, and S. Liao, “Elastin Shapes Small Molecule Distribution in Lymph Node Conduits,” *J. Immunol.*, vol. 200, no. 9, pp. 3142–3150, May 2018.
- [138] H. E. V De Cock, V. K. Affolter, T. B. Farver, L. Van Brantegem, B. Scheuch, and G. L. Ferraro,

- “Measurement of skin desmosine as an indicator of altered cutaneous elastin in draft horses with chronic progressive lymphedema.” *Lymphat. Res. Biol.*, vol. 4, no. 2, pp. 67–72, 2006.
- [139] K. De Keyser *et al.*, “Genetic parameters for chronic progressive lymphedema in Belgian Draught Horses,” *J. Anim. Breed. Genet.*, vol. 131, no. 6, pp. 522–528, Dec. 2014.
- [140] L. M. Miller and A. Gal, “Cardiovascular System and Lymphatic Vessels,” in *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, Elsevier, 2017, pp. 561-616.e1.
- [141] F. P. Bernardini, R. C. Kersten, L. M. Khouri, M. Moin, D. R. Kulwin, and D. F. Mutasim, “Chronic eyelid lymphedema and acne rosacea,” *Ophthalmology*, vol. 107, no. 12, pp. 2220–2223, Dec. 2000.
- [142] J. Becker, S. Schwoch, C. Zelent, M. Sitte, G. Salinas, and J. Wilting, “Transcriptome Analysis of Hypoxic Lymphatic Endothelial Cells Indicates Their Potential to Contribute to Extracellular Matrix Rearrangement,” *Cells*, vol. 10, no. 5, p. 1008, Apr. 2021.
- [143] A. Szuba, R. Achalu, and S. G. Rockson, “Decongestive lymphatic therapy for patients with breast carcinoma-associated lymphedema,” *Cancer*, vol. 95, no. 11, pp. 2260–2267, Dec. 2002.
- [144] A. N. Bashkatov, E. A. Genina, M. D. Kozintseva, V. I. Kochubei, S. Y. Gorodkov, and V. V. Tuchin, “Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350–2500 nm,” *Opt. Spectrosc.*, vol. 120, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2016.
- [145] M. F. Yang, V. V. Tuchin, and A. N. Yaroslavsky, “Principles of Light-Skin Interactions,” in *Light-Based Therapies for Skin of Color*, London: Springer London, 2009, pp. 1–44.
- [146] В. В. Дуденкова, М. В. Ширманова, М. М. Лукина, Ф. И. Фельдштейн, А. Виткин, and Е. . Загайнова, “Оценка структуры и состояния коллагена по сигналу генерации второй гармоники,” *Успехи биологической химии*, vol. 59, pp. 181–218, 2019.
- [147] A. Sdobnov, M. E. Darvin, J. Lademann, and V. Tuchin, “A comparative study of ex vivo skin optical clearing using two-photon microscopy,” *J. Biophotonics*, vol. 10, no. 9, pp. 1115–1123, Sep. 2017.
- [148] K. A. Ross *et al.*, “Comparison of Three Methods to Quantify Repair Cartilage Collagen Orientation,” *Cartilage*, vol. 4, no. 2, pp. 111–120, 2013.
- [149] A. A. Bogdanov and M. L. Mazzanti, “Fluorescent Macromolecular Sensors of Enzymatic Activity for In Vivo Imaging,” 2013, pp. 349–387.
- [150] K. König, R. Bückle, M. Weinigel, P. Elsner, and M. Kaatz, “Clinical multiphoton tomography and clinical two-photon microendoscopy,” 2009, p. 718319.
- [151] A. Zoumi, X. Lu, G. S. Kassab, and B. J. Tromberg, “Imaging Coronary Artery Microstructure Using Second-Harmonic and Two-Photon Fluorescence Microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 87, no. 4, pp. 2778–2786, Oct. 2004.
- [152] H.-W. Wang, V. Simianu, M. J. Locker, M. Sturek, and J.-X. Cheng, “Imaging arterial cells,

- atherosclerosis, and restenosis by multimodal nonlinear optical microscopy,” 2008, p. 68600W.
- [153] E. Ban, C. Cavinato, and J. D. Humphrey, “Differential propensity of dissection along the aorta,” *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 20, no. 3, pp. 895–907, Jun. 2021.
- [154] V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood*, vol. PM154. 2006.
- [155] J.-Y. Tseng *et al.*, “Multiphoton spectral microscopy for imaging and quantification of tissue glycation.,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 2, no. 2, pp. 218–30, Dec. 2010.
- [156] S. Huang, A. A. Heikal, and W. W. Webb, “Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein,” *Biophys. J.*, 2002.
- [157] C. Y. Park, C. M. Marando, J. A. Liao, J. K. Lee, J. Kwon, and R. S. Chuck, “Details of the Collagen and Elastin Architecture in the Human Limbal Conjunctiva, Tenon’s Capsule and Sclera Revealed by Two-Photon Excited Fluorescence Microscopy,” *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 57, no. 13, p. 5602, Oct. 2016.
- [158] R. Ambekar, T.-Y. Lau, M. Walsh, R. Bhargava, and K. C. Toussaint, “Quantifying collagen structure in breast biopsies using second-harmonic generation imaging.,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 3, no. 9, pp. 2021–35, Sep. 2012.
