ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

На правах рукописи

Кандурова Ксения Юрьевна

МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО АНАЛИЗА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХИ НА ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И ДИФФУЗНО-ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

2.2.12. Приборы, системы и изделия медицинского назначения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель: кандидат технических наук, доцент Потапова Елена Владимировна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА 1. АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО
СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ
1.1 Анатомические особенности и функции печени
1.2 Особенности нарушений функционального состояния печени при
механической желтухе
1.3 Обзор методов диагностики функционального состояния печени
1.3.1 Лабораторная диагностика
1.3.2 Инструментальные методы
1.3.3 Динамические тесты
1.3.4 Прогностические шкалы и системы классификации
1.3.5 Экспертная оценка уровня ошибок диагностики функционального состояния
печени
1.4 Оптические методы диагностики
1.4.1 Флуоресцентная спектроскопия
1.4.2 Спектроскопия диффузного отражения
1.5 Оценка возможностей флуоресцентных методов в исследовании
энергетического состояния клеток
1.6 Постановка задачи диссертационного исследования
ГЛАВА 2. УСТРОЙСТВО ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И ДИФФУЗНО-
ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ
2.1 Спектрофотометрические исследования оптических характеристик
паренхимы печени
2.2 Исследования основных флуорофоров тканей печени
2.3 Волоконно-оптический зонд для флуоресцентной и диффузно-отражательной
спектроскопии
2.4 Устройство флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии 91

2.5 Оценка чувствительности канала флуоресцентной спектроскопии к
метаболическим изменениям в биологических тканях
2.6 Выводы по главе 2
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО
СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ МЕХАНИЧЕСКОЙ
ЖЕЛТУХИ
3.1 Методика проведения исследования
3.2 Анализ результатов экспериментальных исследований для подбора
параметров флуоресцентной спектроскопии
3.3 Анализ результатов исследований методами флуоресцентной и диффузно-
отражательной спектроскопии пациентов с положительной и отрицательной
динамикой состояния после билиарной декомпрессии
3.4 Выводы по главе 3
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО АНАЛИЗА
ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ
МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХИ
4.1 Построение модели классификации с применением линейного
дискриминантного анализа
4.2 Верификация, оценка чувствительности и специфичности полученных
моделей классификации
4.3 Синтез итоговых моделей классификации для дифференциального анализа
функционального состояния печени пациентов с синдромом механической
желтухи
4.4 Метод дифференциального анализа функционального состояния печени
пациентов с синдромом механической желтухи
4.5 Выводы по главе 4
ЗАКЛЮЧЕНИЕ
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ153

Приложение А. Акт об использовании результатов научно-исследовательствения приложения при	кой
работы в БУЗ Орловской области «ООКБ»	192
Приложение Б. Акт о внедрении результатов НИР в ООО НПП «ЛАЗМА»	194

ВВЕДЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена решению научно-технической задачи разработки метода дифференциального анализа функционального состояния печени на основе флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии для прогнозирования отрицательной динамики послеоперационного состояния пациентов с механической желтухой (МЖ).

Актуальность темы.

В последние годы прослеживается тенденция роста заболеваемости органов гепатопанкреатобилиарной зоны. Особое место в абдоминальной хирургии занимает диагностика и лечение заболеваний, осложненных непроходимостью желчных путей [1]. Синдром МЖ сопутствует большому количеству патологий гепатобилиарной системы, являясь причиной высокой смертности [2]. Развитие МЖ приводит к печеночной недостаточности (ПН), при которой наблюдается снижение или полное нарушение одной, нескольких или всех функций печени. Прогрессирование ПН ухудшает состояние всего организма, что может привести к летальному исходу. Хирургическое лечение основной патологии при синдроме МЖ влечет за собой больший риск послеоперационных осложнений. В связи с этим одним из первых шагов в терапии является как можно более ранняя декомпрессия желчных протоков, направленная на остановку прогрессирования осложнений [3].

В последние годы все чаще используется двухэтапная тактика лечения, которая предполагает купирование холестаза в ходе миниинвазивных оперативных заболевания вмешательств cлечением основного после регресса гипербилирубинемии [4,5].Одним вариантов ИЗ является антеградная декомпрессия желчных протоков под ультразвуковым и рентгенологическим контролем. Однако среди специалистов ведутся дискуссии о роли оперативных дренирующих манипуляций и о том, что не все подобные вмешательства приводят к стабилизации состояния пациентов [3,6–9]. Существует предположение, что это обусловлено функциональным состоянием печени на момент проведения оперативного вмешательства [10]. Под функциональным состоянием печени понимается комплексная характеристика, включающая выполняемые печеночные функции и совокупность отражающих их признаков. В частности, билиарная обструкция нарушает прежде всего секреторную и экскреторную печеночные функции, что отражается на результатах лабораторных и инструментальных исследований и позволяет судить о нарушении функционального состояния. Тем не менее, несмотря на разнообразие и высокий уровень современных методов диагностики, применяемых для обследования пациентов с синдромом МЖ (лабораторные И инструментальные методы, клинические наблюдения, прогностические шкалы и системы классификации), определение степени и прогнозирование течения ПН, развивающейся на фоне билиарной гипертензии, остается сложной и нерешенной задачей в ходе лечения.

Степень разработанности темы исследования.

Среди инструментальных методов исследования актуальным направлением разработки являются оптические методы диагностики, отличающиеся высокой информативностью, предоставляющие возможности вне рамок традиционных лабораторно-инструментальных исследований и зарекомендовавшие себя во многих областях биомедицинских исследований. Преимущества оптических технологий также связаны с низкой стоимостью оборудования и процедуры исследования, высокой производительностью и безопасностью, простотой обучения методике проведения измерений. Спектроскопические методы также могут быть интегрированы в стандартные хирургические инструменты и подведены к труднодоступным анатомическим областям благодаря использованию волоконно-оптических зондов различных конфигураций.

В настоящее время технологии оптической спектроскопии используются для решения задач в широком диапазоне медицинских и биологических приложений, в том числе в области хирургии печени. Метод флуоресцентной спектроскопии (ФС), основанный на освещении биологических тканей монохроматическим излучением и регистрации переизлученного в форме флуоресценции света, используется для оценки вкладов отдельных флуорофоров и анализа особенностей метаболических процессов при заболеваниях печени. Метод спектроскопии диффузного отражения

(СДО), построенный на изучении закономерности отражения полихроматического света от биообъектов, используется для анализа *in vivo* сатурации тканей печени.

