

СПЕКТРОСКОПИЯ СПОНТАННОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ ДЛЯ *EX VIVO* ДИАГНОСТИКИ ВНУТРИЧЕРЕПНЫХ ОПУХОЛЕЙ

И.Д. Романишкин¹, Л.Р. Бикмухаметова², Т.А. Савельева^{1,3}, С.А. Горяйнов⁴,
А.В. Косырькова⁴, В.А. Охлопков⁴, Д.А. Гольбин⁴, И.Ю. Полетаева⁴, А.А. Потапов⁴,
В.Б. Лощенов^{1,2,3}

¹Институт общей физики им. А.М.Прохорова Российской академии наук, Москва, Россия

²ООО «БИОСПЕК», Москва, Россия

³Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

⁴НМИЦ нейрохирургии им.ак. Н.Н.Бурденко, Москва, Россия

Резюме

Нейрохирургия внутричерепных опухолей, особенно глиального происхождения, представляет нетривиальную задачу в силу их инфильтративного роста. В последние годы в нейрохирургии активно используются оптические методы интраоперационной навигации, однако один из наиболее широко распространенных подходов, основанный на селективном накоплении опухолью флуоресцентного контрастного вещества (5-АЛК индуцированного протопорфирина IX), не может быть применен для значимой части опухолей вследствие его низкого накопления. Напротив, спектроскопия комбинационного рассеяния, позволяющая проводить анализ молекулярного состава тканей с сохранением всех достоинств метода флуоресцентной спектроскопии, не требует при этом введения экзогенного красителя и может быть вариантом выбора при построении системы интраоперационной навигации или оптической биопсии.

В настоящей работе представлены первые результаты использования метода главных компонент для классификации спектров комбинационного рассеяния глиобластомы человека с промежуточной обработкой спектров для минимизации возможных ошибок от флуоресценции как эндогенных флуорофоров, так и фотосенсибилизаторов, используемых при флуоресцентной навигации. В результате были обнаружены различия в пространстве главных компонент, соответствующие образцам тканей с микрокистозными компонентами, обширными участками некрозов, фокусами свежих кровоизлияний. Показано, что данный подход может послужить основой для построения системы автоматической интраоперационной классификации тканей на основе анализа спектров комбинационного рассеяния.

Ключевые слова: глиобластома, оптическая биопсия, спонтанное комбинационное рассеяние, метод главных компонент.

Для цитирования: Романишкин И.Д., Бикмухаметова Л.Р., Савельева Т.А., Горяйнов С.А., Косырькова А.В., Охлопков В.А., Гольбин Д.А., Полетаева И.Ю., Потапов А.А., Лощенов В.Б. Спектроскопия спонтанного комбинационного рассеяния для *ex vivo* диагностики внутричерепных опухолей // Biomedical Photonics. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 4–12 doi: 10.24931/2413-9432-2020-9-3-4-12.

Контакты: Романишкин И.Д., e-mail: igor.romanishkin@gmail.com.

SPONTANEOUS RAMAN SPECTROSCOPY FOR INTRACRANIAL TUMORS DIAGNOSTICS EX VIVO

Romanishkin I.D.¹, Bikmukhametova L.R.², Savelieva T.A.^{1,3}, Goryaynov S.A.⁴,
Kosyrkova A.V.⁴, Okhlopkov V.A.⁴, Golbin D.A.⁴, Poletaeva I.Yu.⁴, Potapov A.A.⁴,
Loschenov V.B.^{1,2,3}

¹Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²ООО "BIOSPEC", Moscow, Russia

³National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

⁴N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, Russia

Abstract

Neurosurgery of intracranial tumors, especially of glial origin, is a non-trivial task due to their infiltrative growth. In recent years, optical methods of intraoperative navigation have been actively used in neurosurgery. However, one of the most widely used approaches based on the selective accumulation of fluorescent contrast medium (5-ALA-induced protoporphyrin IX) by the tumor cannot be applied to a significant number of tumors due to its low accumulation. On the contrary, Raman spectroscopy, which allows analyzing the molecular composition of

tissues while preserving all the advantages of the method of fluorescence spectroscopy, does not require the use of an exogenous dye and may become a method of choice when composing a system for intraoperative navigation or optical biopsy.

This work presents the first results of using the principal component method to classify Raman spectra of human glioblastoma with intermediate processing of spectra to minimize possible errors from the fluorescence of both endogenous fluorophores and photosensitizers used in fluorescence navigation. As a result, differences were found in the principal component space, corresponding to tissue samples with microcystic components, extensive areas of necrosis, and foci of fresh hemorrhages. It is shown that this approach can serve as the basis for constructing a system for automatic intraoperative tissue classification based on the analysis of Raman spectra.

Keywords: glioblastoma, optical biopsy, spontaneous Raman scattering, principal component analysis.

For citations: Romanishkin I.D., Bikmukhametova L.R., Savelieva T.A., Goryaynov S.A., Kosyrkova A.V., Okhlopov V.A., Golbin D.A., Poletaeva I.Yu., Potapov A.A., Loschenov V.B. Spontaneous Raman spectroscopy for intracranial tumors diagnostics *ex vivo*, *Biomedical Photonics*, 2020, vol. 9, no. 3, pp. 4–12 (in Russian). doi: 10.24931/2413–9432–2020–9–3–4–12.

