

کاربرد شبکه‌های عصبی در آنالیز طیفی رامان جهت تفکیک منشأ سرطان‌های متاستاز یافته به غدد لنفاوی

خلاصه

مقدمه: تعیین منشأ اولیه سرطان‌های متاستاز یافته در طراحی درمان و میزان موفقیت آن بسیار حائز اهمیت است. از آنجاکه سلول‌های متاستاز یافته حاوی اطلاعاتی از بافت مبدأ می‌باشند و طیف‌سنجی رامان اثر انگشت مولکولی از سلول‌ها به دست می‌دهد، روش‌های مبتنی بر طیف‌سنجی رامان می‌تواند روش جدیدی در تعیین منشأ اولیه سرطان به دست دهد.

روش بررسی: در این مطالعه نمونه‌های به دست آمده از سرطان‌های متاستاز یافته به غدد لنفاوی از سه مبدأ متفاوت معده، پستان و روده بزرگ مورد ارزیابی رامان قرار گرفت و طیف‌های به دست آمده پس از پیش پردازش با شبکه‌های عصبی MLP و شبکه پیشنهادی SCNN با توجه به مبدأ سرطان طبقه‌بندی شدند.

یافته‌ها: طبقه‌بندی با استفاده از شبکه بهینه شده با نام شبکه عصبی خودسازنده (SCNN) نتایج بسیار بهتری نسبت به MLP نشان داد و در نهایت صحتی برابر ۸۹ درصد در طبقه‌بندی سه کلاس (سه مبدأ سرطان) در اعتبارسنجی متقابل یکی را کنار بگذار به دست آمد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که طیف‌سنجی رامان با به کارگیری روش‌های مناسب در پردازش طیف‌ها می‌تواند به روش جدیدی در تعیین منشأ اولیه سرطان‌های متاستاز یافته با منشأ اولیه نامعلوم تبدیل شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان، متاستاز، طیف‌سنجی رامان، شبکه عصبی خودسازنده، الگوریتم ژنتیک

زهره دهقانی بیدگلی^۱ طاهره خامه چیان^۲

۱. استادیار گروه مهندسی پزشکی، واحد کاشان، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشان، ایران

۲. دانشیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه پاتولوژی پزشکی

نویسنده مسئول: زهره دهقانی بیدگلی، تلفن: ۰۹۱۳۳۶۲۲۰۱۲
پست الکترونیک: deghani_zohreh@yahoo.com

مقدمه

سرطان‌های متاستاز یافته با منشأ اولیه نامعلوم (CUP) تقریباً ۲ درصد از سرطان‌ها را تشکیل می‌دهند [۱]. علی‌رغم پیشرفت‌های حاصل شده در ایمنونوهیستوشیمی و تکنیک‌های تصویربرداری، تشخیص و درمان این بیماران همچنان مسئله‌ای غامض برای انکولوژیست‌ها است. حتی با تلاش‌های گسترده با استفاده از روش‌های پاتولوژیکی و تصویربرداری مدرن، همچنان نرخ تشخیص مبدأ این سرطان‌ها پایین است. در کمتر از ۲۰ درصد از بیماران، مکان اولیه تومور پیش از مرگ تشخیص داده می‌شود. هزینه و زمان بررسی‌های لازم برای تشخیص مکان اولیه تومور مسئله دیگر مورد توجه پزشکان و انکولوژیست‌ها می‌باشد [۲ و ۳].

ارزیابی تشخیصی بیماران دارای CUP با بررسی‌های آزمایشگاهی و بالینی که شامل عمدتاً پاتولوژی و نیز تصویربرداری و آندوسکوپی است، انجام می‌شود. بهره‌گیری از نشانگرهای سرمی تومور نیز در برخی موارد کمک‌کننده است [۳]. اخیراً نیز پیشرفت‌های زیادی در تشخیص منشأ اولیه تومور با استفاده از نمایه‌سازی تومور با بیان ژن حاصل شده است [۱]. پرسنل درمانی باید الگوریتم معینی را برای تعیین تومور اولیه با در نظر گرفتن هزینه و زمان و نیز سودمندی نهایی آن در وضعیت بیمار دنبال کنند [۲].

در کنار روش‌های تشخیصی حاضر، طیف‌سنجی رامان به‌عنوان یک تکنیک نوری غیر مخرب که قادر به ارزیابی مولکولی نمونه‌های بافتی بدون نیاز به نمونه‌برداری و آماده‌سازی در مدت‌زمان کوتاه (حتی زمان حقیقی) می‌باشد، در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققان حوزه سرطان قرار گرفته است [۴-۱۳]. این مطالعات شامل مطالعه سرطان در بافت‌های مختلف همچون سرطان پستان [۱۴ و ۱۵]، سرطان‌های دستگاه گوارش [۱۶ و ۱۷]، تومور مغزی [۱۸ و ۱۹]، سرطان پوست [۲۰ و ۲۱] و ... می‌باشد.