- [159] A. Golaraei *et al.*, “Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 7, no. 10, p. 4054, Oct. 2016.
- [160] G. Cox and E. Kable, “Second-Harmonic Imaging of Collagen,” 2006, pp. 15–35.
- [161] X. Chen, O. Nadiarynkh, S. Plotnikov, and P. J. Campagnola, “Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure,” *Nat. Protoc.*, vol. 7, no. 4, pp. 654–669, Apr. 2012.
- [162] K. Tilbury and P. J. Campagnola, “Applications of Second-Harmonic Generation Imaging Microscopy in Ovarian and Breast Cancer,” *Perspect. Medicin. Chem.*, vol. 7, p. PMC.S13214, Jan. 2015.
- [163] W. Becker, A. Bergmann, G. Biscotti, and C. Biskup, “Fluorescence Lifetime Imaging by Multi-Detector TCSPC,” in *Biomedical Topical Meeting*, 2004, p. WD1.
- [164] S. Trautmann, V. Buschmann, S. Orthaus, F. Koberling, U. Ortmann, and R. Erdmann, “Fluorescence Lifetime Imaging ( FLIM ) in Confocal Microscopy Applications : An Overview,” 2014.
- [165] В. И. Щеславский, М. В. Ширманова, А. Ельцов, and В. Беккер, “Люминесцентная микроскопия на основе многопараметрического время-коррелированного счета фотонов,” *Успехи биологической химии*, vol. 59, pp. 103–138, 2019.
- [166] V. Vishwanath, K. E. Frank, C. A. Elmets, P. J. Dauchot, and V. M. Monnier, “Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus. Correlation with long-term complications,” *Diabetes*, vol. 35,

- no. 8, pp. 916–921, 1986.
- [167] K. Gao and D. D. Li, “Estimating fluorescence lifetimes using extended Kalman filter,” *Electron. Lett.*, vol. 53, no. 15, pp. 1027–1029, Jul. 2017.
- [168] P. Pande and J. A. Jo, “Automated Analysis of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) Data Based on the Laguerre Deconvolution Method,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 58, no. 1, pp. 172–181, Jan. 2011.
- [169] K. König *et al.*, “Applications of multiphoton tomographs and femtosecond laser nanoprocessing microscopes in drug delivery research,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 4–5, pp. 388–404, Apr. 2011.
- [170] E. A. Shirshin, Y. I. Gurfinkel, A. V. Priezzhev, V. V. Fadeev, J. Lademann, and M. E. Darwin, “Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 1171, Dec. 2017.
- [171] Y. V. Kistenev *et al.*, “Differential diagnostics of paraffin-embedded tissues by IR-THz spectroscopy and machine learning,” in *Tissue Optics and Photonics*, 2020, p. 20.
- [172] M. G. Martinez, A. J. Bullock, S. MacNeil, and I. U. Rehman, “Characterisation of structural changes in collagen with Raman spectroscopy,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 54, no. 6, pp. 509–542, Jul. 2019.
- [173] R. W. Terhune, P. D. Maker, and C. M. Savage, “Measurements of Nonlinear Light Scattering,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 14, no. 17, pp. 681–684, Apr. 1965.
- [174] M. D. Duncan, J. Reintjes, and T. J. Manuccia, “Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope,” *Opt. Lett.*, vol. 7, no. 8, p. 350, Aug. 1982.
- [175] К.Лай, “Неразрушающее молекулярное профилирование кожи,” vol. 3, 2013.
- [176] P. Matousek and M. Morris, Eds., *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*. New York: Springer Science & Business Media, 2010.
- [177] J.-X. Cheng and X. S. Xie, “Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine,” *Science (80-. )*, vol. 350, no. 6264, pp. aaa8870–aaa8870, Nov. 2015.
- [178] C. M. Kielty, M. J. Sherratt, and C. A. Shuttleworth, “Elastic fibres,” *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 14, pp. 2817–28, Jul. 2002.
- [179] G. I. Petro, L. Sona, V. V. Yakovlev, and V. I. Shcheslavskiy, “CARS microscopy studies of collagen transformation,” *Multiphot. Microsc. Biomed. Sci. V*, vol. 5700, 2005.
- [180] A. Enejder, C. Brackmann, C. Axäng, M. Åkeson, and M. Pilon, “CARS microscopy for the monitoring of lipid storage in *C. elegans*,” 2008, p. 686012.
- [181] J.-X. Cheng, Y. K. Jia, G. Zheng, and X. S. Xie, “Laser-Scanning Coherent Anti-Stokes Raman

- Scattering Microscopy and Applications to Cell Biology,” *Biophys. J.*, vol. 83, no. 1, pp. 502–509, Jul. 2002.
- [182] J. Mansfield *et al.*, “The elastin network: its relationship with collagen and cells in articular cartilage as visualized by multiphoton microscopy,” *J. Anat.*, vol. 215, no. 6, pp. 682–691, Dec. 2009.
- [183] A. Depeursinge, J. Fageot, and O. S. Al-Kadi, “Fundamentals of Texture Processing for Biomedical Image Analysis,” in *Biomedical Texture Analysis*, Elsevier, 2017, pp. 1–27.