Contacts: Romanishkin I.D., e-mail: igor.romanishkin@gmail.com

Введение

Основные проблемы нейрохирургии внутричерепных опухолей связаны со сложностью демаркации их границ в силу особенностей их роста. Глиальные опухоли, как известно, прорастают в здоровое белое вещество головного мозга при продвижении опухолевых клеток вдоль кровеносных сосудов и нервных трактов благодаря дружественному микроокружению, сформированному рекрутированными опухолью иммунокомпетентными клетками. Инфильтрация опухолевых клеток в здоровую ткань делает невозможной радикальную резекцию без значительного неврологического дефицита для пациента. В связи с этим в последние годы в нейрохирургии активно используются различные методы интраоперационной навигации, позволяющие максимально точно дифференцировать опухолевые и нормальные ткани, среди которых особенно выделяются оптические технологии вследствие их оперативности и неинвазивности. Общеизвестно использование для интраоперационной навигации флуоресценции протопорфирина IX, индуцированной введением 5-аминолевулиновой кислоты, в хирургии глиобластомы [1, 2]. В последнее время исследуется множество других методов для определения краев опухоли, включая количественный анализ экзогенной флуоресценции [3, 4], визуализацию времени жизни эндогенной флуоресценции [5–7], оптическую когерентную томографию (ОКТ) [8], гиперспектральную визуализацию [9] и спектроскопию комбинационного рассеяния (СКР) [10, 11]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества, однако СКР выделяется среди них тем, что позволяет анализировать непосредственно молекулярный состав исследуемых тканей без введения каких-либо красителей, что обуславливает дополнительный интерес к этому методу как к диагностической процедуре, позволяющей определять опухолевые ткани, характеризующиеся низким уровнем накопления флуоресцентных маркеров, например, ткани доброкачественных глиальных опухолей.

Первые результаты анализа опухоли головного мозга, основанные на СКР, были получены К. Tashibu [12]. Автор исследовал относительную концентрацию воды в нормальных и отечных тканях мозга крыс путем анализа групп СН и ОН в области с высоким волновым числом. Также были исследованы цитотоксические и вазогенные модели отека мозга у крыс [13]. В работах А. Mizuno и соавт. [14, 15] опубликованы спектры различных опухолей головного мозга, содержащие интенсивные пики, характерные липидам. Эти ранние исследования дали толчок для дальнейшего изучения опухолей головного мозга человека.

Основным толчком, продвинувшим СКР в исследования *in vivo*, стала разработка оптоволоконных зондов [16]. S. Koljenović и соавт. [17] исследовали ткани головного мозга свиньи с помощью волоконно-оптических зондов. В результате показано, что в проанализированных спектрах комбинационного рассеяния серого вещества преобладают полосы, связанные с белками, ДНК и фосфатидилхолином, в то время как в спектрах белого вещества преобладают холестерин и сфингомиелин.

Оптоволоконные зонды также способствовали экспериментальным исследованиям метастазирования [18]. Опухолевые клетки меланомы вводили в сонную артерию мышей, чтобы вызвать метастазирование в мозг. Серийные срезы были подготовлены из целого мозга мыши для анализа методами Фурье-спектроскопии и СКР. В то время как клетки метастатической меланомы не были обнаружены с помощью ИК-Фурье спектроскопии, СКР позволила их обнаружить при облучении на длине волны 785 нм.

Исследования тканей *ex vivo* дали основную информацию о природе и составе нормальных и опухолевых тканей. В вышеописанной работе [15] авторы использовали СКР и Фурье-спектроскопию для исследования различных образцов ткани человеческого мозга и показали, что спектры от нормального, но от-

ежного, серого и белого вещества были аналогичны спектрам от обычного серого и белого вещества крысы. Наблюдалось, что спектры от глиом, неврино и нефроцитом сходны со спектрами серого вещества крысы. В работе [19] получены 24 рамановские карты из неокрашенных и нефиксированных срезов 20 образцов ткани глиобластомы от 20 пациентов. В некротических тканях был обнаружен повышенный уровень холестерина и сложного эфира холестерина.

С. Krafft и соавт. [20, 21] проводили СКР тканей головного мозга для качественного и количественного анализа липидов. Сообщается о более высоких уровнях липидов в нормальных тканях и более высоком содержании гемоглобина, но меньшем соотношении липидов к белкам при внутричерепных опухолях. Таким образом, СКР можно использовать для дифференциации нормальных и опухолевых тканей, а также для определения типа и степени злокачественности опухоли.

В связи с появлением новой информации об относительном содержании липидов в опухолях головного мозга, были получены спектры комбинационного рассеяния липидных экстрактов из семи образцов тканей человека [22]. Ткани глиомы характеризовались повышенным содержанием воды и сниженным содержанием липидов, результаты согласуются с данными, полученными при исследовании тканей свиньи.

С помощью комбинационного рассеяния (КР) обнаружено, что содержание фосфатидилхолина повышено относительно холестерина в глиомах по сравнению со здоровыми тканями. Использование СКР помогло дифференцировать новообразования головного мозга у детей от нормальной мозговой ткани и сходные типы опухолей друг от друга [23].

В последнее время публикуются работы, связанные с интраоперационными исследованиями *in vivo* опухолей головного мозга. Как упоминалось ранее, хирургическая резекция в случае внутричерепных опухолей является сложной задачей: любые остаточные опухолевые клетки могут привести к рецидиву, в то время как удаление здоровой ткани может привести к когнитивным нарушениям. Таким образом, ранняя резекция, а также сохранение функционального статуса пациентов имеют решающее значение для достижения оптимального результата.

В исследовании, включавшем 10 пациентов [24], авторами получены спектры КР здоровых тканей мозга, опухоли и некротических тканей в естественных условиях в режиме реального времени. В другой работе [10] показаны различия в спектрах КР между нормальными и опухолевыми тканями в положении пиков фосфолипидов, протеинов и нуклеиновых кислот.