در طیف‌سنجی رامان که مبتنی بر پراکندگی غیر الاستیک نور تک رنگ می‌باشد، باریکه‌ای از لیزر تک‌رنگ کم‌توان به نمونه تابیده می‌شود. متناسب با فرکانس نوسان پیوندهای مولکولی موجود در نمونه برطبق پدیده پراکندگی رامان علاوه بر نور با طول موج لیزر فرودی، نورهایی با رنگ (طول موج) متفاوت در نور پراکنده شده وجود دارد. با آشکارسازی شدت نور پراکنده شده در طول موج‌های اطراف طول موج فرودی، طیف رامان به‌صورت اثر انگشتی از نمونه مورد مطالعه به‌دست می‌آید [۲۲]. با آنالیز طیف‌های به‌دست آمده از گروه‌های مختلف پاتولوژیکی می‌توان به تفکیک و تمایز طیف‌ها و یافتن ویژگی‌های مشخصه هر گروه پاتولوژیکی پرداخت.

با وجود پتانسیل‌های این تکنیک برای تبدیل شدن به ابزاری جهت بررسی‌های غیرتهاجمی، زمان حقیقی و درون‌تنی، تفسیر طیف‌های نسبتاً پیچیده به‌دست آمده است و تشخیص آسیب‌های پاتولوژیکی با حساسیت و ویژگی بالا از مشکلات به‌کارگیری بالینی این تکنیک است.

در این راستا، استفاده از الگوریتم‌های هوش مصنوعی در استخراج اطلاعات از طیف‌های رامان بسیار مورد توجه محققان این حوزه قرار گرفته است.

در مطالعه حاضر با توجه به اهمیت تعیین منشأ اولیه سرطان‌های متاستاز یافته از یک سو و پتانسیل‌های طیف‌سنجی رامان در ارزیابی نمونه‌های بافتی از سوی دیگر، مسئله تفکیک سرطان‌های متاستاز یافته به یک مقصد از منشأ‌های متفاوت مورد توجه قرار گرفته است. از آنجا که گره‌های لنفاوی یکی از مقصدهای سرطان‌های متاستاز یافته هستند لذا، سرطان‌های با منشأ اولیه نامعلوم نیز در آن ظهور می‌یابد [۲]. مطالعه حاضر بر روی سرطان‌های متاستاز یافته از سه منشأ متفاوت (معهده، پستان و روده بزرگ) به غدد لنفاوی با هدف تفکیک مبدأ از روی نمونه متاستاز یافته انجام شده است.

در مطالعه حاضر، پس از پیش پردازش داده‌ها از شبکه عصبی به عنوان طبقه بند استفاده شده و شبکه عصبی جدیدی بنام شبکه عصبی خودسازنده^۲ (SCNN) به منظور بهبود قدرت تفکیک شبکه عصبی پیشنهاد شده و عملکرد آن مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی

۱. نمونه‌ها

در این تحقیق سه بیمار مبتلا به سرطان متاستاز یافته مورد بررسی قرار گرفتند. این افراد دارای تومورهای معده، پستان و روده بزرگ متاستاز یافته به غدد لنفاوی بودند. از هریک از این افراد نمونه‌هایی از بافت نرمال اولیه، سرطانی اولیه (مبدأ) و سرطان ثانویه (متاستاز به غدد لنفاوی) از طریق جراحی به‌دست آمد. نمونه‌های به‌دست آمده پس از برش داده‌شدن توسط متخصص پاتولوژی به منظور جدا نمودن بخش‌های مشکوک به تومور در داخل محلول فرمالین (۱۰ درصد فرمالدئید در آب) فیکس و جهت طیف‌سنجی به آزمایشگاه رامان منتقل شدند. پس از طیف‌سنجی، نمونه‌ها به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی ارجاع داده شدند و بقیه فرآیند تشخیص هیستوپاتولوژی شامل آماده‌سازی بافت، تهیه بلوک‌های پارافینی، برش دادن با میکروتوم و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و انوزین و در نهایت بررسی اسلایدهای به‌دست آمده زیر میکروسکوپ توسط متخصص هیستوپاتولوژی و ارائه تشخیص روی آن‌ها انجام شد.