- [184] N. Kanopoulos, N. Vasanthavada, and R. L. Baker, “Design of an image edge detection filter using the Sobel operator,” *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 23, no. 2, pp. 358–367, Apr. 1988.
- [185] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, *Digital Image Processing*, 4th ed. 2018.
- [186] M. Raman and H. Aggarwal, “Study and comparison of various image edge detection techniques,” *Int. J. Image Process.*, vol. 3, no. 1, 2009.
- [187] T. Lindeberg, “Edge Detection and Ridge Detection with Automatic Scale Selection,” *Int. J. Comput. Vis.*, vol. 30, pp. 117–156, 1998.
- [188] J. Canny, “A Computational Approach to Edge Detection,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. PAMI-8, no. 6, pp. 679–698, Nov. 1986.
- [189] P. Soille, “Morphological gradients,” *J. Electron. Imaging*, vol. 2, no. 4, p. 326, Oct. 1993.
- [190] C. Bayan, J. M. Levitt, E. Miller, D. Kaplan, and I. Georgakoudi, “Fully automated, quantitative, noninvasive assessment of collagen fiber content and organization in thick collagen gels,” *J. Appl. Phys.*, vol. 105, no. 10, p. 102042, May 2009.
- [191] B. Pourdeyhimi, R. Dent, and H. Davis, “Measuring Fiber Orientation in Nonwovens Part III: Fourier Transform,” *Text. Res. J.*, vol. 67, no. 2, pp. 143–151, Feb. 1997.
- [192] M. Tunák, J. Antoch, J. Kula, and J. Chvojka, “Estimation of fiber system orientation for nonwoven and nanofibrous layers: local approach based on image analysis,” *Text. Res. J.*, vol. 84, no. 9, pp. 989–1006, Jun. 2014.
- [193] U. Grenander, R. O. Duda, and P. E. Hart, “Pattern Classification and Scene Analysis,” *J. Am. Stat. Assoc.*, vol. 69, no. 347, p. 829, Sep. 1974.
- [194] Ş. Öztürk and B. Akdemir, “Comparison of Edge Detection Algorithms for Texture Analysis on Glass Production,” *Procedia - Soc. Behav. Sci.*, vol. 195, pp. 2675–2682, Jul. 2015.
- [195] R. M. Haralick, S. R. Sternberg, and X. Zhuang, “Image Analysis Using Mathematical Morphology,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. PAMI-9, no. 4, pp. 532–550, Jul. 1987.
- [196] S. R. Nayak, R. Padhy, and J. Mishra, “Texture analysis methods: A brief review,” *J. Adv. Res. Dyn. Control Syst.*, vol. 9, no. 11, pp. 46–52, 2017.
- [197] N. D. Fletcher and A. N. Evans, “Texture Segmentation Using Area Morphology Local

- Granulometries,” in *Mathematical Morphology: 40 Years On*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 367–376.
- [198] D. G. Lowe, “Object recognition from local scale-invariant features,” in *Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision*, 1999, pp. 1150–1157 vol.2.
- [199] N. Dalal and B. Triggs, “Histograms of Oriented Gradients for Human Detection,” in *2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR’05)*, vol. 1, pp. 886–893.
- [200] J. Huang, S. R. Kumar, M. Mitra, W. J. Zhu, and R. Zabih, “Image indexing using color correlograms,” *Proc. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, pp. 762–768, 1997.
- [201] Zhenhua Guo, Lei Zhang, and D. Zhang, “A Completed Modeling of Local Binary Pattern Operator for Texture Classification,” *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 19, no. 6, pp. 1657–1663, Jun. 2010.
- [202] J. Bigun, G. H. Granlund, and J. Wiklund, “Multidimensional orientation estimation with applications to texture analysis and optical flow,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 13, no. 8, pp. 775–790, 1991.
- [203] Q. Kemao, “Two-dimensional windowed Fourier transform for fringe pattern analysis: Principles, applications and implementations,” *Opt. Lasers Eng.*, vol. 45, no. 2, pp. 304–317, Feb. 2007.
- [204] S. Arivazhagan and L. Ganesan, “Texture classification using wavelet transform,” *Pattern Recognit. Lett.*, vol. 24, no. 9–10, pp. 1513–1521, Jun. 2003.
- [205] T. Chang and C.-C. J. Kuo, “Texture analysis and classification with tree-structured wavelet transform,” *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 2, no. 4, pp. 429–441, 1993.
- [206] D. L. Donoho and X. Huo, “<title>Combined image representation using edgelets and wavelets</title>,” 1999, pp. 468–476.
- [207] P. Khobragade, J. Fan, F. Rucich, D. J. Crotty, and T. G. Schmidt, “Application of fractal dimension for quantifying noise texture in computed tomography images,” *Med. Phys.*, vol. 45, no. 8, pp. 3563–3573, Aug. 2018.
- [208] A. Depeursinge, O. S. Al-Kadi, and J. R. Mitchell, *Biomedical Texture Analysis: Fundamentals, Tools and Challenges*. Academic Press, 2017.
- [209] D. Sankar and T. Thomas, “Fractal features based on differential box counting method for the categorization of digital mammograms,” *Int. J. Comput. Inf. Syst. Ind. Manag. Appl.*, vol. 2, no. 2010, pp. 011–019, 2010.