Эффективность СКР сравнили с МРТ, которая является стандартным методом визуализации [25]. Признание того факта, что современные технологии ви-

зуализации, включая стандартную МРТ, не позволяют обнаруживать отдаленные инвазивные клетки глиальных опухолей головного мозга, имеет решающее значение, поскольку это ограничение существенно снижает эффективность хирургического лечения глиомы. В работе авторы демонстрируют, что СКР может обнаруживать инвазивные опухолевые клетки далеко за пределами опухоли, обнаруженной при МРТ у людей во время операции. СКР обнаруживает инвазию на расстоянии до $\sim 3,7$ см и $\sim 2,4$ см за пределами границ контрастной зоны на МРТ.

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что СКР является вариантом выбора для интраоперационной навигации при нейрохирургии внутричерепных опухолей, особенно глиального происхождения. СКР обладает высоким пространственным разрешением, высокой скоростью сбора данных и высокой чувствительностью к изменениям молекулярного состава тканей. Она может выявлять инвазивные опухолевые клетки, не замедляя нейрохирургический процесс, и может дополнять или заменять нейронавигацию под управлением МРТ в качестве метода для определения границ опухоли.

Материалы и методы

Для регистрации спектров комбинационного рассеяния использовали спектроскопическую систему, состоящую из спектрометра комбинационного рассеяния света Raman-HR-TEC-785 (StellarNet, США), источника узкополосного лазерного излучения с длиной волны 785 нм (ширина на половине амплитуды лазерного пика 0,2 нм, мощность до 500 мВт) Ramulaser™ 785 (StellarNet, США), а также волоконно-оптического конфокального зонда для доставки лазерного излучения и сигнала КР (рис. 1). Использование зонда позволяло получать сигнал с площади диаметром менее 0,5 мм на поверхности образца. Управление спектрометром осуществлялось с компьютера с помощью разработанного нами программного обеспечения, позволяющего регистрировать серию спектров КР. Данная система позволяет регистрировать спектры в диапазоне 800–1000 нм, что соответствует диапазону стоксовых сдвигов 200–2750 cm^{-1} . Спектральное разрешение системы составляло 4 cm^{-1} .

Исследован материал, полученный при удалении внутричерепных опухолей человека (4 пациента с диагнозом мультиформная глиобластома), предоставленный Национальным медицинским исследовательским центром нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко. Материал был исследован в двух условиях: в операционной непосредственно после удаления *ex vivo* (2 пациента, 7 образцов ткани) и в биобанке через 2 ч после удаления (3 пациента, 6 образцов). При переносе из операционной в биобанк материал хранился в физиологическом растворе.

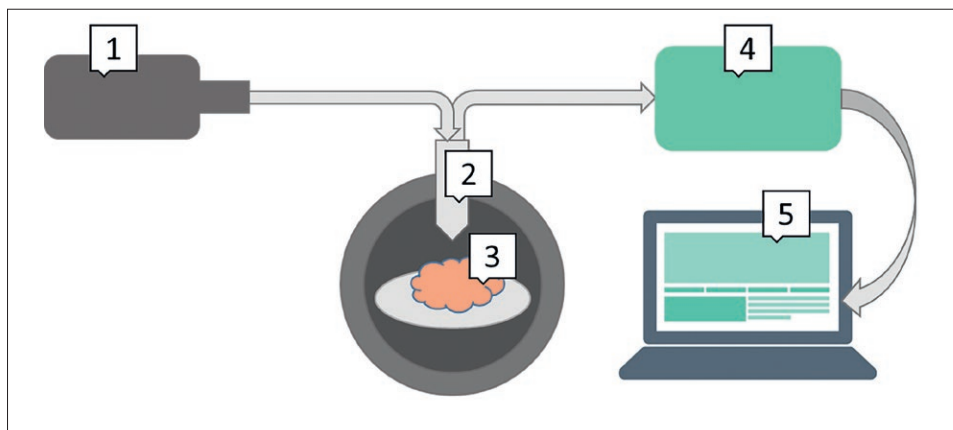


Рис. 1. Схема рабочей установки:

1. Источник узкополосного лазерного излучения с длиной волны 785 нм
2. Волоконно-оптический конфокальный зонд для доставки лазерного излучения и сигнала КР
3. Исследуемый образец биологической ткани
4. Спектрометр комбинационного рассеяния света
5. Компьютер со специальным программным обеспечением

Fig. 1. Working setup diagram:

1. Source of 785 nm narrow-band laser radiation
2. Fiber optic confocal probe for delivery of laser radiation and Raman signal
3. Sample of biological tissue
4. Raman spectrometer
5. Computer with special software

Регистрацию спектров КР каждого образца производили серией по 5 измерений с последующим усреднением. Экспозиция каждого измерения составляла 30 сек (суммарно 2,5 мин на серию) ввиду технического ограничения используемого спектрометра. Перед каждой серией измеряли фоновый сигнал (серия из 5 спектров по 30 сек), при котором лазер был отключен. Измерение фонового сигнала и спектра КР производили в затемненном помещении.

В ходе предварительной обработки спектров сначала производили усреднение спектров внутри каждой серии для уменьшения вклада случайных шумов в результирующий сигнал. Далее из усредненных спектров КР вычитали соответствующий им усредненный фоновый спектр для исключения ошибок, обусловленных условиями измерения.

Полученные спектры характеризовались высокой интенсивностью флуоресценции, которая является для СКР шумовым сигналом и ухудшает ее дешифровочные свойства. Для исключения компоненты флуоресценции из регистрируемого сигнала был использован алгоритм, представленный в работе [26] (рис. 2). Метод использует непрерывное вейвлет-преобразование для определения положения острых пиков КР и вычитания гладкого фонового сигнала. Полученный спектр был сглажен фильтром Савицкого-Голея третьего порядка.