۲. طیف‌سنجی

در آزمایشگاه طیف‌سنجی رامان، نمونه‌ها پس از خروج از محلول فرمالین چند دقیقه در هوای آزاد قرار گرفتند تا فرمالین از سطح آن‌ها تبخیر شود و اثر آن در طیف نمونه‌ها ظاهر نشود. سپس با استفاده از سیستم طیف‌سنجی رامان مجهز به لیزر دیودی با طول موج ۷۸۵ nm و توان ۱۰ mW از هر نمونه تعداد سه طیف از نقاط مختلف آن

1. Cancer of Unknown Primary Site

2. Self-Constructing Neural Network

۵. طبقه بندی

در طبقه بندی طیف ها از شبکه های عصبی مصنوعی MLP راجع و نیز شبکه با ساختار بهینه منطبق بر داده با نام شبکه عصبی خودسازنده (SCNN) که توسط گروه تحقیقی حاضر توسعه داده شده است، استفاده شد.

شبکه MLP استفاده شده در این مطالعه دارای ۱۰ نرون در تک لایه میانی با تابع انتقال تانژانت سیگموئید، سه نرون خروجی (به ازای سه کلاس طبقه بندی) با تابع انتقال ماکزیمم نرم و ۶۱۱۱ ورودی به ازای هر یک از مؤلفه های طیفی است. شایان ذکر است تابع عملگر در این شبکه آنتروپی متقابل و تابع آموزش شبکه گرادیان مزدوج مدرج (SCG) انتخاب شده است.

شبکه عصبی خودسازنده (SCNN) شبکه عصبی است که علاوه بر وزن اتصالات نرونی آن که در تمام شبکه های عصبی مصنوعی با توجه به مجموعه آموزش تغییر یافته و بهینه می شود، ساختار شبکه (وجود یا عدم وجود تمام اتصالات ممکن و تعداد نرون های لایه های میانی) نیز با توجه به داده های آموزش توسط یک الگوریتم بهینه سازی، بهینه می شود. در این مطالعه شبکه SCNN مشابه شبکه MLP دارای تنها یک لایه میانی در نظر گرفته شده است. سایر مشخصات شبکه همچون توابع انتقال لایه ها، تابع عملگر و تابع آموزش نیز مشابه شبکه MLP فرض شده است.

ماتریس هینتون (ماتریس اتصالات شبکه) در مورد شبکه MLP و SCNN به ترتیب در شکل ۱ a و c نشان داده شده است. این ماتریس، از سه ماتریس اتصال ورودی به لایه ها (لایه های میانی و خروجی) به نام Input_Connect، ماتریس اتصال لایه ها به یکدیگر به نام Layer_Connect و ماتریس اتصال بایاس به لایه ها به نام Bias_Connect تشکیل شده است. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، در حالی که ماتریس هینتون شبکه MLP ماتریس یک شبکه پیش خور و قطعی می باشد (سلول توپر نشان دهنده اتصال و سلول سفید نشان دهنده عدم اتصال می باشد)، ماتریس هینتون شبکه SCNN دارای شش المان غیر قطعی است که می تواند صفر (عدم اتصال) و یا یک (وجود اتصال) باشد. این المان های غیر قطعی در تصویر با سلول های خاکستری رنگ مشخص شده اند که مقدار آن ها توسط الگوریتم بهینه سازی تعیین می شود. علاوه بر شش اتصال مذکور، تعداد نرون های تک لایه پنهان نیز به صورت عدد صحیحی بین ۱ تا ۳۰ توسط الگوریتم بهینه سازی در ترکیب با شش متغیر باینری قبلی بهینه می شود. دیاگرام ساده ای از ارتباط ورودی، لایه ها و بایاس در شبکه MLP و SCNN به ترتیب در شکل ۱ b و d نشان داده شده است. در این شکل ها نیز اتصالات غیر قطعی با خطوط خاکستری رنگ نشان داده شده است.

در مطالعه حاضر از الگوریتم ژنتیک برای بهینه سازی ساختار استفاده شده است. تابع هدف در بهینه سازی ساختار شبکه، دستیابی به بیشترین

به دست آمد. سیستم مذکور طیف هایی در بازه $3500-445 \text{ cm}^{-1}$ و با رزولوشن 0.5 cm^{-1} به دست می دهد. پس از طیف سنجی، نمونه ها مجدداً در داخل محلول فرمالین قرار گرفتند و جهت انجام مابقی روال تشخیص به آزمایشگاه آسیب شناسی ارجاع داده شدند.