- [210] Z. Liu *et al.*, “Automated quantification of three-dimensional organization of fiber-like structures in biological tissues,” *Biomaterials*, vol. 116, pp. 34–47, Feb. 2017.
- [211] M. Bevk and I. Kononenko, “A statistical approach to texture description of medical images: a

- preliminary study,” in *Proceedings of 15th IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS 2002)*, pp. 239–244.
- [212] L. Nanni, S. Brahmam, S. Ghidoni, E. Menegatti, and T. Barrier, “Different Approaches for Extracting Information from the Co-Occurrence Matrix,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, p. e83554, Dec. 2013.
- [213] K. Pearson, “On lines and planes of closest fit to systems of points in space,” *Philos Mag A.*, vol. 6, pp. 559–572, 1901.
- [214] H. Hotelling, “Analysis of a complex of statistical variables into principal components,” *Educ Psychol*, vol. 25, pp. 417–441, 1933.
- [215] S. Mishra *et al.*, “Principal Component Analysis,” *Int. J. Livest. Res.*, p. 1, 2017.
- [216] И. В. Борисова, *Цифровые методы обработки информации*. 2014.
- [217] J. Russell, Stuart and P. Norvig, *Artificial Intelligence: A Modern Approach*. 2020.
- [218] C. Cortes and V. Vapnik, “Support-Vector Networks,” *Mach. Learn.*, vol. 20, no. 3, pp. 273–297, 1995.
- [219] Y. V. Kistenev, A. Borisov, and D. Vrazhnov, *Medical Applications of Laser Molecular Imaging and Machine Learning*. 2021.
- [220] Y. Karamavuş and M. Özkan, “Newborn jaundice determination by reflectance spectroscopy using multiple polynomial regression, neural network, and support vector regression,” *Biomed. Signal Process. Control*, vol. 51, pp. 253–263, May 2019.
- [221] W. S. McCulloch and W. Pitts, “A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity,” *Bull. Math. Biophys.*, vol. 5, no. 4, pp. 115–133, Dec. 1943.
- [222] Y. LeCun *et al.*, “Backpropagation Applied to Handwritten Zip Code Recognition,” *Neural Comput.*, vol. 1, no. 4, pp. 541–551, Dec. 1989.
- [223] D. M. Hawkins, “The Problem of Overfitting,” *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 44, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2004.
- [224] S. Boyd and L. Vandenberghe, *Convex Optimization*. Cambridge University Press, 2004.
- [225] D. Feng, F. Chen, and W. Xu, “Efficient Leave-One-Out Strategy for Supervised Feature Selection,” *Tsinghua Sci. Technol.*, vol. 18, no. 6, pp. 629–635, 2013.
- [226] S. Arlot and A. Celisse, “A survey of cross-validation procedures for model selection,” *Stat. Surv.*, vol. 4, no. none, Jan. 2010.
- [227] K. Koenig, “Hybrid multiphoton multimodal tomography of in vivo human skin,” *IntraVital*, vol. 1, no. 1, pp. 11–26, Jul. 2012.
- [228] E. A. Shirshin *et al.*, “Label-Free Multiphoton Microscopy: The Origin of Fluorophores and Capabilities for Analyzing Biochemical Processes,” *Biochem.*, vol. 84, no. S1, pp. 69–88, Jan. 2019.



- [229] Y. Dancik, A. Favre, C. J. Loy, A. V. Zvyagin, and M. S. Roberts, "Use of multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging to investigate skin pigmentation in vivo," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 2, p. 026022, Feb. 2013.
- [230] A. I. Knyaz'kova, A. A. Samarina, V. V. Nikolaev, Y. V. Kistenev, and A. V. Borisov, "Two-Photon Excitation Fluorescence Microscopy of Rat Elastin Fiber In Vivo," *Russ. Phys. J.*, vol. 64, no. 11, pp. 2123–2128, Mar. 2022.
- [231] O. I. Kolenc and K. P. Quinn, "Evaluating Cell Metabolism Through Autofluorescence Imaging of NAD(P)H and FAD," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 30, no. 6, pp. 875–889, Feb. 2019.
- [232] T. S. Blacker *et al.*, "Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, p. 3936, Sep. 2014.
- [233] Q. Yu and A. A. Heikal, "Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 95, no. 1, pp. 46–57, Apr. 2009.
- [234] T. S. Blacker and M. R. Duchon, "Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 100, pp. 53–65, 2016.
- [235] J. Galbán, I. Sanz-Vicente, J. Navarro, and S. de Marcos, "The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review," *Methods Appl. Fluoresc.*, vol. 4, no. 4, p. 042005, Dec. 2016.
- [236] B.-G. WANG, K. KÖNIG, and K.-J. HALBHUBER, "Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research," *J. Microsc.*, vol. 238, no. 1, pp. 1–20, Apr. 2010.
- [237] R. Eichhorn *et al.*, "Early diagnosis of melanotic melanoma based on laser-induced melanin fluorescence," *J. Biomed. Opt.*, vol. 14, no. 3, p. 034033, 2009.