Ряд ученых внесли вклад В развитие основ проектирования спектроскопических устройств, интерпретации результатов и разработку широкого числа медицинских приложений (В.В. Тучин [11], S. Jacques и В. Pogue [12]), в том числе хирургических. Устройства ФС и СДО способны реализовать задачи оценки и определения характера патологических изменений в тканях. Мониторинг флуоресценции тканей методом ФС рассматривается как мощный инструмент выявления нарушений клеточного метаболизма и обнаружения гипоксии, что было продемонстрировано и описано вместе с основами построения диагностических систем в работах коллективов под руководством А. Mayevsky [13,14], К. Koenig [15], J. Lakowicz [16], N. Ramanujam [17] и других. Большой вклад в исследование флуоресцентных свойств печени и развитие подхода к оценке отдельных вкладов основных эндогенных флуорофоров как биомаркеров функционального состояния печени при интраоперационной диагностике, в том числе более специфичных для печени билирубина и витамина А, внесли исследователи под руководством А.С. Croce и G. Bottiroli [18–22]. Использование СДО также показывает возможности для in vivo выявления патологических изменений (опухоли печени, стеатоз) за счет мониторинга изменения содержания основных тканевых хромофоров – гемоглобина, воды, липидов, билирубина (R. Nachabé [23], М. Nogueira [24], N. Reistad [25]). Т.к. методы ФС и СДО имеют свои отличия в используемых оптических явлениях и получаемой диагностической информации (преимущественно метаболические или структурные изменения), особый интерес представляет взаимодополнение их возможностей в рамках мультимодального подхода (В.В. Тучин, В.П. Захаров и J. Popp [26,27], I. Georgakoudi [28]), применение которого для печени широко показано преимущественно для дифференциации онкологических тканей.

Несмотря на накопленный теоретический материал, многие работы преимущественно рассматривали исследования на животных моделях и открытых вмешательствах на них, либо при резекциях с возможностью сравнения

характеристик полученного образца *ex vivo* с гистологическим материалом, либо уже существует задел для оптической диагностики миниинвазивных вмешательств печени (V. Dremin [29*], E. Zherebtsov [30*]), но не рассмотрены конкретно случаи, осложненные синдромом МЖ.

Таким образом, использование методов ФС и СДО, позволяющих получить информацию о метаболических и структурных изменениях в биологических тканях in vivo, представляется как одно из направлений повышения информативности существующих диагностических алгоритмов определения функционального печени у пациентов с синдромом МЖ. Усовершенствование диагностических алгоритмов с включением в них оптических технологий направлено на повышение качества лечения, под которым понимается оптимизация сроков диагностики и сокращение длительности лечения, а, следовательно, и затрат ресурсов лечебного учреждения, получения дополнительной за счет диагностической информации и ее использования для выбора индивидуальной лечебной тактики на как можно более раннем этапе, исходя из выявленного состояния пациента.

Объект исследования.

Функциональное состояние печени человека.

Предмет исследования.

Спектры флуоресценции и диффузного отражения печени, используемые для получения диагностических критериев для метода дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ.

Цель диссертационной работы.

Разработка метода дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ на основе новых диагностических критериев, полученных методами флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии, для повышения качества лечения пациентов с синдромом МЖ за счет прогнозирования динамики состояния в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии.

Задачи диссертационной работы.

- 1) Обзор и анализ нарушений функционального состояния печени при синдроме МЖ, проблем их диагностики, методов диагностики функционального состояния печени, используемых в настоящее время в клинической практике, а также спектроскопических методов, применяемых в исследованиях функционального состояния печени.
- Обоснование специализированных медико-технических требований (MTT) мультимодальному устройству флуоресцентной диффузноотражательной спектроскопии с учетом экспериментально полученных оптических характеристик паренхимы печени, для дальнейшей регистрации спектров флуоресценции и диффузного отражения, на основании которых формируется пространство диагностических признаков разработки ДЛЯ метода дифференциального анализа функционального состояния печени.
- 3) Регистрация в клинических условиях и сравнительный анализ спектров флуоресценции и диффузного отражения печени пациентов с синдромом МЖ для формирования пространства диагностических признаков, необходимых для разработки модели классификации пациентов с синдромом МЖ для выявления отрицательной динамики состояния в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии.
- 4) Разработка моделей классификации для прогнозирования отрицательной динамики послеоперационного состояния больных с синдромом МЖ, основанных на регистрации спектров флуоресценции и диффузного отражения и выделении параметров вкладов кривых, отражающих флуоресценцию отдельных эндогенных флуорофоров, в общий спектр флуоресценции и тканевой сатурации.
- 5) Разработка метода дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ различной этиологии и тяжести состояния для выявления отрицательной динамики состояния в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии на основе разработанных моделей классификации по данным спектров флуоресценции и диффузного отражения.

Научная новизна работы.

- 1) Предложена модель оптических характеристик паренхимы печени, основанная на применении модели диффузионного приближения теории переноса излучения, базирующаяся характеристиках, полученных на оптических экспериментально и отличающихся пониженным вкладом гемоглобина крови, и позволяющая учитывать различия в тканевой сатурации и содержании основных тканевых хромофоров паренхимы печени (гемоглобина в крови, воды, липидов, билирубина в желчи) для имитации патологических состояний, которые могут сопровождать синдром механической желтухи, учет которых необходим для обоснования специализированных медико-технических требований к устройствам на основе флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии для дифференциального анализа функционального состояния печени и определения пространства диагностических признаков.
- 2) Предложены модели классификации для прогнозирования отрицательной динамики послеоперационного состояния больных с синдромом МЖ, основанные на линейном дискриминантном анализе и применении параметров из пространства диагностических признаков, рассчитываемых либо по спектрам флуоресценции для источников излучения 365 нм и 450 нм (площади под выделенными гауссовыми кривыми, отражающими вклад флуоресценции билирубина), либо по спектрам флуоресценции для источника излучения 450 нм (площадь под кривыми интенсивности флуоресценции в диапазоне 565-600 нм) и спектрам диффузного отражения в диапазоне 400-1000 нм (тканевая сатурация), и позволяющие проводить дифференциальный анализ с уровнями чувствительности 0,88 и 0,85, специфичности 0,90 и 0,91, значением площади под ROC-кривой 0,91 и 0,94, для каждой из моделей соответственно.
- 3) Предложен метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи различной этиологии и тяжести состояния, базирующийся на применении флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии *in vivo* во время первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей под ультразвуковым и рентгенологическим

контролем, основанный на расчете параметров из пространства диагностических признаков по спектрам флуоресценции для источников излучения 365 нм и 450 нм и диффузного отражения в диапазоне 400-1000 нм, и применении двух разработанных моделей классификации, позволяющий врачу-хирургу получать диагностическую информацию о предполагаемом характере послеоперационного периода пациента и прогнозировать отрицательную динамику состояния непосредственно во время хирургического вмешательства с вероятностью ложноотрицательного результата менее 0,2 (0,12 и 0,15 в зависимости от используемой модели).

Соответствие паспорту специальности 2.2.12. Приборы, системы и изделия медицинского назначения.

Область исследования соответствует пунктам направлений исследований:

- 14. Методы, модели и алгоритмы, включая распознавание образов, для медицинских информационных и интеллектуальных систем обеспечивающих повышение эффективности медико-биологических исследований и врачебных решений;
- 22. Специальное программное обеспечение, предназначенное для профилактики, диагностики, лечения и медицинской реабилитации заболеваний, мониторинга состояния организма человека и проведения медицинских исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1) Модель оптических характеристик паренхимы печени, основанная на уравнении диффузионного приближения теории переноса излучения, позволяет определять коэффициенты поглощения, рассеяния и глубину распространения излучения оптического излучения для различного уровня тканевой сатурации и содержания крови, воды, липидов и желчи, возможного при патологических состояниях печени, которые могут сопровождать синдром механической желтухи, тем самым применяется для обоснования специализированных медикотехнических требований к устройствам на основе флуоресцентной и диффузноотражательной спектроскопии для дифференциального анализа функционального

состояния печени и определения пространства диагностических признаков для разработки модели классификации пациентов в зависимости от динамики послеоперационного состояния. (Соответствие пункту 14 паспорта специальности).