۳. مجموعه داده

پس از طیف سنجی و نیز انجام فرآیند تشخیص در مورد نمونه ها به طیف های به دست آمده از هر نمونه، تشخیص هیستوپاتولوژی به عنوان برجسب کلاس اختصاص یافت. در نهایت با توجه به هدف مطالعه حاضر که تفکیک سرطان های متاستاز یافته به غدد لنفاوی با منشأ های متفاوت می باشد، طیف های به دست آمده از سه نمونه سرطان متاستاز یافته به غدد لنفاوی (در مجموع نه طیف) از سه بیمار با سرطان های اولیه متفاوت (معدده، پستان و روده بزرگ) مجموعه داده ما را تشکیل می دهند. لذا، در مجموعه داده مورد مطالعه تعداد نه طیف دارای ۶۱۱۱ نقطه طیفی (در محدوده $3500-445 \text{ cm}^{-1}$ با رزولوشن 0.5 cm^{-1}) در سه کلاس متاستاز یافته از معدده، پستان و روده بزرگ که به ترتیب با برجسب های G (Gastric Cancer)، B (Breast Cancer) و C (Colon Cancer) مشخص شده اند، با توزیع سه طیف در هر کلاس حضور دارند.

۴. پیش پردازش

به منظور حذف تداخلات ناخواسته ناشی از فرآیند اندازه گیری، سه مرحله پیش پردازش شامل حذف خط زمینه (ناشی از فلورسانس نمونه)، حذف نویز و نرمال سازی روی طیف ها انجام گرفت.

در مرحله حذف خط زمینه از الگوریتم RIA^۲ استفاده شد. در این الگوریتم ابتدا طیف در محدوده عدد موجی مورد نظر بریده می شود. سپس از دو طرف بریده شده با استفاده از ضرایب برازش خطی حداقل مربعات، به صورت خطی برون یابی می گردد. سپس دو پیک گوسی با عرض و ارتفاع مناسب در دو طرف برون یابی شده اضافه می گردد. طیف به دست آمده با اضافات به صورت مرحله ای هموار می گردد و در هر مرحله هموار سازی در هر نقطه مینیمم طیف هموار شده و طیف اصلی حفظ می شود این کار ادامه می یابد تا جایی که دو پیک اضافه شده به درستی باز یابی گردد [۲۳]. در مطالعه حاضر از الگوریتم فوق در کل بازه طیفی استفاده شد، ارتفاع پیک های گوسی اضافه شده دو برابر ماکزیمم طیفی بود و FWHM^۳ آن ها برابر 40 cm^{-1} انتخاب گردید.

در مرحله حذف نویز از هموار سازی با برازش توابع Sgolay مرتبه ۲ دارای محدوده پوشش ۱۰۰ نقطه استفاده گردید.

در مرحله نرمال سازی، از نرمال سازی min-max که محدوده شدت طیف ها را به بازه ۰ و ۱ محدود می کند، استفاده شد.

3. Range Independent Algorithm

4. Full Width at Half Maximum

شده است. در اين شكل به منظور وضوح بهتر، طيفها نسبت به يكدیگر شيفت داده شده و نيز طيفهای مربوط به سرطان متاستاز يافته معده، پستان و روده بزرگ به ترتيب با خط پر، نقطه چین و خط چین متمایز گشته اند.

ساختار شبکه MLP و SCNN استفاده شده در طبقه بندی طيفهای به دست آمده از متاستازهای با منشأهای متفاوت به ترتيب در شكل ۳ الف و ب نشان داده شده است. شبکه SCNN نشان داده شده در شكل ۳ ب، نمونه ای از شبکه SCNN می باشد که روی کل طيفها تشكيل شده است. همان طور که پيش تر گفته شد، ساختار شبکه SCNN مطابق با داده ها تغيير می کند و در اینجا ساختار شبکه تولید شده روی کل داده ها به عنوان نمونه، نمایش داده شده است.

ماتریس های سردرگمی به دست آمده در طبقه بندی با شبکه های MLP و SCNN و اعتبارسنجی متقابل یک طيف را کنار بگذار، به ترتيب در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. همان طور که از جداول مشاهده می شود، در حالی که نتیجه طبقه بندی با MLP صحت غیر قابل قبولی