- [238] P. A. A. De Beule *et al.*, "A hyperspectral fluorescence lifetime probe for skin cancer diagnosis," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 78, no. 12, p. 123101, Dec. 2007.
- [239] R. Leenders, M. Kooijman, A. van Hoek, C. Veeger, and A. J. W. G. Visser, "Flavin dynamics in reduced flavodoxins," *Eur. J. Biochem.*, vol. 211, pp. 37–45, 1993.
- [240] M. Y. Berezin and S. Achilefu, "Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 2641–2684, May 2010.
- [241] E. G. Borisova, L. P. Angelova, and E. P. Pavlova, "Endogenous and Exogenous Fluorescence Skin Cancer Diagnostics for Clinical Applications," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 20, no. 2, pp. 211–222, Mar. 2014.
- [242] K. Koenig and I. Riemann, "High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution," *J. Biomed. Opt.*, vol. 8, no. 3, p. 432, 2003.
- [243] J. A. Palero, H. S. de Bruijn, A. van der Ploeg van den Heuvel, H. J. C. M. Sterenborg, and H. C.

- Gerritsen, "Spectrally Resolved Multiphoton Imaging of In Vivo and Excised Mouse Skin Tissues," *Biophys. J.*, vol. 93, no. 3, pp. 992–1007, Aug. 2007.
- [244] C. Li *et al.*, "Imaging leukocyte trafficking in vivo with two-photon-excited endogenous tryptophan fluorescence," *Opt. Express*, vol. 18, no. 2, p. 988, Jan. 2010.
- [245] S. R. Alam *et al.*, "Investigation of Mitochondrial Metabolic Response to Doxorubicin in Prostate Cancer Cells: An NADH, FAD and Tryptophan FLIM Assay," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 10451, Dec. 2017.
- [246] V. Jyothikumar, Y. Sun, and A. Periasamy, "Investigation of tryptophan–NADH interactions in live human cells using three-photon fluorescence lifetime imaging and Förster resonance energy transfer microscopy," *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, p. 060501, Jun. 2013.
- [247] J. T. Vivian and P. R. Callis, "Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins," *Biophys. J.*, vol. 80, no. 5, pp. 2093–2109, May 2001.
- [248] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, and W. W. Webb, "Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 12, pp. 7075–7080, Jun. 2003.
- [249] Q. Wang, J. C. Allen, and H. E. Swaisgood, "Binding of Vitamin D and Cholesterol to  $\beta$ -Lactoglobulin," *J. Dairy Sci.*, vol. 80, no. 6, pp. 1054–1059, Jun. 1997.
- [250] N. Ramanujam, "Fluorescence Spectroscopy of Neoplastic and Non-Neoplastic Tissues," *Neoplasia*, vol. 2, no. 1–2, pp. 89–117, Jan. 2000.
- [251] M. Collini, Barbara Leo, Giancarlo Bal, "Probing protein aggregation by time-resolved fluorescence during  $\beta$ -lactoglobulin crystal growth," *Eur. Biophys. J.*, vol. 31, no. 2, pp. 111–117, May 2002.
- [252] R. Richards-Kortum and E. Sevick-Muraca, "QUANTITATIVE OPTICAL SPECTROSCOPY FOR TISSUE DIAGNOSIS," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 47, no. 1, pp. 555–606, Oct. 1996.
- [253] C. Bueno, P. Pavez, R. Salazar, and M. V. Encinas, "Photophysics and Photochemical Studies of the Vitamin B6 Group and Related Derivatives," *Photochem. Photobiol.*, vol. 86, no. 1, pp. 39–46, Jan. 2010.
- [254] A.-M. Pena, M. Strupler, T. Boulesteix, and M.-C. Schanne-Klein, "Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy," *Opt. Express*, vol. 13, no. 16, p. 6268, 2005.
- [255] A. Ehlers, I. Riemann, M. Stark, and K. König, "Multiphoton fluorescence lifetime imaging of human hair," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 70, no. 2, pp. 154–161, Feb. 2007.
- [256] O. V. Voloshina, E. A. Shirshin, J. Lademann, V. V. Fadeev, and M. E. Darvin, "Fluorescence detection of protein content in house dust: the possible role of keratin," *Indoor Air*, vol. 27, no. 2, pp. 377–385, Mar. 2017.

- [257] E. Dimitrow *et al.*, “Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis,” *Exp. Dermatol.*, vol. 18, no. 6, pp. 509–515, Jun. 2009.
- [258] M. Kaatz, A. Sturm, P. Elsner, K. König, R. Bückle, and M. J. Koehler, “Depth-resolved measurement of the dermal matrix composition by multiphoton laser tomography,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 16, no. 2, pp. 131–136, May 2010.
- [259] A. Chorvatova and D. Chorvat, “Overview of uorescence lifetime imaging and metrology,” in *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging*, CRC Press, 2014, pp. 20–39.
- [260] Y. Liu and J. D. Simon, “Isolation and Biophysical Studies of Natural Eumelanins: Applications of Imaging Technologies and Ultrafast Spectroscopy,” *Pigment Cell Res.*, vol. 16, no. 6, pp. 606–618, Dec. 2003.
- [261] E. R. Gaillard, S. J. Atherton, G. Eldred, and J. Dillon, “PHOTOPHYSICAL STUDIES ON HUMAN RETINAL LIPOFUSCIN,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 61, no. 5, pp. 448–453, May 1995.