- 2) Модели классификации для прогнозирования отрицательной динамики послеоперационного состояния больных с синдромом механической желтухи, базирующиеся на линейном дискриминантном анализе и применении параметров из пространства диагностических признаков, рассчитываемых из спектров флуоресценции для длин волн возбуждения 365 и 450 нм (площади под выделенными гауссовыми кривыми, отражающими вклад флуоресценции билирубина), либо из спектров флуоресценции для длины волны возбуждения 450 нм (площадь под кривыми интенсивности флуоресценции в диапазоне 565-600 нм) диффузного отражения (тканевая сатурация), позволяют И проводить дифференциальный анализ состояния пациентов с чувствительностью 0,88 и 0,85, специфичностью 0,90 и 0,91, площадью под ROC-кривой 0,91 и 0,94, для каждой 14, 22 ИЗ моделей соответственно. (Соответствие пунктам паспорта специальности).
- 3) Метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи различной этиологии и тяжести состояния, базирующийся на применении флуоресцентной и диффузноотражательной спектроскопии in vivo во время первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей под ультразвуковым и рентгенологическим контролем, позволяет в режиме реального времени рассчитывать параметры из пространства диагностических признаков, входящие в две модели классификации, предоставить врачу-хирургу дополнительную диагностическую информацию о предполагаемой динамике послеоперационного состояния пациента и тем самым снизить вероятность ложноотрицательного определения состояния пациента после первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей до уровня менее 0,2 (0,12 и 0,15 в зависимости от используемой модели). (Соответствие пунктам 14, 22 паспорта специальности).

Теоретическая значимость.

Предложен и научно обоснован новый подход к дифференциальному анализу функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ, основанный на интраоперационной регистрации спектров флуоресценции и диффузного отражения и рассчитываемых на их основе параметрах вкладов флуоресценции эндогенных флуорофоров печени и тканевой сатурации. Предложенные параметры положены в основу моделей классификации и нового метода дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ различной этиологии и тяжести состояния, который позволяет определить отрицательную динамику состояния пациентов в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии во время хирургического вмешательства, что может быть использовано врачом-хирургом в качестве дополнительной диагностической информации в дальнейшем для корректировки тактики лечения и повышения его эффективности индивидуально для каждого пациента.

Практическая значимость.

Практическая значимость исследования И полученных результатов обусловлена интересом практикующих врачей-хирургов БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница» (г. Орел, Россия) во внедрении новых диагностических технологий дифференциального анализа функционального состояния печени в клиническую практику с целью достижения наилучших МЖ результатов оперативного лечения синдрома счет выбора персонализированной лечебной тактики на как можно более раннем этапе, исходя из состояния пациента.

Результаты диссертационного исследования прошли апробацию на базе отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница» (в апробации приняли участие 40 пациентов), а также внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» при подготовке магистров по направлению 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии» (направленность «Фотоника и электроника в медико-биологической практике») и

специалистов по направлению 31.05.01 «Лечебное дело» (направленность «Лечебное дело»). Проведена научно-исследовательская работа по апробации и внедрению результатов на базе ООО НПП «ЛАЗМА».

Полученные результаты использованы при выполнении работ по темам: «Клинико-экспериментальное обоснование многопараметрической оптической биопсии органов гепатопанкреатодуоденальной зоны при малоинвазивных хирургических операциях» в рамках гранта РНФ № 18-15-00201 (2018-2020 гг.); «Разработка мультимодальной оптической диагностической технологии для структурно-функционального состояния печени при пункционной биопсии» в рамках гранта РНФ № 21-15-00325 (2021-2023 гг.); «Оптические свойства паренхимы печени и желчи как прогностические признаки печеночной этиологии недостаточности И диагностические маркеры обструктивного поражения желчевыводящих путей при механической желтухе» в рамках гранта РНФ № 23-25-00487 (2023-2024 гг.); «Механизм нейродегенерации: древняя молекула как необходимый элемент физиологии и патологии клеток мозга» в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации №075-15-2024-011 (2024-2026 гг.); «Оптическая система экспресс-диагностики опухолей печени» в рамках гранта Фонда содействия инновациям по программе «Студенческий стартап» № 235ГССС15-L/78517 (2022-2023 гг.).

Достоверность полученных результатов.

Достоверность представленных результатов диссертационного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных методов спектрофотометрии и спектроскопии, полученных на сертифицированных оптических приборах, а также их соответствием результатам других работ в данной области исследования. Основные результаты работы опубликованы в российских и международных рецензируемых научных журналах.

Методы исследования.

Для решения задач исследования применялись оптические методы ФС и СДО (in vivo исследования на модельных животных и исследования пациентов в условиях клиники), спектрофотометрии (ex vivo исследования на модельных животных). Результаты работы получены на основе методов прикладной математической статистики, экспертного оценивания, методов аналитического моделирования спектров поглощения и диффузного отражения на основе закона Бугера-Ламберта-Бера и модели диффузионного приближения теории переноса Обработка излучения, линейного дискриминантного анализа (ЛДА). экспериментальных осуществлялась c помощью программного данных обеспечения OriginPro, MATLAB и с использованием среды разработки Spyder на языке программирования Python.

Личный вклад автора.

Личный вклад автора заключается в проведении обзора литературных источников по текущему состоянию диагностики функционального состояния печени и прогнозирования ПН у больных с синдромом МЖ; формулировке специализированных МТТ к устройству на основе флуоресцентной и диффузноотражательной спектроскопии, необходимому для регистрации данных в рамках поставленной задачи; в планировании и проведении экспериментальных исследований в клинических условиях; сравнительном анализе, в представлении и интерпретации результатов, в разработке критериев для моделей классификации и метода дифференциального анализа функционального состояния печени на основании проведённой аналитической работы. Результаты работы получены автором лично либо при его непосредственном участии. Постановка задач диссертационного исследования и обсуждение результатов проводились совместно с научным руководителем.

Апробация результатов диссертационной работы.

Апробация результатов диссертационной работы проведена на базе отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница».