Одна из сложностей характеристики образца ткани по спектру КР обусловлена высокой размер-

ностью полученных спектров, то есть большим количеством значимых пиков КР от различных органических соединений. Спектры КР, в отличие от, например, спектров флуоресценции, характеризуются большим количеством характерных спектральных линий, и их визуальная интерпретация становится нетривиальной задачей. Для решения этой проблемы в качестве метода уменьшения размерности был использован метод главных компонент (principal component analysis, PCA). В нем каждый спектр представляется как точка на гиперплоскости с размерностью, соответствующей количеству значений в измеренном спектре КР. Метод PCA заключается в повороте системы координат таким образом, чтобы оси лежали вдоль данных в направлении их наибольшего разброса. При таком повороте каждая главная компонента представляет собой линейную комбинацию значений по изначальным осям. При этом мы можем не принимать в рассмотрение те оси, по которым разброс данных после такого поворота будет минимальным. Таким образом осуществляется уменьшение размерности.

Результаты и обсуждение

Были получены спектры КР образцов тканей глиомы человека. Каждый из образцов был верифицирован как мультиформная глиобластома WHO Grade IV. Во всех образцах обнаружены очаги некроза, пролиферации сосудов.

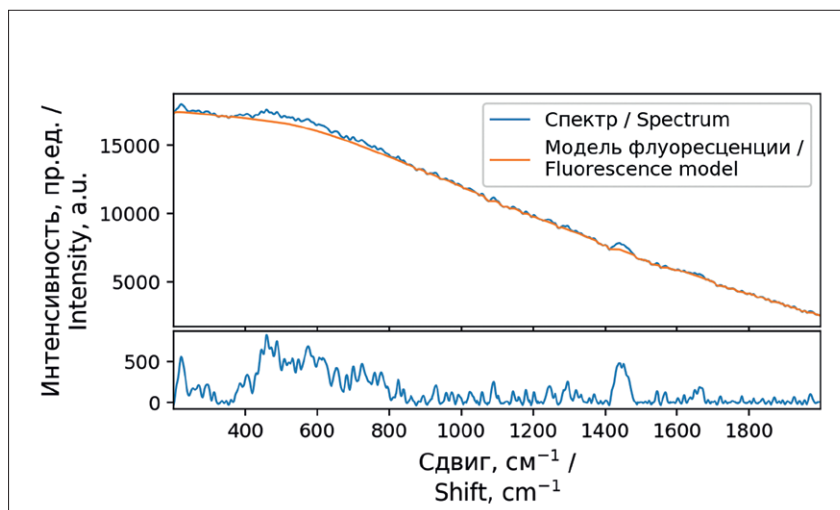


Рис. 2. Работа метода вычитания флуоресцентного сигнала из спектра КР. Сверху – измеренный спектр КР и построенная методом [26] модель гладкого спектра флуоресценции. Снизу – спектр КР без флуоресценции

Fig. 2. The work of the method of subtracting the fluorescent signal from the Raman spectrum. Above are the measured Raman spectrum and the smooth fluorescence spectrum model constructed by the method [26]. Below is the Raman spectrum without fluorescence

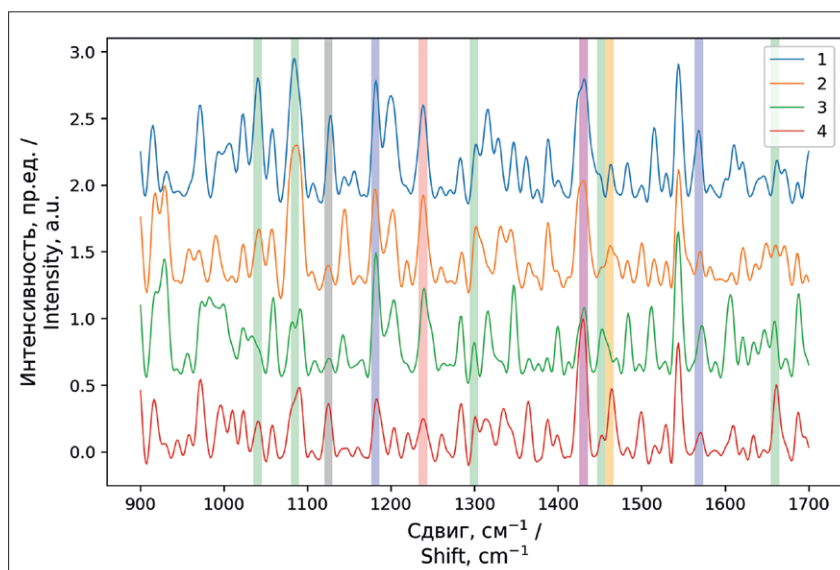


Рис. 3. Спектры КР образцов ткани пациента К. Значения интенсивности нормированы на максимум и смещены для удобства представления. Вертикальными полосами обозначены пики, характеризующие биомолекулы, содержание которых повышено в опухолевых тканях: белки (1236, 1239 cm^{-1} , красный), азотистые основания (1181, 1572 cm^{-1} , синий), дисахарид (1461 cm^{-1} , желтый), дезоксирибоза (1430 cm^{-1} , пурпурный), фосфолипид (1129 cm^{-1} , серый), холестерин (1085, 1296, 1032, 1451, 1659 cm^{-1} , зеленый)

Fig. 3. Raman spectra of patient K tissue samples. Intensity values are normalized to a maximum and shifted for ease of presentation. The vertical lines indicate the peaks characterizing the biomolecules, the content of which is higher in tumor tissues: proteins (1236, 1239 cm^{-1} , red), nitrogenous bases (1181, 1572 cm^{-1} , blue), disaccharide (1461 cm^{-1} , yellow), deoxyribose (1430 cm^{-1} , magenta), and phospholipid (1129 cm^{-1} , gray), cholesterol (1085, 1296, 1032, 1451, 1659 cm^{-1} , green)