- [262] W. L. Rice, D. L. Kaplan, and I. Georgakoudi, “Two-Photon Microscopy for Non-Invasive, Quantitative Monitoring of Stem Cell Differentiation,” *PLoS One*, vol. 5, no. 4, p. e10075, Apr. 2010.
- [263] A. C. Croce and G. Bottiroli, “Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues,” 2017, pp. 15–43.
- [264] C. Chen *et al.*, “In Vivo Near-Infrared Two-Photon Imaging of Amyloid Plaques in Deep Brain of Alzheimer’s Disease Mouse Model,” *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 9, no. 12, pp. 3128–3136, Dec. 2018.
- [265] L. Brancaleon, S. W. Magennis, I. D. W. Samuel, E. Namdas, A. Lesar, and H. Moseley, “Characterization of the photoproducts of protoporphyrin IX bound to human serum albumin and immunoglobulin G,” *Biophys. Chem.*, vol. 109, no. 3, pp. 351–360, Jun. 2004.
- [266] S. D. Zucker, W. Goessling, E. J. Bootle, and C. Sterritt, “Localization of bilirubin in phospholipid bilayers by parallax analysis of fluorescence quenching,” *J. Lipid Res.*, vol. 42, no. 9, pp. 1377–1388, Sep. 2001.
- [267] C. D. Tran and G. S. Beddard, “Excited state properties of bilirubin and its photoproducts using picosecond fluorescence and circularly polarized luminescence spectroscopy,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 678, no. 3, pp. 497–504, Dec. 1981.
- [268] Н. И. Корсунов and Д. А. Торопчин, “Метод классификации изображений на основе кластеризации сложных объектов,” *Научные ведомости БелГУ. Сер. Экономика. Информатика.*, vol. 23, no. 244, pp. 100–104, 2016.
- [269] N. G. Zakharchenko, E. M. Mamatov, D. A. Yatsynyuk, and N. V. Kolos, “Comprehensive

- assessment of image quality with the use of the information criteria of homogeneity,” *Sci. Bull. Belgorod State Univ. Ser. Econ. Comput. Sci.*, vol. 45, no. 1, pp. 184–191, Mar. 2018.
- [270] Ю. . Монич and В. В. Старовойтов, “Оценки качества для анализа цифровых изображений,” *Искусственный интеллект*, vol. 4, no. 4М, pp. 376–386, 2008.
- [271] A. I. Knyazkova, A. A. Samarina, V. V. Nikolaev, Y. V. Kistenev, and A. V. Borisov, “Features two-photon microscopy for analysis fluorescent properties of elastin fibers rats in vivo,” *Izv. Vyssh. uchebnykh Zaved. Fiz.*, no. 11, pp. 128–133, 2021.
- [272] M. A. Digman, V. R. Caiolfa, M. Zamaï, and E. Gratton, “The Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging Analysis,” *Biophys. J.*, vol. 94, no. 2, pp. L14–L16, Jan. 2008.
- [273] L. M. Hirvonen and K. Suhling, “Fast Timing Techniques in FLIM Applications,” *Front. Phys.*, vol. 8, May 2020.
- [274] L. Ryderfors, E. Mukhtar, and L. B.-Å. Johansson, “Two-photon excited fluorescence depolarisation experiments: II. The proper response function for analysing TCSPC data,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 411, no. 1–3, pp. 51–60, Aug. 2005.
- [275] R. Datta, T. M. Heaster, J. T. Sharick, A. A. Gillette, and M. C. Skala, “Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 25, no. 07, p. 1, May 2020.
- [276] W. Becker, *The bh TCSPC handbook*. 2021.
- [277] D. Xiao *et al.*, “Dynamic fluorescence lifetime sensing with CMOS single-photon avalanche diode arrays and deep learning processors,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, no. 6, p. 3450, Jun. 2021.
- [278] W. Becker, Ed., *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*, vol. 111. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [279] A. H. A. Clayton, Q. S. Hanley, and P. J. Verveer, “Graphical representation and multicomponent analysis of single-frequency fluorescence lifetime imaging microscopy data,” *J. Microsc.*, vol. 213, no. 1, pp. 1–5, Jan. 2004.
- [280] Y. V. Kistenev, V. Nikolaev, A. Drozdova, E. Ilyasova, and E. Sandykova, “Improvement of the multiphoton fluorescence microscopy images quality using digital filtration,” in *International Conference on Atomic and Molecular Pulsed Lasers XIII*, 2018, vol. 10614, p. 98.
- [281] J. W. Tukey, “Discussion, Emphasizing the Connection between Analysis of Variance and Spectrum Analysis,” *Technometrics*, vol. 3, no. 2, pp. 191–219, 1961.
- [282] Ю. В. Кистенев, В. В. Николаев, А. В. Борисов, О. Б. Заева, А. И. Князькова, and Н. А. Кривова, “Микроскопия с многофотонным возбуждением для идентификации и оперативного контроля компонентов внеклеточного матрикса тканей организма,” *Журнал технической физики*, vol. 128, no. 6, p. 790, 2020.