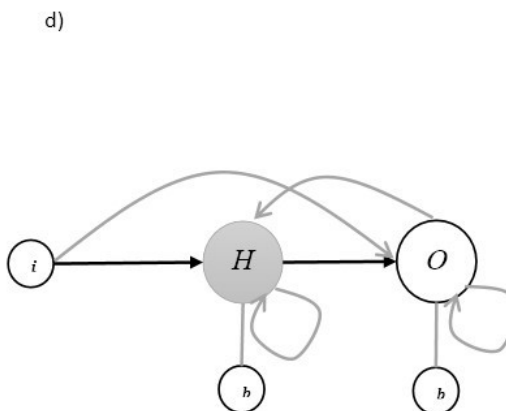
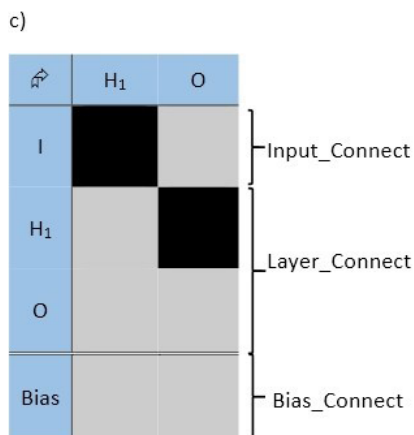
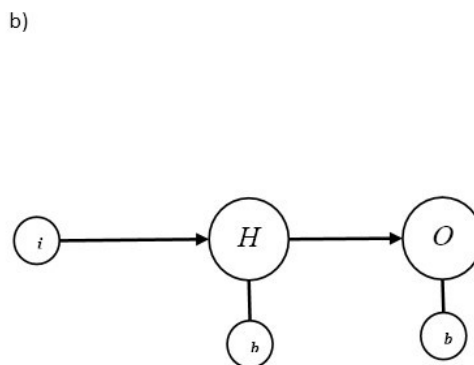
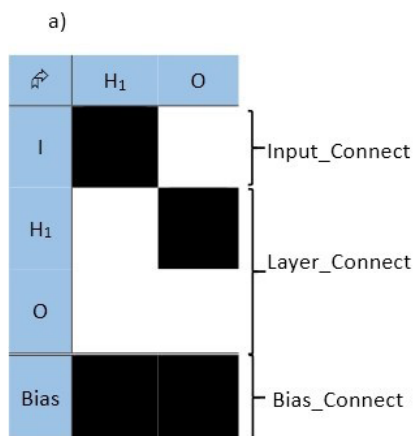
صحت تشخیص در طبقه بندی روی داده های آموزش می باشد.

به منظور ارزیابی رفتار تعمیمی شبکه (در هر دو حالت MLP و SCNN) روی داده های مختلف و پیشگیری از پیش برآزش شبکه، از اعتبارسنجی متقابل یکی را کنار بگذار (LOOCV)^۵ استفاده شده است. در این روش، مجموعه داده دارای N نقطه، N بار شبکه تحت آموزش و آزمایش قرار می گیرد بدین ترتیب که در هر بار شبکه با N-1 نقطه آموزش داده شده و با یک نقطه کنار گذاشته شده، آزمایش می شود. بدین ترتیب در نهایت ماتریس سردرگمی با استفاده از نتایج به دست آمده از N آزمایش تک نقطه ای حاصل می شود. در مطالعه حاضر N=9 برابر با نه طيف به دست آمده از سرطانهای متاستاز یافته از منشأهای متفاوت می باشد.

یافته ها

طيفهای به دست آمده پس از انجام پیش پردازش در شكل ۲ نشان داده

5. Leave One Out Cross Validation



شكل ۱: (a) ماتریس هیئتون شبکه MLP، (b) دیاگرام اتصالات شبکه MLP، (c) ماتریس هیئتون شبکه SCNN، (d) دیاگرام اتصالات شبکه SCNN. در تمام شکل ها مواردی که به صورت خاکستری رنگ نشان داده شده است، نشان دهنده عدم قطعیت آن می باشد.

جدول ۱: ماتریس سردرگمی تمایز مبدأ متاستاز با MLP

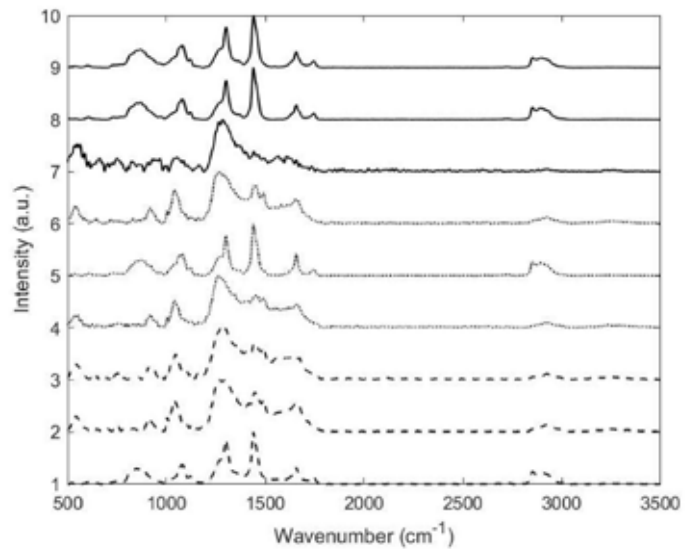
Target \ Output	G	B	C	
G	1	1	2	0.25
B	0	0	0	0.00
C	2	2	1	0.20
	0.33	0.00	0.33	0.22