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 11 международных и 9 всероссийских конференциях, в том числе: Международная конференция Saratov Fall Meeting (2020-2024 – Саратов, Россия); Всероссийская научно-техническая конференция молодых учёных И специалистов «Биотехнические, медицинские, экологические системы и робототехнические комплексы» (2020-2022 – Рязань, Россия); Международная научно-техническая конференция «Современные технологии в задачах управления, автоматики и обработки информации» (2020 – Россия); Международная конференция European Conferences on Biomedical Optics (2021 – Мюнхен, Германия), Всероссийский конгресс молодых учёных (2022 – Санкт-Петербург, Россия), Международная научная конференция «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии – ФРЭМЭ» (2022 – Владимир-Суздаль, Россия); Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (2020-2022 – Самара, Россия); Современные методы исследования в клеточной биологии и медицине (2023 – Орел, Россия); V Международная научная конференция «Наука будущего» и VIII Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – наука молодых» (2023 – Орел, Россия); Всероссийская научная конференция с международным участием «Невская фотоника» (2023 – Санкт-Петербург, Россия); Международная конференция «Laser Optics (ICLO 2024)» (2024 – Санкт-Петербург, Россия).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 34 работы, из которых 8 работ в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, входящих в Перечень ВАК, и 11 статей, индексируемых в наукометрических базах Web of Science/Scopus (3 статьи в рецензируемом журнале 1-ого квартиля). Получен 1 патент (№ 2709830) и 2 свидетельства о регистрации программы для ЭВМ (№ 2023666425; № 2025613551).

Объём и структура диссертационной работы.

Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы, включающего 323 наименования, и изложена на 195 страницах машинописного текста, содержит 44 иллюстрации и 19 таблиц.

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ

1.1 Анатомические особенности и функции печени

Печень является крупнейшим внутренним органом (в среднем 1,5 кг, 2-3 % от массы тела) и жизненно важной железой внешней секреции. Печень расположена под диафрагмой в брюшной полости, преимущественно в правом подреберье. Поверхность печени покрыта слоем соединительной ткани, которая окружает ветви печеночной артерии, воротной вены и желчных протоков, а также срастается с висцеральной брюшиной. Анатомически печень разделена на правую и левую доли фальциформной связкой. Правая доля является более крупной, чем левая, составляющая не более 20-25 % от размера правой доли. Также существует разделение по схеме К. Куино (рисунок 1.1а) на 8 сегментов, каждый из которых обладает относительно независимым кровоснабжением, иннервацией, оттоком желчи и лимфы. Левая (I-IV сегменты) и правая (V-VIII сегменты) половина разделяются от ямки желчного пузыря слева до нижней полой вены и отличаются от анатомических левой и правой долей. Правая половина составляет 55-60 % от массы печени [31,32].

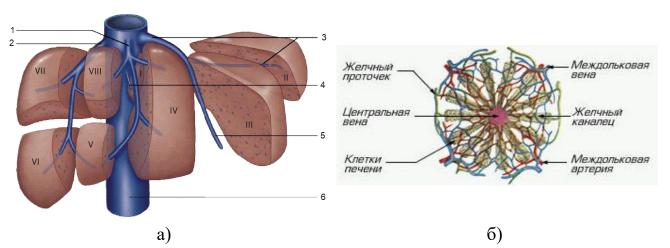


Рисунок 1.1 – Анатомия печени: сегменты печени относительно основных кровеносных сосудов [31] (a) и строение дольки печени (б) [33]

Клетки печени можно разделить на клетки паренхимы (гепатоциты), выполняющие основные метаболические функции, и непаренхиматозные (холангиоциты, звездчатые клетки, клетки Купфера, синусоиндые эпителиальные клетки и др.) [34]. Гепатоциты составляют 60-80 % объема печени человека и являются крупными клетками многоугольной формы диаметром 20-25 мкм. У клеток выделяют 2 поверхности — билиарную (вырабатывает желчь, которая отводится по желчным капиллярам) и васкулярную (обеспечивает обмен веществами между гепатоцитом и кровью в синусоидальном капилляре).

Основной структурной единицей печени является печеночная долька (рисунок 1.16) диаметром 1-2 мм, образованная из радиально расположенных рядов гепатоцитов — печеночных пластинок. Печеночные пластинки расположены между синусоидными капиллярами, а внутри пластинки имеется пространство желчного капилляра. Дольки отделены друг от друга тонким слоем соединительной ткани, в которой по углам имеются печеночные триады [35]. Триада состоит из междольковых вены и артерии (ток крови в которых направлен в центральную вену), а также междолькового желчного протока (в которые стекает желчь из желчных капилляров).

Стенка синусоидного капилляра состоит из эпителиальных клеток и клеток Купфера – макрофагов, являющихся частью врожденного иммунитета [36]. Между стенкой синусоидного капилляра и васкулярной стороной гепатоцитов выделяется пространство Диссе, в котором содержится плазма крови, отростки клеток Купфера, звездчатые клетки и ретикулярные волокна. В пространстве Диссе происходит обмен веществами между гепатоцитами и кровью. Звездчатые клетки (клетки Ито) накапливают липиды и витамин А, а также синтезируют коллаген III, формирующий ретикулярные волокна [37].

Строение печеночной дольки отражает отличительную особенность печени — высокое кровенаполнение (до 30% объема) и двойное кровоснабжение [38]. Из печеночной артерии, разветвляющейся до междольковых артерий, для питания гепатоцитов поступает 25-30 % насыщенной кислородом крови. Оставшиеся 70-75 % крови поступают из желудочно-кишечного тракта по воротной вене,

разделяющейся до междольковых вен [31]. Венозная кровь содержит поглощенные извне вещества, продукты жизнедеятельности микроорганизмов, токсины и т.д., которые поглощаются гепатоцитами. Продукты жизнедеятельности гепатоцитов и питательные вещества секретируются в кровь. Артериальная и венозная кровь смешиваются и выводятся центральными венами долек печени, собирающимися в печеночные вены, и в конечном итоге — в нижнюю полую вену.

Гепатоциты вырабатывают желчь — секрет, необходимый для пищеварения: эмульгирования жиров, нейтрализации соляной кислоты, активации ферментов панкреатического и кишечного соков, стимулирования моторики кишечника [39]. Желчь выводится по желчным капиллярам и внутрипеченочным желчным протокам, состоящим из холангиоцитов и объединяющимся в правый и левый желчные протоки. Выходя из печени, они образуют общий желчный проток, выходящий в просвет двенадцатиперстной кишки [38]. От общего желчного протока отходит проток к желчному пузырю, в котором накапливается запас желчи для пищеварения. Желчь на 95 % состоит из воды, остальные 5 % — неорганические и органические вещества (желчные кислоты и соли, фосфолипиды, электролиты, билирубин, протеины, витамины) [40].

Печень выполняет большое количество физиологических функций [32]:

- метаболическая: обмен углеводов (участие в поддержании уровня глюкозы в крови), белков (синтез и катаболизм белков и нуклеопротеидов), липидов (синтез, накопление и расщепление жирных кислот), регуляция уровня холестерина плазмы крови, ферментативный обмен, обмен витаминов A, B, D, E, K и фолиевой кислоты, минеральный и водный обмен;
- депонирующая: пополнение и хранение резервов гликогена, витаминов (A, B12, D, E, K), белков, жиров, гормонов и микроэлементов (железа, меди и кобальта), которые в случае необходимости поступают в кровь;
- желчеобразующая (секреторная) и желчевыделительная (экскреторная):
 образование желчи, которая участвует в процессах пищеварения и выводит метаболиты, в том числе токсичные. Захваченный из крови неконьюгированный (несвязанный, непрямой) билирубин, который образуется при разрушении

эритроцитов и является токсичным, коньюгируется с глюкуроновой кислотой и выводится с желчью в нетоксичной форме (связанный, прямой);

- детоксикационная: обезвреживание и удаление токсичных веществ,
 поступающих в организм с пищей или образовавшихся в кишечнике, а также
 избытков гормонов, медиаторов, витаминов, продуктов обмена веществ, удаление
 из крови эмульгированных и конъюгированных веществ;
- гомеостатическая: поддержание постоянного состава крови, образование эритроцитов в эмбриональном периоде, регуляция кроветворения через обмен витамина В12 и железа; хранение значительного объёма крови, который может быть выброшен в сосудистое русло при кровопотере или шоке;
 - терморегуляционная: печень вырабатывает большое количества тепла.
- 1.2 Особенности нарушений функционального состояния печени при механической желтухе

Среди патологических состояний печени особое место занимает желтуха. Желтуха (рисунок 1.3) — симптомокомплекс, характеризующийся желтой окраской кожи, склер и слизистых оболочек по причине повышенной концентрации желчных компонентов в сыворотке крови и биологических жидкостях [41,42].