- [283] S.-J. Lin *et al.*, “Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 30, no. 17, p. 2275, Sep. 2005.
- [284] S. Springer *et al.*, “Multiphotonic staging of chronic wounds and evaluation of sterile, optical transparent bacterial nanocellulose covering: A diagnostic window into human skin,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 25, no. 1, pp. 68–78, Jan. 2019.
- [285] S. Springer, M. Zieger, A. Böttcher, J. Lademann, and M. Kaatz, “Examination of wound healing after curettage by multiphoton tomography of human skin in vivo,” *Ski. Res. Technol.*, vol. 23, no. 4, pp. 452–458, Nov. 2017.
- [286] E. R. Gonzaga, “Role of UV Light in Photodamage, Skin Aging, and Skin Cancer,” *Am. J. Clin. Dermatol.*, vol. 10, no. Supplement 1, pp. 19–24, 2009.
- [287] K. Sugata *et al.*, “Evaluation of unique elastic aggregates (elastic globes) in normal facial skin by multiphoton laser scanning tomography,” *Eur. J. Dermatology*, vol. 25, no. 2, pp. 138–144, Apr. 2015.
- [288] M. J. Koehler *et al.*, “Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive in vivo scoring of the dermal fibre network,” *Exp. Dermatol.*, vol. 17, no. 6, pp. 519–523, Jun. 2008.
- [289] R. Cicchi, S. Sestini, V. De Giorgi, D. Massi, T. Lotti, and F. S. Pavone, “Nonlinear laser imaging of skin lesions,” *J. Biophotonics*, vol. 1, no. 1, pp. 62–73, Mar. 2008.
- [290] W. Y. Sanchez, C. Obispo, E. Ryan, J. E. Grice, and M. S. Roberts, “Changes in the redox state and endogenous fluorescence of in vivo human skin due to intrinsic and photo-aging, measured by multiphoton tomography with fluorescence lifetime imaging,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 18, no. 6, p. 061217, Nov. 2012.
- [291] J. Adur, H. F. Carvalho, C. L. Cesar, and V. H. Casco, “Nonlinear Microscopy Techniques: Principles and Biomedical Applications,” in *Microscopy and Analysis*, InTech, 2016.
- [292] M. Meinke, C. Nowbary, S. Schanzer, H. Vollert, J. Lademann, and M. Darvin, “Influences of Orally Taken Carotenoid-Rich Curly Kale Extract on Collagen I/Elastin Index of the Skin,” *Nutrients*, vol. 9, no. 7, p. 775, Jul. 2017.
- [293] R. Cicchi *et al.*, “In vivo non-invasive monitoring of collagen remodelling by two-photon microscopy after micro-ablative fractional laser resurfacing,” *J. Biophotonics*, vol. 7, no. 11–12, pp. 914–925, Nov. 2014.
- [294] H.-Y. Tan *et al.*, “Multiphoton fluorescence and second harmonic generation microscopy for imaging infectious keratitis,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, no. 2, p. 024013, 2007.
- [295] T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki, “Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 9, no. 2, p. 259, 2004.

- [296] H. M., A. S., A. Mohammed, and R. Jennane, “Histogram of Oriented Gradients and Texture Features for Bone Texture Characterization,” *Int. J. Comput. Appl.*, vol. 165, no. 3, pp. 23–28, May 2017.
- [297] Y. Ge, Y. Liu, F. Wang, Y. Lai, T. Zhu, and D. Wang, “Texture feature extraction based on histogram of oriented gradient domain texture tendency for tyre pattern retrieval,” in *2017 Eighth International Conference on Intelligent Control and Information Processing (ICICIP)*, 2017, pp. 1–7.
- [298] I. Guyon, “A scaling law for the validation-set training-set size ratio,” *AT&T Bell Lab.*, pp. 1–11, 1997.
- [299] P. L. Tong *et al.*, “A quantitative approach to histopathological dissection of elastin-related disorders using multiphoton microscopy,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 169, no. 4, pp. 869–879, Oct. 2013.
- [300] O. Fritze *et al.*, “Age-Related Changes in the Elastic Tissue of the Human Aorta,” *J. Vasc. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 77–86, 2012.
- [301] J.-C. Pittet, O. Freis, M.-D. Vazquez-Duchêne, G. Périé, and G. Pauly, “Evaluation of Elastin/Collagen Content in Human Dermis in-Vivo by Multiphoton Tomography—Variation with Depth and Correlation with Aging,” *Cosmetics*, vol. 1, no. 3, pp. 211–221, Aug. 2014.
- [302] Y. V. Kistenev *et al.*, “Lymphedema tissue analysis using optical imaging and gradient processing,” in *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*, 2019, vol. 11073.
- [303] D. Kunene and H. Vadapalli, “Better feature acquisition through the use of infrared imaging for human detection systems,” in *Proceedings of the South African Institute of Computer Scientists and Information Technologists on - SAICSIT '17*, 2017, pp. 1–10.
- [304] Y. V. Kistenev, A. V. Shapovalov, D. A. Vrazhnov, and V. V. Nikolaev, “Kalman filtering in the problem of noise reduction in the absorption spectra of exhaled air,” in *22nd International Symposium on Atmospheric and Ocean Optics: Atmospheric Physics*, 2016, vol. 10035, p. 100350A.