جدول ۲: ماتریس سردرگمی تمایز مبدأ متاستاز با SCNN

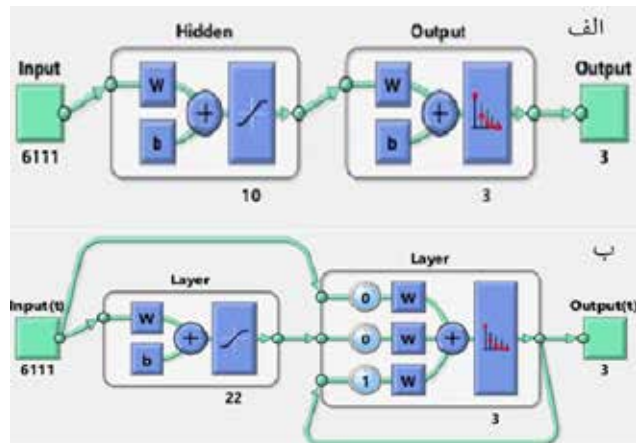
Target \ Output	G	B	C	
G	3	1	0	0.75
B	0	2	0	1.00
C	0	0	3	1.00
	1.00	0.66	1.00	0.89

که ۸۵-۹۰ درصد می باشد [۱]، قابل رقابت است. و این درحالی است که طیف سنجی رامان می تواند به صورت کاملاً غیرتهاجمی انجام شود. اگر چه بدیهی است جهت مقایسه دقیق این دو روش و اثبات برتری هریک نسبت به دیگری لازم است مطالعه ای در شرایط کاملاً مشابه از نظر سایر پارامترها انجام گیرد.

شبکه عصبی خودسازنده (SCNN) که دارای ساختار بهینه شونده منطبق با داده می باشد، به عنوان نسل جدیدی از شبکه های عصبی در این مطالعه به کار گرفته شد و قدرت عملکرد آن در مقایسه با شبکه MLP رایج مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که با استفاده از شبکه SCNN نتایج بسیار مطلوب تری از نظر صحت طبقه بندی حاصل می شود. به طوری که این شبکه قادر شد که با وجود محل و حالت پاتولوژیکی (سرطانی بودن) یکسان تمام نمونه ها به تفاوت های منشأ آن ها متمرکز شود و با وجود حجم کم داده ها با تمرکز بر این تفاوت ها تمایز مطلوبی را



شکل ۲: طیف های رامان به دست آمده از نمونه ها پس از پیش پردازش. طیف های شماره ۱ تا ۳ (خط چین) مربوط سرطان متاستاز یافته روده بزرگ، شماره ۴ تا ۶ (نقطه چین) مربوط به سرطان متاستاز یافته پستان و شماره ۷ تا ۹ مربوط به سرطان متاستاز یافته معده به عدد لنفاوی می باشد.



شکل ۳: ساختار شبکه الف (MLP) و ب (SCNN) به دست آمده روی کل داده ها

برابر ۲۲ درصد ایجاد نموده است، صحت طبقه بندی با شبکه SCNN به مقدار قابل قبول ۸۹ درصد ارتقاء یافته است.

بحث

در این مطالعه مسئله یافتن منشأ سرطان های متاستاز یافته با منشأ اولیه نامعلوم (CUP) توسط طیف سنجی رامان و شبکه های عصبی مصنوعی مورد بررسی قرار گرفت و موفق شدیم طیف های رامان به دست آمده از سرطان های متاستاز یافته به عدد لنفاوی از سه منشأ متفاوت معده، پستان و روده بزرگ را با صحت ۸۹ درصد متمایز سازیم. این نتایج با نتایج به دست آمده با استفاده از بیان ژن در تشخیص مبدأ اولیه تومور

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نشان داده شد که با به‌کارگیری الگوریتم‌های مناسب هوش مصنوعی در پردازش طیف‌های رامان می‌توان از این تکنیک به‌طور مؤثری در شناسایی منشأ اولیه سرطان‌های متاستاز یافته که نقش مهمی در طراحی درمان این سرطان‌ها و در نتیجه نجات جان بیماران دارد، بهره برد. به‌طور خاص در این مطالعه تمایز ۸۹ درصد بین سرطان‌های متاستاز یافته به غدد لنفاوی از سه منشأ معده، پستان و روده بزرگ با بهره‌گیری از شبکه عصبی خودسازنده (SCNN) در تفکیک طیف‌های رامان به دست آمده از نمونه‌ها ممکن شد.