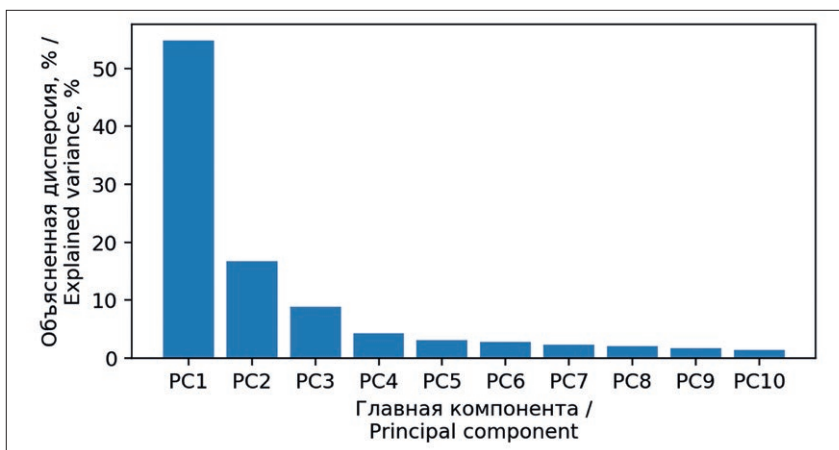


Рис. 4. Собственные значения главных компонент
Fig. 4. Eigenvalues of the principal components

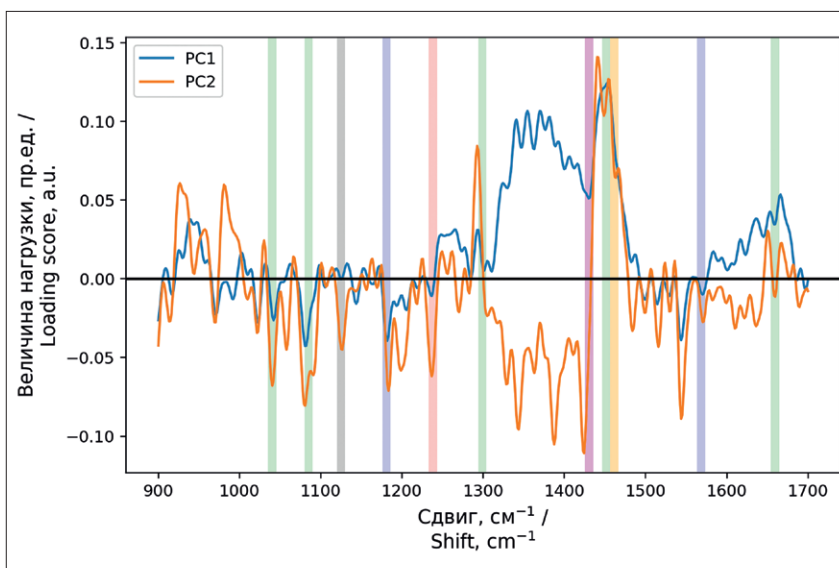


Рис. 5. Спектры нагрузки для первых двух главных компонент. Цветом выделены сдвиги, соответствующие биомолекулам, содержание которых повышено в опухолевых тканях (см. рис. 3)
Fig. 5. Loading score spectra for the first two principal components. Highlighted in color are the shifts corresponding to biomolecules, the content of which is higher in tumor tissues (see Fig. 3)

Полученные от каждого из образцов спектры КР были обработаны в соответствии с приведенными выше методами. Это позволило получить набор спектров с минимизированными ошибками измерения и свободных от флуоресцентного сигнала. В качестве примера на рис. 3 приведены спектры КР для пациента К с выделением основных пиков, характеризующих биомолекулы, содержание которых повышено в опухолевых тканях.

У пациента К отмечено следующее распределение материала по биоптатам: 1 – опухоль, 20% некроза; 2 – опухоль, менее 30% некроза, 3 – опухоль, менее

40% некроза, выраженный ангиоматоз; 4 – опухоль, до 90% некроза (сосудистого генеза – конгломерат толстостенных сосудов и прилежащей опухолевой ткани). Различия состава материала проявляется в различии интенсивностей пиков КР, однако, пики, характеризующие глиальные опухоли, остаются хорошо видны (рис. 3). На рис. 3 можно видеть значимый вклад холестерина, белков, дисахарида и азотистых оснований. Как было показано в работах [19, 22], холестерин может быть ассоциирован с некрозом, что соответствует данным морфологического исследования препаратов опухоли.