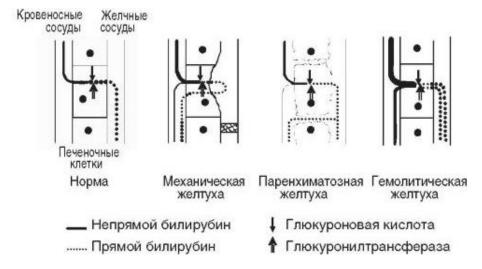


Рисунок 1.2 – Схематичное представление видов желтухи [43]

Выделяют 3 вида желтух — надпеченочная (гемолитическая, при которой количество поступающего в печень неконьюгированного билирубина превышает её возможности по коньюгации и транспорту), печеночная (паренхиматозная, вследствие повреждения печени при вирусных и токсических поражениях, циррозе, новообразованиях) и подпеченочная (механическая).

В последние годы прослеживается тенденция роста заболеваемости патологиями, сопровождающимися развитием подпеченочной желтухи. МЖ, или обтурационная желтуха, составляет 65 % среди всех причин развития желтухи и 18 % от общего количества случаев патологий желчевыводящих протоков [44,45]. Ежегодно число больных с синдромом МЖ в Российской Федерации увеличивается на 800 тысяч [1,2].

Синдром МЖ развивается в результате нарушения оттока желчи по желчевыводящим путям в двенадцатиперстную кишку. Синдром МЖ может возникнуть в результате пороков развития, закупорки желчных протоков при доброкачественных (желчнокаменная болезнь, стриктуры желчных протоков, стеноз) и воспалительных заболеваниях (острый холецистит, холангит, панкреатит, кисты головки поджелудочной железы), росте злокачественных опухолей (печени, внутри- и внепеченочных желчного протоков, большого дуоденального сосочка, поджелудочной железы). Наиболее распространенными причинами являются желчнокаменная болезнь (40-60 %) и опухоли (20-58 %) [41,43,44], причем женщины более склонны к развитию камней в желчном пузыре. До 30 лет в качестве основной причины синдрома МЖ чаще диагностируют желчнокаменную болезнь; в возрасте старше 40 лет преобладают опухоли [44].

При нарушении оттока желчи повышается давление в желчных протоках (билиарная гипертензия) и градиент концентрации конъюгированного билирубина. Происходит нарушение секреции гепатоцитов, т.к. для выделения желчи требуется преодолевать все большее сопротивление. В начале развития синдрома МЖ гепатоциты способны вырабатывать желчь, но отток по протокам уже нарушен. Контакты между гепатоцитами нарушаются, из-за чего желчь поступает обратно в гепатоциты, пространства Диссе, лимфатические щели и кровь. Содержание

билирубина и желчных кислот в плазме крови и тканях повышается, при этом уменьшается или прекращается поступление в кишечник. При достаточно высоком давлении возможен разрыв стенок желчных капилляров и протоков [42,43].

При прогрессировании синдрома МЖ нарушается крово- и лимфообращение в печени, что вместе с длительным воздействием желчных кислот и солей приводит мембран холангиоцитов, повреждениям клеточных гепатоцитов воспалительному процессу, дистрофическим изменениям и некрозу [2,40]. У пациентов наблюдаются признаки как внепеченочного (проявляется повышением давления в желчных протоках) и внутрипеченочного холестаза (по причине повреждения гепатоцитов) [46]. При этом секреция билирубина и желчных кислот может полностью прекратиться, что приведет к обесцвечиванию желчи [2]. Дисфункция гепатоцитов приводит к нарушению детоксикационной функции. Развитие нарушений функции печени начинает затрагивать весь организм, вследствие чего возникает ПН. Гепатоциты истощаются и дегенерируют, также нарушается функция нефронов в почках, что ведет к развитию печеночнопочечного синдрома. Токсические вещества проникают через гематоэнцефалический барьер, что проявляется печеночной энцефалопатией.

Диагностика и лечение основного заболевания, сопровождающегося синдромом МЖ, остается актуальной проблемой абдоминальной хирургии. Хирургическое лечение основной патологии у пациентов с синдромом МЖ влечет за собой больший риск послеоперационных осложнений по сравнению с пациентами без синдрома МЖ, в связи с чем одним из главных шагов является декомпрессия билиарной системы [3]. В последние годы все чаще используется двухэтапная тактика лечения, которая предполагает как можно более раннее купирование холестаза в ходе миниинвазивных вмешательств для остановки прогрессирования осложнений, в частности ПН, с последующим лечением основной причины после регресса гипербилирубинемии [4,6]. Статистические данные об оперативных вмешательствах показывают рост числа проведенных дренирующих операций при синдроме МЖ в период 2020-2023 гг. [5].

Широкое применение получила процедура антеградной декомпрессии желчных протоков под рентгенологическим и ультразвуковым контролем. Однако до сих пор ведутся дискуссии о роли и последовательности диагностических и лечебных процедур, методах декомпрессии желчных протоков и их влиянии на развитие ПН и прогноз дальнейшего состояния больного [3,6–9]. Так, по различным данным внедрение миниинзавиных хирургических процедур приводит к снижению числа осложнений и летальных исходов, но ряд источников отмечает, что по этим показателям данные процедуры не отличаются от традиционных хирургических операций по поводу декомпрессии желчных протоков [9,47–50]. Отмечается, что не все дренирующие манипуляции приводят к купированию гипербилирубинемии и/или стабилизации состояния пациентов [51].

Существует предположение, что исход лечения обусловлен в том числе функциональным состоянием печени на момент проведения оперативного вмешательства [10]. Под функциональным состоянием понимается комплексная характеристика, включающая выполняемые печенью функции и совокупность отражающих их признаков. В частности, билиарная обструкция нарушает прежде всего секреторную и экскреторную функции, что отражается на результатах лабораторных и инструментальных исследований и позволяет судить о нарушении функционального состояния органа.