- [305] V. V. Nikolaev, O. S. Kurochkina, D. A. Vrazhnov, E. A. Sandykova, and Y. V. Kistenev, “Research on lymphedema by method of high-resolution multiphoton microscopy,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1145, no. 1, p. 012043, Jan. 2019.
- [306] J. Q. Griffith and H. T. Stanton, “Effect of Chlorophyll Derivative upon Experimentally Produced Lymphedema in Rats,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 97, no. 1, pp. 158–159, Jan. 1958.
- [307] M. A. Kanter, S. A. Slavin, and W. Kaplan, “An Experimental Model for Chronic Lymphedema,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 85, no. 4, pp. 573–580, Apr. 1990.
- [308] A. A. Harb *et al.*, “Creation of a Rat Lower Limb Lymphedema Model,” *Ann. Plast. Surg.*, vol.

- 85, no. S1, pp. S129–S134, Jul. 2020.
- [309] T. Sommer, M. Meier, F. Bruns, R. Pabst, G. Breves, and C. Hadamitzky, “Quantification of Lymphedema in a Rat Model by 3D-Active Contour Segmentation by Magnetic Resonance Imaging,” *Lymphat. Res. Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 25–29, Mar. 2012.
- [310] C.-Y. Yang *et al.*, “Developing a Lower Limb Lymphedema Animal Model with Combined Lymphadenectomy and Low-dose Radiation,” *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open*, vol. 2, no. 3, p. e121, Mar. 2014.
- [311] U. Mendez, E. M. Stroup, L. L. Lynch, A. B. Waller, and J. Goldman, “A chronic and latent lymphatic insufficiency follows recovery from acute lymphedema in the rat foreleg,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 303, no. 9, pp. H1107-13, Nov. 2012.
- [312] L. L. Lynch, U. Mendez, A. B. Waller, A. A. Gillette, R. J. Guillory, and J. Goldman, “Fibrosis worsens chronic lymphedema in rodent tissues,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 308, no. 10, pp. H1229–H1236, May 2015.
- [313] I. O. Aydogdu, A. Demir, M. K. Keles, O. Yapici, L. Yildizy, and Y. Demirtas, “Pedicled Vascularized Lymph Node Transfer Treats Lymphedema in Rat Hind Limb: A Simple Experimental Study Design,” *Lymphology*, vol. 50, no. 1, pp. 27–35, 2017.
- [314] P. A. Will *et al.*, “Evidence of stage progression in a novel, validated fluorescence-navigated and microsurgical-assisted secondary lymphedema rodent model,” *PLoS One*, vol. 15, no. 7, p. e0235965, Jul. 2020.
- [315] V. Triacca *et al.*, “Experimental Drainage Device to Reduce Lymphoedema in a Rat Model,” *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 57, no. 6, pp. 859–867, Jun. 2019.
- [316] S. F. Wilson, J. Guarner, A. L. Valme, J. Louis-Charles, T. L. Jones, and D. G. Addiss, “Histopathologic Improvement with Lymphedema Management, Léogâne, Haiti,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 10, no. 11, pp. 1938–1946, Nov. 2004.
- [317] N. Mazumder *et al.*, “Label-Free Non-linear Multimodal Optical Microscopy—Basics, Development, and Applications,” *Front. Phys.*, vol. 7, Oct. 2019.
- [318] Г. Г. Автандилов, *Медицинская морфометрия. Руководство*. М.: Медицина, 1990.
- [319] А. А. Голаев, “Морфофункциональная характеристика стенки и внутриорганных кровеносных сосудов тонкой кишки при моделировании условий ее аутотрансплантации и электромагнитном воздействии (экспериментальное исследование),” Российский университет дружбы народов, 2004.
- [320] V. F. Baytinger *et al.*, “Morphological changes in the skin and subcutaneous tissue during the creation of an experimental model of lymphedema on the hind limb of a white rat,” *Issues Reconstr. Plast. Surg.*, vol. 25, no. 1, pp. 40–52, Mar. 2022.
- [321] А. М. Чернух and И. К. Есипова, “Микроциркуляция в норме и патологии,” *Архив*

- патологии*, vol. 7, pp. 3–15, 1971.
- [322] A. G. Kriger *et al.*, “Epithelioid hemangioma of inferior vena cava,” *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova*, no. 2, p. 82, 2015.
- [323] V. Nikolaev *et al.*, “Estimation of the collagen and elastin condition at lymphedema using multiphoton microscopy,” in *25th International Symposium on Atmospheric and Ocean Optics: Atmospheric Physics*, 2019, p. 177.
- [324] V. V. Nikolaev, O. O. Zakharova, O. O. Kurochkina, E. Sandykova, A. A. Taletskiy, and N. A. Krivova, “Measurement and estimation of the structure of lymphedematous tissue on animal model,” in *Fourth International Conference on Terahertz and Microwave Radiation: Generation, Detection, and Applications*, 2020, p. 67.
- [325] Y. V. Kistenev, V. V. Nikolaev, O. S. Kurochkina, A. V. Borisov, D. A. Vrazhnov, and E. A. Sandykova, “Application of multiphoton imaging and machine learning to lymphedema tissue analysis,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, no. 7, p. 3353, 2019.