حاصل نماید. علت این قدرت را می‌توان در توانایی شبکه عصبی در یافتن مرزهای تمایز غیر غطی بین دسته‌ها دانست که با برقراری امکان اتصالات بیشتر از اعم از بازگشتی و آبخاری در شبکه SCNN قدرت شبکه در یافتن مرزهای پیچیده‌تر تمایز بین دسته‌ها افزایش می‌یابد و توسط الگوریتم بهینه‌سازی (الگوریتم ژنتیک) به مرزهای بهینه هدایت می‌شود.

مطالعه حاضر نشان داد که بهره‌گیری از طیف‌سنجی رامان که اطلاعات بسیاری از ساختار مولکولی نمونه به‌دست می‌دهد، به‌همراه استفاده از روش‌های مناسب هوش مصنوعی می‌تواند در تشخیص بیماری و حتی مسائل بغرنجی همچون سرطان‌های متاستاز یافته با منشأ اولیه نامعلوم (CUP) راه‌حل‌های عملی به‌دست دهد و این درحالی است که در روشی همچون شبکه عصبی مصنوعی که بدون نیاز به اطلاعات زمینه‌ای چندان، به‌صورت جعبه سیاه عمل می‌کند، نیاز به تفسیر داده‌های نسبتاً پیچیده به‌دست آمده از طیف‌سنجی نیز مرتفع می‌شود و لذا برای استفاده از آن نیاز به آموزش و تخصص کمتر می‌گردد و دسترسی عمومی به خدمات پزشکی را تسهیل می‌نماید.

از جمله مشکلات مطالعه متاستاز، دستیابی به نمونه‌های بافتی به جهت نرخ کمتر وقوع نسبت به سرطان‌های غیر متاستاز یافته و نیز اندازه نمونه کم در بسیاری از موارد است که از جمله در این مطالعه موجب محدودیت در تعداد نمونه‌ها شده است. که در این مطالعه با به‌کارگیری روش ارزیابی متقابل یکی را کنار بگذار سعی شده است تا این مشکل حتی‌الامکان تأثیر کمتری بر نتایج و تعمیم آن داشته باشد. علاوه بر آن که باتوجه به استفاده از نتایج آزمایش پاتولوژی به‌عنوان استاندارد طلایی در مقایسه نتایج و عدم انجام هرگونه جداسازی و یا وارد نمودن پارامترهای جانبی در انتخاب نمونه‌ها، احتمال تکرار نتایج در صورت انجام همین مطالعه روی جامعه آماری بزرگ‌تر بیشتر می‌شود.

مقایسه مطالعه حاضر با سایر مطالعات سرطان مبتنی بر رامان به‌دلیل متفاوت بودن شرایط اعم از نوع بافت، تعداد نمونه‌ها، نوع طیف‌سنجی، پیش‌پردازش‌ها، پردازش‌های انجام شده و ... عملاً ممکن نیست و به‌علاوه برطبق جستجوهای انجام شده، مطالعه مشابهی در خصوص تعیین منشأ سرطان با استفاده از طیف‌سنجی رامان تاکنون انجام نشده است. اما، در شبیه‌ترین مطالعات به مطالعه حاضر، طبقه‌بندی بر روی سرطان‌های متاستاز یافته به مغز با استفاده از تصویربرداری طیف‌سنجی IR انجام شده است و نتایج امیدوارکننده‌ای با استفاده از خوشه‌بندی تصاویر و سپس طبقه‌بندی حاصل شده است [۲۴ و ۲۵]. لیکن در مطالعات ذکر شده از تصویربرداری IR استفاده شده است که طبیعتاً نیاز به طیف‌سنجی‌های بسیار بیشتر نسبت به طیف‌سنجی نقطه‌ای دارد و زمان طولانی‌تری در ارزیابی طلب می‌کند. درحالی‌که در مطالعه حاضر صدر مطلوبی از تمایز با طیف‌سنجی نقطه‌ای حاصل شده است.