Несмотря на высокий уровень современных методов диагностики синдрома МЖ, последующее определение общего состояния пациентов и прогнозирование степени ПН для достижения лучших результатов лечения остается сложной задачей. Своевременная оценка функционального состояния печени при диагностике и последующем лечении синдрома МЖ является важной задачей, поскольку нарушение проходимости желчевыводящих путей приводит к дисфункции гепатоцитов и нарушению функций печени. Возникающие в печени тяжелые гемодинамические, метаболические, коагуляционные и иммунные осложнения могут привести к опасным для жизни функциональным и морфологическим нарушениям в послеоперационном периоде [52–54].

1.3 Обзор методов диагностики функционального состояния печени

Для выбора метода дальнейшей терапии, прогнозирования течения как синдрома МЖ, так и основного заболевания, что необходимо для достижения наилучших результатов лечения, врачу важно иметь представление о происходящих в в паренхиме печени патологических изменениях [55]. Интенсивность и скорость патологических изменений зависят от степени нарастания билиарной гипертензии, тяжести гемодинамических нарушений и гипоксии, наличия воспаления в протоках и длительности патологии в целом [56].

При лечении патологий, осложненных синдромом МЖ, диагностика и ПН прогнозирование основаны данных клинических наблюдений, на лабораторных и инструментальных исследований. При поступлении больного в стационар у него в обязательном порядке проводят общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи [44]. В качестве основных маркеров синдрома МЖ и ПН рассматриваются уровни общего и прямого билирубина, щелочной фосфатазы (ЩФ), (АЛТ), печеночных ферментов аланинаминотрансферазы аспартатаминотрансферазы (АСТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [57].

Инструментальная диагностика основана на применении медицинской визуализации, радионуклидных методов, в ряде случаев — пункционной биопсии и лапароскопии, и направлена на выявление причины синдрома МЖ, подтверждения наличия и степени выраженности обструкции желчных протоков, определения точной локализации и степени основной причины синдрома МЖ [42,44]. Также применяются динамические пробы функции печени [58,59].

Поскольку синдром МЖ вызывает тяжелые гемодинамические, метаболические, коагуляционные и иммунные изменения во всем организме, для оценки тяжести гепатоцеллюлярной дисфункции используются прогностические шкалы и системы, позволяющие формализовать оценку состояния пациента на основании включения нескольких количественных и качественных показателей и присвоения им цифровой величины [60].

Однако перечисленные инструменты оценки функциональных резервов, секреторной и экскреторной функции печени дают приблизительные косвенные результаты. Таким образом, для практикующего врача-хирурга актуальной остается задача поиска дополнительных объективных критериев для своевременной диагностики прогрессирования ПН и разработки технологий для использования в рутинной клинической практике.

1.3.1 Лабораторная диагностика

Основными задачами лабораторной диагностики являются определение вероятной причины нарушения проходимости желчевыводящих путей, степени тяжести желтухи, а также поражения других органов и нарушений в системе гемостаза [46,61]. Для этого проводятся общий и биохимический анализ крови, коагулограмма и общий анализ мочи [62].

Маркером холестаза является повышение содержания в крови и моче билирубина, уробилиногена, желчных кислот, холестерина, фосфолипидов, βлипопротеидов. В норме содержание общего билирубина в крови составляет до 20,5 мкмоль/л, около 75 % из которых составляет неконъюгированная фракция [1,42,63]. Повышение содержания билирубина происходит в основном за счет конъюгированной фракции, однако при длительном течении патологии начинает увеличиваться вклад неконъюгированной формы. По уровню общего билирубина оценивается степень тяжести синдрома МЖ:

- 1) до 85 мкмоль/л легкая;
- 2) 86-169 мкмоль/л средняя;
- 3) более 170 мкмоль/л тяжелая.

Существуют биохимические классификации степени ПН по уровню общего билирубина в крови, например, классификация В.П. Зиневича [2]:

- 1) 21-50 мкмоль/л І стадия (компенсированная);
- 2) 51-100 мкмоль/л ІІ стадия (субкомпенсированная);
- 3) 101-200 мкмоль/л III стадия (декомпенсированная);

4) более 201 мкмоль/л – IV стадия (терминальная).

Маркерами холестаза и цитолиза при синдроме МЖ также являются повышение активности ЩФ и уровня ферментов АЛТ, АСТ и ЛДГ [64]. У ряда больных отмечается повышение содержания гамма-глютамилтрансферазы, особенно при опухолевой этиологии или наличии гнойного холангита [1,62]. Для дифференциальной диагностики причин синдрома МЖ также дополнительно проводятся исследования на содержание онкомаркеров и антител — маркеров гепатита с помощью иммуноферментного анализа [46,62].

В общем анализе мочи отмечается повышение уровня конъюгированного билирубина при снижении уробилиногена и отсутствии неконъюгированного билирубина. Повышение уровня креатинина свидетельствует о развитии ПН [61].

Интерес представляет изучение состава желчи. Оценка содержания билирубина в желчи не широко распространена в клинике, однако является перспективным направлением. Состав желчи непосредственно отражает функциональное состояние гепатоцитов и холангиоцитов будучи продуктом жизнедеятельности печени, в связи с чем представляет интерес его изучение для оценки секреторной и экскреторной функции печени, прогнозирования и определения тяжести и прогрессирования патологий печени [40,65,66]. Оценка содержания компонентов желчи находит применение в диагностике и лечении желчекаменной болезни [67,68],прогнозировании послеоперационных осложнений при гепатэктомии и трансплантации печени [40,69,70].

1.3.2 Инструментальные методы

В диагностике причин синдрома МЖ и динамики развития ПН применяется несколько групп инструментальных методов. Для визуализации преимущественно используются ультразвуковые и рентгенологические методы, магнитнорезонансная томография (МРТ) [1,44,71].

Ультразвуковое исследование (УЗИ) позволяет обнаружить расширение внутрипеченочных желчных протоков, присутствие камней в желчном пузыре или

протоках, новообразования в брюшной полости, хорошо визуализирует скопления жидкости [72]. УЗИ позволяет с высокой чувствительностью (98-99 % при желчнокаменной болезни, 64-70 % при опухолях) и специфичностью (85-90 %) [73–76] определить факт обструкции и этиологию синдрома МЖ [44,61]. При диагностике камней внепеченочных желчных путей, а также при дистальном блоке, если причина синдрома МЖ остается не ясна после применения других инструментальных методов диагностики, применяется эндоскопическое УЗИ.

ряде случаев применяется режим эластографии (рисунок 1.3). Эластография также основана на свойстве механических колебаний распространяться в среде с разной скоростью в зависимости от упругости и плотности, однако позволяет количественно измерить модуль эластичности Юнга. При исследовании оценивается плотность ткани печени, которая изменяется при наличии диффузных изменений. Применение эластографии направлено на быстрое выявление фиброза, цирроза или гепатита [77,78].

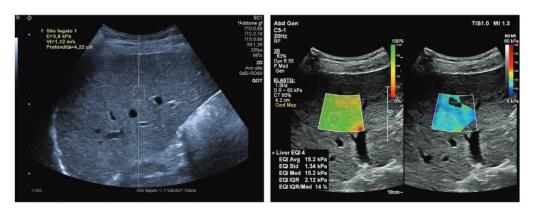


Рисунок 1.3 – Пример УЗИ и эластографического исследования печени [79]

Преимуществами УЗИ является скорость исследования, широкая доступность в лечебных учреждениях, меньшие экономические затраты на оборудование и дополнительные расходные материалы, отсутствие лучевой нагрузки [62,80].