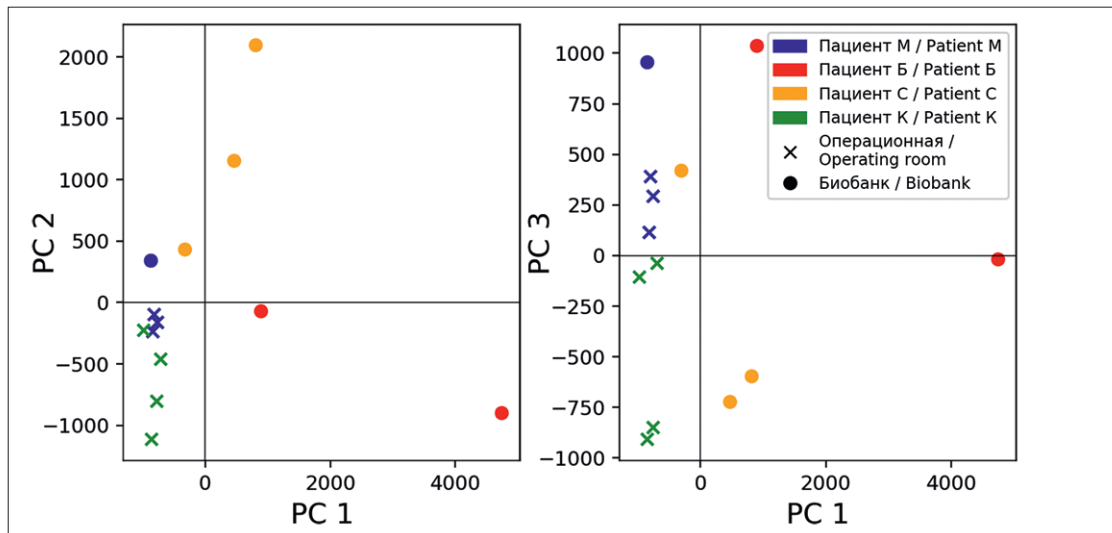


Рис. 6. Анализ главных компонент спектров КР образцов опухолевой ткани четырех пациентов, измеренных в операционной *ex vivo* и в биобанке

Fig. 6. PCA of the Raman spectra of tumor tissue samples from four patients, measured in the operating room *ex vivo* and in the biobank

Был произведен анализ главных компонент в спектральном диапазоне $900\text{--}1700\text{ см}^{-1}$, поскольку именно в нем преобладают пики, характерные для глиальных опухолей [27]. Основные спектральные особенности наблюдались для белка ($1236, 1239\text{ см}^{-1}$), азотистых оснований ($1181, 1572\text{ см}^{-1}$), дисахарида (1461 см^{-1}), дезоксирибозы (1430 см^{-1}), холестерина ($1085, 1296, 1032, 1451, 1659\text{ см}^{-1}$), ацильных остатков липидов (1086 см^{-1}) и фосфолипидов (1129 см^{-1}).

Результат PCA показал, что основные отличия (71% дисперсии) объясняются первыми двумя главными компонентами (рис. 4). Если рассмотреть спектры нагрузок (насколько сильно сигнал КР влияет на значение главной компоненты) первых двух компонент (рис. 5), то можно заметить положительный вклад сигнала КР в диапазоне $1300\text{--}1450\text{ см}^{-1}$ в значение PC1, вероятно вызванный высокой кровенаполненностью. При этом значение PC2 снижается при увеличении сигнала от белков, азотистых оснований, а также холестерина (значения при сдвигах 1032 и 1085 см^{-1}).

Были получены распределения измеренных спектров от первых двух главных компонент (рис. 5, слева). Материал, измеренный в операционной, образует плотную группу в III четверти координатной плоскости PC1/PC2. В то же время на плоскости PC1/PC3 (рис. 5, справа) не образуется групп измеренных образцов, что позволяет говорить об избыточности использования более двух главных компонент для рассмотрения измеренного набора данных. Спектры КР образцов материала от пациента Б, характеризующихся большим кровоизлиянием, тоже лежат в отрицательном диапазоне PC1. Патоморфологическое описание ткани опухоли пациента Б, проявившего наибольшие

отличия от остальных при анализе методом главных компонент, включает помимо основных черт глиобластомы такие особенности, как участки глиомезодермального рубца, присутствие в опухоли микрокистозного компонента, обширные участки некрозов, фокусы свежих кровоизлияний. Картина соответствует глиобластоме с терапевтически индуцированными изменениями.

В патоморфологическом описании тканей пациента С также на фоне основных особенностей мультиформной глиобластомы отмечены фокусы микрокистозного строения и свежих кровоизлияний.