References:

- Hainsworth JD, Greco FA. Cancer of Unknown Primary Site. The American Cancer Society's Oncology in Practice 2018; 645-60.
- Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. European journal of cancer (Oxford, England: (1990). 2003; 39(14): 1990-2005. Epub 2003/09/06. PubMed PMID: 12957453.
- Pavlidis N, Fizazi K. Carcinoma of unknown primary (CUP). Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2009;69(3):271-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.09.005>.
- Mahadevan-Jansen A, Richards-Kortum RR. Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers. BIOMEDO. 1996; 1: 31-70.
- Mahadevan-Jansen A, Richards-Kortum R. Raman spectroscopy for cancer detection: a review. Engineering in Medicine and Biology Society, 1997 Proceedings of the 19th Annual International Conference of the IEEE. 1997; 6: 2722-8.
- Haka AS, Shafer-Peltier KE, Fitzmaurice M, Crowe J, Dasari RR, Feld MS. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005; 102(35): 12371-6.
- Tu Q, Chang C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2012; 8(5): 545-58.
- Kallaway C, Almond LM, Barr H, Wood J, Hutchings J, Kendall C. Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2013;10. doi: [10.1016/j.pdpdt.2013.01.008](https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.01.008). PubMed PMID: 23993846.
- Kong K, Kendall C, Stone N, Notingher I. Raman spectroscopy for medical diagnostics—From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. Advanced drug delivery reviews. 2015; 89: 121-34.
- Wang W, Zhao J, Short M, Zeng H. Real-time in vivo cancer diagnosis using raman spectroscopy. Journal of biophotonics. 2015; 8(7): 527-45.
- Austin LA, Osseiran S, Evans CL. Raman technologies in cancer diagnostics. Analyst. 2016; 141: 476-503.
- Santos IP, Barroso EM, Bakker Schut TC, Caspers PJ, van Lanschot CGF, Choi D-H. Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics. Analyst. 2017; 142(17): 3025-47. doi: [10.1039/C7AN00957G](https://doi.org/10.1039/C7AN00957G).
- Dehghani-Bidgoli Z, Baygi M, Hosein M, Kabir E, Malekfar R. Common Raman Spectral Markers among Different Tissues for Cancer Detection. Iranian Journal of Medical Physics. 2014; 11(4): 308-15.
- Haka AS, Volynskaya ZI, Gardecki JA, Nazemi J, Shenk R, Wang N. Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis. BIOMEDO. 2009; 14(5): 054023.
- Gebrekidan MT, Erber R, Hartmann A, Fasching PA, Emons J, Beckmann MW. Breast Tumor Analysis Using Shifted-Excitation Raman Difference Spectroscopy (SERDS). Technology in Cancer Research & Treatment. 2018;17:1533033818782532.
- Bergholt MS, Zheng W, Lin K, Ho KY, Teh M, Yeoh KG. In vivo diagnosis of gastric cancer using Raman endoscopy and ant colony optimization techniques. International journal of cancer. 2011; 128: 2673-80.
- Isabelle M, Dorney J, Lewis A, Lloyd GR, Old O, Shepherd N. Multi-centre Raman spectral mapping of oesophageal cancer tissues: a study to assess system transferability. Faraday discussions. 2016; 187: 87-103.
- Jermyn M, Mok K, Mercier J, Desroches J, Pichette J, Saint-Arnaud K. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. Science translational medicine. 2015; 7: 274ra19-ra19.

19. Jermyn M, Desroches J, Mercier J, Tremblay M-A, St-Arnaud K, Guiot M-C. Neural networks improve brain cancer detection with Raman spectroscopy in the presence of operating room light artifacts. *BIOMEDO*. 2016; 21: 94002.

20. Zhao J, Zeng H, Kalia S, Lui H. Wavenumber selection based analysis in Raman spectroscopy improves skin cancer diagnostic specificity. *Analyst*. 2016; 141: 1034-43.

21. Zhang J, Fan Y, Song Y, Xu J. Accuracy of Raman spectroscopy for differentiating skin cancer from normal tissue. *Medicine*. 2018;97(34):e12022. doi: 10.1097/md.00000000000012022. PubMed PMID: 00005792-201808240-00102.

22. Lewis IR, Edwards H. *Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line*: CRC Press; 2001.

23. Krishna H, Majumder SK, Gupta PK. Range-independent background subtraction algorithm for recovery of Raman spectra of biological tissue. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2012; 43: 1884-94.

24. Krafft C, Shapoval L, Sobottka SB, Geiger KD, Schackert G, Salzer R. Identification of primary tumors of brain metastases by SIMCA classification of IR spectroscopic images. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006;1758(7):883-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.001>.

25. Krafft C, Shapoval L, Sobottka SB, Schackert G, Salzer R. Identification of primary tumors of brain metastases by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. *Technology in cancer research & treatment*. 2006; 5(3): 291-8.