Основными недостатками являются зависимость от опыта врача и подготовленности пациента к исследованию. По сравнению с томографическими методами УЗИ обеспечивает получение менее четкого изображения исследуемого

участка, ограниченного характеристиками датчика [78]. Вследствие этого и влияния анатомических особенностей при различных этиологиях, в некоторых случаях чувствительность УЗИ может варьировать в диапазоне от 20-32 до 100 % [78,81].

Для более точного определения причины и локализации билиарной обструкции в дополнение к УЗИ органов брюшной полости может выполняться исследование методом компьютерной томографии (КТ) или мультиспиральной КТ (рисунок 1.4) с внутривенным контрастированием [46,61,78].

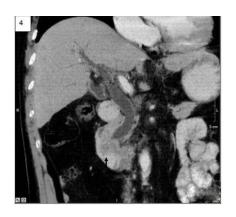


Рисунок 1.4 – Изображение, полученное с помощью мультиспиральной КТ [82]

Метод позволяет получать изображения в высоком разрешении, лучше визуализировать мелкие структуры, характеризуется высокой диагностической эффективностью (чувствительность 74-96 %, специфичность 90-94 %) [82–85] в диагностике причин синдрома МЖ и определении стадии опухолевого процесса (точность 80,5-97%) [82,86,87]. КТ не является основным методом скрининга при синдроме МЖ, но позволяет более точно оценить уровень блока и характер обструкции. Метод особенно эффективен при подозрении на опухоль [78,88].

Помимо общих ограничений (лучевой нагрузки, необходимости введения рентгеноконтрастного вещества, меньшей доступности метода вследствие его дороговизны), КТ не является достаточно эффективной для диагностики причин синдрома МЖ доброкачественного генеза. Т.к. в 60-80 % случаев желчные конкременты являются рентгенонегативными, это снижает чувствительность метода для данных патологий [62,78,81]. КТ рекомендуется к выполнению

преимущественно при подозрении на опухолевую этиологию МЖ или иную патологию органов брюшной полости [46,61].

Из доступных на настоящий момент методов МРТ брюшной полости и магнитно-резонансная холангиопанкреатография (МРХПГ, рисунок 1.5) обладают большей разрешающей способностью и высокими значениями чувствительности (81-100 %), специфичности (85-100 %) и диагностической точности (89-100 %).

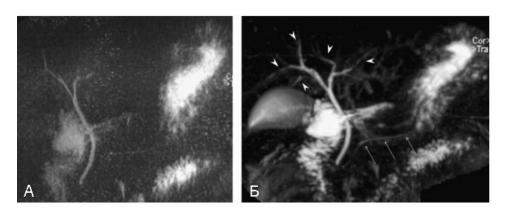


Рисунок 1.5 – Двумерное (а) и трехмерное (б) изображение гепатопанкреатобилиарной зоны во время исследования методом МРХПГ [89]

МРХПГ рекомендуется, когда УЗИ и КТ не позволяют точно установить причины и уровень билиарной обструкции [61]. Преимуществами МРХПГ являются: отсутствие лучевой нагрузки; уровень точности, сопоставимый с инвазивными процедурами эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии (ЭРХПГ) и чрескожной чреспеченочной холангиографии (ЧЧХГ); возможность визуализации структуры органов и желчных протоков с высокой детализацией [88].

Для предоперационной диагностики изменений метаболического состояния печени развиваются подходы к применению функциональной МРТ (ввод контрастных веществ, применение специализированных протоколов исследований с различными импульсными последовательностями, обработка полученных изображений и расчет показателей, характеризующих функции печени) [90,91].

К ограничениям метода относят: большую длительность исследования, которая может приводить к артефактам движения при реконструкции изображения,

а в ряде случаев быть дискомфортной для пациентов из-за замкнутого пространства (для аппаратов закрытого типа) и шума, меньшую распространенность и экономическую доступность, невозможность проведения исследования при наличии металлических имплантатов, кардиостимуляторов и прочих изделий, в отдельных случаях — технические ограничения конструкции аппарата. Также отдельно для МРХПГ отмечают трудность визуализации незначительных стриктур и конкрементов [81].

К инвазивным методам оценки морфологического и функционального состояния печени (такие как биопсия и диагностическая лапароскопия) прибегают в тех в случаях, когда лабораторные и неинвазивные методы визуализации не позволяют установить этиологию желтухи [62,78]. Биопсия и лапароскопия представляют риски, например развитие холангита [92].

ЭРХПГ (рисунок 1.6a) — рентген-эндоскопический метод исследования желчных протоков и протока поджелудочной железы с контрастированием, выполняемый через большой дуоденальный сосочек.



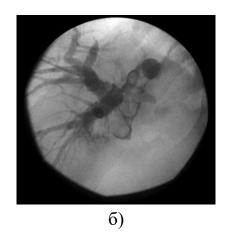


Рисунок 1.6 – ЭРХПГ при МЖ, вызванной холедохолитиазом (a) [82], ЧЧХГ при проведении наружной чрескожно-чреспеченочной холангиостомии (б) [93]

ЭРХПГ ранее считалась золотым стандартом диагностики заболеваний желчного пузыря, желчных протоков и поджелудочной железы, однако частично утратила этот статус с точки зрения исключительно диагностического применения из-за риска тяжелых осложнений (острый панкреатит, холангит, кровотечения,

перфорация) [81,94]. Процент осложнений достигает 5-20 % [95,96], что вместе с развитием неинвазивных методов визуализации ограничило применение метода. При наличии возможности проведения исследований неинвазивными методами выполнение диагностической ЭРХПГ без лечебных манипуляций не рекомендуется. Метод требует проведения опытным врачом.

Аналогично ЭРХПГ, ЧЧХГ (рисунок 1.6б), подразумевающая визуализацию желчных протоков в ходе инвазивной процедуры введения рентгеноконтрастного вещества при чрескожной пункции брюшной стенки, утратила исключительно диагностическое значение. В настоящее время данные процедуры рассматриваются как первый этап хирургического минимально инвазивного лечения пациентов с синдромом МЖ [61,78].

1.3.3 Динамические тесты

Т.к. результаты лабораторных исследований позволяют оценить состояние по значениям параметров в момент забора образцов, для диагностики функции печени во времени также могут применяться динамические функциональные тесты, основанные на измерении времени, необходимого печени для метаболизма или выведения лекарственных средств или других веществ. Данные тесты можно повторять в течение короткого промежутка времени, тем самым можно обеспечить диагностику и прогнозирование функционального состояния печени [59].

Для исследования функционального состояния печени в динамике в ряде диагностических задач может применяться метод динамической гепатобилисцинтиграфии. Метод основан на поглощении из крови и экскреции с желчью радиофармпрепаратов, наблюдении за их перераспределением в печени и билиарной системе. Степень накопления радиофармпрепаратов в гепатоцитах и скорость выведения отражает функциональное состояние печеночных клеток [97,98]. К недостаткам метода можно отнести необходимость применения радиофармпрепаратов, накладывающую дополнительные противопоказания к процедуре, стоимость процедуры, длительность исследования.