Заключение

В работе представлены первые результаты использования метода главных компонент для классификации спектров комбинационного рассеяния образцов тканей глиобластом с промежуточной обработкой спектров для минимизации возможных ошибок от флуоресценции как эндогенных флуорофоров, так и фотосенсибилизаторов, используемых при флуоресцентной навигации. Обнаружены различия в пространстве главных компонент, соответствующие образцам тканей с микрокистозными компонентами, обширными участками некрозов, фокусами свежих кровоизлияний. Дальнейший набор данных разных типов патологий головного мозга позволит производить кластеризацию и анализ спектров [28] для построения системы интраоперационной диагностики, основанной на автоматическом анализе спектров комбинационного рассеяния.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–29–01062.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T. et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial // *Lancet Oncol.* – 2006. – Vol. 7(5). – P. 392–401.
2. Potapov A.A., Goriainov S.A., Loshchenov V.B. Intraoperative combined spectroscopy (optical biopsy) of cerebral gliomas // *Zh. Vopr. Neurokhir. Im. N. N. Burdenko.* – 2013. – Vol. 77(2). – P. 3–10.
3. Valdes P.A., Jacobs V.L., Wilson B.C. et al. System and methods for wide-field quantitative fluorescence imaging during neurosurgery // *Opt. Lett.* – 2013. – Vol. 38(15). – P. 2786.
4. Savelieva T.A., Loshchenov M.V., Borodkin A.V. et al. Combined spectroscopic and video fluorescent instrument for intraoperative navigation when removing a glial tumor // *SPIE Photonics Europe.* – 2020. – Vol. 11363. DOI: 10.1117/12.2556064
5. Marcu L., Jo J.A., Butte P.V. et al. Fluorescence Lifetime Spectroscopy of Glioblastoma Multiforme // *Photochem. Photobiol.* – 2004. – Vol. 80(1). – P. 98.
6. Butte P.V., Mamelak A.N., Nuno M. et al. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors // *Neuroimage.* – 2011. – Vol. 54, Suppl. 1. – S125–S135.
7. Kantelhardt S.R., Kalasauskas D., König K., et al. In vivo multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue // *J. Neurooncol.* – 2016. – Vol. 127(3). – P. 473–482.
8. Kut C., Chaichana K.L., Xi J., et al. Detection of human brain cancer infiltration *ex vivo* and in vivo using quantitative optical coherence tomography // *Sci. Transl. Med.* – 2015. Vol. 7(292). – 292ra100.
9. Fabelo H., Ortega S., Lazcano R., et al. An Intraoperative Visualization System Using Hyperspectral Imaging to Aid in Brain Tumor Delineation // *Sensors.* – 2018. – Vol. 18(2). – P. 430.
10. Jermyn M., Mok K., Mercier J. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7(274). – 274ra19.
11. Brusatori M., Auner G., Noh T., et al. Intraoperative Raman Spectroscopy // *Neurosurg. Clin. N. Am.* – 2017. – Vol. 28(4). – P. 633–652.
12. Tashibu K. Analysis of water content in rat brain using Raman spectroscopy // *No To Shinkei.* – 1990. – Vol. 42(10). – P. 999–1004.
13. Kitajima T., Tashibu K., Tani S., et al. Analysis of water content in young rats brain edema by Raman spectroscopy // *No To Shinkei.* – 1993. – Vol. 45(6). – P. 519–524.
14. Mizuno A., Hayashi T., Tashibu K., et al. Near-infrared FT-Raman spectra of the rat brain tissues // *Neurosci. Lett.* – 1992. – Vol. 141(1). – P. 47–52.
15. Mizuno A., Kitajima H., Kawauchi K., et al. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic study of human brain tissues and tumours // *J. Raman Spectrosc.* – 1994. Vol. 25(1). – P. 25–29.
16. Beleites C., Geiger K., Kirsch M., et al. Raman spectroscopic grading of astrocytoma tissues: Using soft reference information // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 400(9). – P. 2801–2816.
17. Koljenović S., Schut T.C., Wolthuis R., et al. Raman spectroscopic characterization of porcine brain tissue using a single fiber-optic probe // *Anal. Chem.* – 2007. – Vol. 79(2). – P. 557–564.
18. Krafft C., Kirsch M., Beleites C., et al. Methodology for fiber-optic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in mouse brains // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – Vol. 389(4). – P. 1133–1142.
19. Koljenović S., Choo-Smith L.-P., Schut T.C.B., et al. Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy // *Lab. Investig.* – 2002. – Vol. 82(10). – P. 1265–1277.
20. Krafft C., Neudert L., Simat T., et al. Near infrared Raman spectra of human brain lipids // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2005. – Vol. 61(7). – P. 1529–1535.

REFERENCES

1. Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., Wiestler O.D., Zanella F., Reulen H.J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol*, 2006, vol. 7 (5), pp. 392–401.
2. Potapov A.A., Goriainov S.A., Loshchenov V.B., Savel'eva T.A., Gavrilo A.G., Okhlopkov V.A. Intraoperative combined spectroscopy (optical biopsy) of cerebral gliomas, *Zh. Vopr. Neurokhir. Im. N. N. Burdenko*, 2013, vol. 77 (2), pp. 3–10.
3. Valdes P.A., Jacobs V.L., Wilson B.C., Leblond F., Roberts D.W., Paulsen K.D. System and methods for wide-field quantitative fluorescence imaging during neurosurgery, *Opt. Lett.*, 2013, vol. 38 (15), pp. 2786.
4. Savelieva T.A., Loshchenov M.V., Borodkin A.V., Linkov K.G., Kosyrykova A.V., Goryajnov S.A., et al. Combined spectroscopic and video fluorescent instrument for intraoperative navigation when removing a glial tumor, *SPIE Photonics Europe*, 2020, vol. 11363. doi: 10.1117/12.2556064
5. Marcu L., Jo J.A., Butte P.V., Yong W.H., Pikul B.K., Black K.L., Thompson R.C. Fluorescence Lifetime Spectroscopy of Glioblastoma Multiforme, *Photochem. Photobiol.*, 2004., vol. 80 (1), pp. 98.
6. Butte P.V., Mamelak A.N., Nuno M., Bannykh S.I., Black K.L., Marcu L. Fluorescence lifetime spectroscopy for guided therapy of brain tumors, *Neuroimage*, 2011, vol. 54, suppl. 1, s125–s135.
7. Kantelhardt S.R., Kalasauskas D., König K., Kim E., Weinigel M., Uchugonova A., Giese A. In vivo multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue, *J. Neurooncol.*, 2016., vol. 127 (3), pp. 473–482.
8. Kut C., Chaichana K.L., Xi J., Raza S.M., Ye X., McVeigh E.R., Rodriguez F.J. Detection of human brain cancer infiltration *ex vivo* and in vivo using quantitative optical coherence tomography, *Sci. Transl. Med.*, 2015, vol. 7 (292), 292ra100–292ra100.
9. Fabelo H., Ortega S., Lazcano R., Madroñal D., Callicó G.M., Juárez E. An Intraoperative Visualization System Using Hyperspectral Imaging to Aid in Brain Tumor Delineation, *Sensors*, 2018, vol. 18 (2), pp. 430.
10. Jermyn M., Mok K., Mercier J., Desroches J., Pichette J., Saint-Arnaud K., Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans, *Sci. Transl. Med.*, 2015, vol. 7 (274), 274ra19–274ra19.
11. Brusatori M., Auner G., Noh T., Scarpace L., Broadbent B., Kalkanis S.N. Intraoperative Raman Spectroscopy, *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 2017, vol. 28 (4), pp. 633–652.
12. Tashibu K. Analysis of water content in rat brain using Raman spectroscopy, *No To Shinkei*, 1990, vol. 42 (10), pp. 999–1004.
13. Kitajima T., Tashibu K., Tani S., Mizuno A., Nakamura N. Analysis of water content in young rats brain edema by Raman spectroscopy, *No To Shinkei*, 1993, vol. 45 (6), pp. 519–524. [in Japan.]
14. Mizuno A., Hayashi T., Tashibu K., Maraishi S., Kawauchi K., Ozaki Y. Near-infrared FT-Raman spectra of the rat brain tissues, *Neurosci. Lett.*, 1992, vol. 141 (1), pp. 47–52.
15. Mizuno A., Kitajima H., Kawauchi K., Maraishi S., Ozaki Y. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic study of human brain tissues and tumours, *J. Raman Spectrosc.*, 1994, vol. 25 (1), pp. 25–29.
16. Beleites C., Geiger K., Kirsch M., Sobottka S.B., Schackert G., Salzer R. Raman spectroscopic grading of astrocytoma tissues: Using soft reference information, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, vol. 400 (9), pp. 2801–2816.
17. Koljenović S., Schut T.C., Wolthuis R., Vincent A.J., Hendriks-Hagevi G., Santos L., et al. Raman spectroscopic characterization of porcine brain tissue using a single fiber-optic probe, *Anal. Chem.*, 2007, vol. 79 (2), pp. 557–564.
18. Krafft C., Kirsch M., Beleites C., Schackert G., Salzer R. Methodology for fiber-optic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in

21. Krafft C., Sobottka S.B., Schackert G. et al. Near infrared Raman spectroscopic mapping of native brain tissue and intracranial tumors // *Analyst.* – 2005. – Vol. 130(7). – P. 1070–1077.
22. Köhler M., Machill S., Salzer R., et al. Characterization of lipid extracts from brain tissue and tumors using Raman spectroscopy and mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2009. – Vol. 393(5). – P. 1513–1520.
23. Leslie D.G., Kast R.E., Poulik J.M., et al. Identification of pediatric brain neoplasms using raman spectroscopy // *Pediatr. Neurosurg.* – 2012. – Vol. 48(2). – P. 109–117.
24. Desroches J., Jermyn M., Mok K., et al. Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification // *Biomed. Opt. Express.* – 2015. – Vol. 6(7). – P. 2380.
25. Jermyn M., Desroches J., Mercier J., et al. Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans // *Biomed. Opt. Express.* – 2016. – Vol. 7(12). – P. 5129.
26. Zhang Z.-M., Chen S., Liang Y.-Z., et al. An intelligent background-correction algorithm for highly fluorescent samples in Raman spectroscopy // *J. Raman Spectrosc.* – 2009. – Vol. 41(6). – P. 659–669.
27. Bikmukhametova L.R., Romanishkin I.A., Savelieva T.A. et al. Spontaneous Raman Spectroscopy for Intracranial Tumor Diagnostics // *J. Phys. Conf. Ser.* – 2020. – Vol. 1439(1). – P. 012038.
28. Osmakov I.A., Savelieva T.A., Loschenov V.B., et al. Cluster analysis of the results of intraoperative optical spectroscopic diagnostics in brain glioma neurosurgery // *Biomed. Photonics.* – 2018. – Vol. 7(4). – P. 23–34.
- mouse brains, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, vol. 389 (4), pp. 1133–1142.
19. Koljenović S., Choo-Smith L.-P., Schut T.C.B., Kros J.M., van den Berge H.J., Puppels G.J. Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy, *Lab. Investig.*, 2002, vol. 82 (10), pp. 1265–1277.
20. Krafft C., Neudert L., Simat T., Salzer R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids, *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2005, vol. 61 (7), pp. 1529–1535.
21. Krafft C., Sobottka S.B., Schackert G., Salzer R. Near infrared Raman spectroscopic mapping of native brain tissue and intracranial tumors, *Analyst*, 2005, vol. 130 (7), pp. 1070–1077.
22. Köhler M., Machill S., Salzer R., Krafft C. Characterization of lipid extracts from brain tissue and tumors using Raman spectroscopy and mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, vol. 393 (5), pp. 1513–1520.
23. Leslie D.G., Kast R.E., Poulik J.M., Rabah R., Sood S., Auner G.W., et al. Identification of pediatric brain neoplasms using raman spectroscopy, *Pediatr. Neurosurg.*, 2012. vol. 48 (2), pp. 109–117.
24. Desroches J., Jermyn M., Mok K., Lemieux-Leduc C., Mercier J., St-Arnaud K. et al. Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification, *Biomed. Opt. Express*, 2015, vol. 6 (7), pp. 2380.
25. Jermyn M., Desroches J., Mercier J., St-Arnaud K., Guiot M.-C., Leblond F., et al. Raman spectroscopy detects distant invasive brain cancer cells centimeters beyond MRI capability in humans, *Biomed. Opt. Express*, 2016, vol. 7 (12), pp. 5129.
26. Zhang Z.-M., Chen S., Liang Y.-Z., Liu Z.-X., Zhang Q.-M., Ding L.-X., et al. An intelligent background-correction algorithm for highly fluorescent samples in Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.*, 2009, vol. 41 (6), pp. 659–669.
27. Bikmukhametova L.R., Romanishkin I.A., Savelieva T.A., Skobeltsin A.S., Maklygina Yu.S., Loschenov V.B., et al. Spontaneous Raman Spectroscopy for Intracranial Tumor Diagnostics, *J. Phys. Conf. Ser.*, 2020, vol. 1439 (1), 012038.
28. Osmakov I.A., Savelieva T.A., Loschenov V.B., Goryajnov S.A., Potapov A.A. Cluster analysis of the results of intraoperative optical spectroscopic diagnostics in brain glioma neurosurgery, *Biomed. Photonics*, 2018, vol. 7 (4), pp. 23–34.