Более безопасным и распространенным динамическим методом диагностики является клиренс-тест (оценка скорости очищения от какого-либо вещества в ходе метаболизма и секреции) с индоцианином зеленым (indocyanine green, ICG, ИЦЗ) (рисунок 1.7). ИЦЗ — водорастворимый краситель, который связывается с белками плазмы крови, не метаболизируется печенью и выводится с желчью.

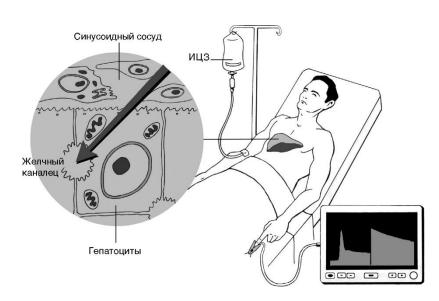


Рисунок 1.7 – Принцип проведения исследования функционального состояния печени в динамике методом клиренс-теста с ИЦЗ [99]

Содержание ИЦЗ определяется неинвазивно методами фотометрии и пульсовой денситометрии. ИЦЗ максимально поглощает свет на длине волны 800 нм, максимум эмиссии флуоресценции — 830 нм [97]. Оцениваются параметры минутного клиренса и остаточной концентрации ИЦЗ в плазме крови через 15 минут после введения. Клиренс-тест отражает экскреторную функцию печени, обеспечивает диагностику ее функциональных резервов и степени ПН на момент исследования и демонстрирует достаточно высокую точность (чувствительность до 86%, специфичность до 90%). Несмотря на простоту выполнения, диагностическую ценность и низкую токсичность ИЦЗ, отмечаются ограничения метода в определении незначительной печеночной дисфункции и неоднозначность прогностического значения данного теста [97,100—102].

1.3.4 Прогностические шкалы и системы классификации

Для диагностики тяжести ПН и прогнозирования течения заболевания врачи используют прогностические шкалы, модели и системы, опирающиеся на различный набор клинических наблюдений и результатов лабораторных и Шкалы обладают клинических исследований. различными чувствительности и специфичности, а также в целом дают косвенные результаты. В связи с этим применяются как общепринятые критерии для оценки функционального состояния печени, так И составляются оригинальные классификации для синдрома МЖ. Ряд общепринятых шкал используется преимущественно для оценки функциональных резервов печени, тяжести ПН и рисков при планировании операционных вмешательств [103].

Одной из распространенных шкал для оценки тяжести состояния пациентов является классификация Чайлда-Пью (Child-Pugh), разработанная в 1960-70 гг. и используемая для определения тяжести циррозов печени и выживаемости пациента, в том числе после оперативного лечения (таблица 1.1) [104,105].

Таблица 1.1 – Классификация по шкале Чайлда-Пью [106]

Показатель	Баллы			
Hokasarenb	1	2	3	
Асцит	нет	небольшой	умеренный / большой	
Печеночная энцефалопатия	нет	небольшая / умеренная	умеренная / выраженная	
Уровень общего билирубина, мг/дл	< 2,0	2-3	> 3,0	
Уровень альбумина, мл/л	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8	
Удлинение протромбинового времени, с	1-3	4-6	> 6,0	

В зависимости от суммарной оценки определяется класс цирроза и выживаемость пациента (5-6 баллов – класс A, около 100%; 7-9 баллов – класс B, 80%; 10-15 баллов – класс C, 45%), а также средняя ожидаемая продолжительность

жизни (<5 баллов – 6,4 года, >12 баллов – 2 месяца) [103,106]. Данная шкала широко распространена, однако обладает рядом ограничений: включает в себя субъективные показатели степени асцита и энцефалопатии, но не учитывает почечную дисфункцию, все показатели включаются в расчет взвешенными в равной степени, может влиять вариабельность результатов биохимического анализа между разными лабораториями [103,107].

Другая шкала оценки — MELD (Model for End Liver Disease — модель терминальной стадии заболевания печени) — также используется преимущественно у пациентов с циррозом печени для определения тяжести состояния и прогнозирования летального исхода [108] через расчет значения по формуле [106]:

$$MELD = 10 \cdot (9,57 \cdot \ln(креатинин, мг/дл) + 0,378 \cdot \ln(общий билирубин, мг/дл) + 1,12 (МНО)) + 6,43 ,$$

где МНО – международное нормализованное отношение.

Данная модель обладает большей достоверностью при прогнозировании летального исхода в течение 3 месяцев и большей воспроизводимостью из-за отсутствия в расчете субъективных параметров [106,109]. К недостаткам можно отнести: необходимость частого пересчета значения индекса для больных с терминальной стадией хронического заболевания печени вследствие нестабильности их состояния; неоднозначность результата из-за отсутствия учета этиологии ПН, почечной дисфункции и использования в качестве параметров уровня креатинина и МНО [103,106,107].

Для оценки функционального состояния печени также может использоваться шкала ALBI (Albumin-Bilirubin — альбумин-билирубин), значение в которой рассчитывается по формуле, включающей два биохимических показателя [110]:

$$ALBI = (0,66 \cdot \log_{10}$$
 общий билирубин, мкмоль/л) + $(-0,0852 \cdot$ альбумин, г/л),

Изначально расчет значения ALBI использовался для прогнозирования функционального состояния печени при гепатоцеллюлярной карциноме, но позже зарекомендовал себя и для других патологий [111]. К преимуществам относят простоту, использование количественных показателей и большую чувствительность к нарушениям на ранних стадиях [110,111]. При этом отмечаются ограничения из-за выбранных биохимических показателей и недостаточно подтвержденной прогностической эффективности [112].

В настоящее время при лечении синдрома МЖ врачи опираются на классификацию ее тяжести, предложенную Э.И. Гальпериным в 2012 г. [113], включенную в клинические рекомендации [46,61]. Данная классификация основана на результатах лабораторных исследований, а также учитывает наличие осложнений, отягощающих протекание синдрома МЖ (таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Показатели, определяющие тяжесть синдрома МЖ

Лабораторные показатели	Степень тяжести синдрома МЖ в баллах		
	1	2	3
Общий билирубин, мкмоль/л	<60	60-200	>200
Общий белок, мкмоль/л	>65	65-55	<55

Такие осложнения, как ПН, холангит, почечная недостаточность, энцефалопатия, желудочно-кишечное кровотечение, учитываются добавлением удвоенного количества баллов, соответствующих уровню общего билирубина (например, для 1 балла за уровень билирубина для одного осложнения добавляется 2 балла). Баллы за 2 и более осложнений пропорционально складываются. Сепсис учитывается как 2 и более осложнений, опухолевый генез — как 1 осложнение.

В зависимости от суммы баллов выделяют три класса (таблица 1.3). Данная классификация позволяет определить тяжесть МЖ, дальнейшую тактику лечения в зависимости от генеза желтухи и наблюдаемых осложнений, спрогнозировать течение послеоперационного периода [113]. В список осложнений, учитываемых при расчете, входит сама ПН, но не проводится прогнозирование ее течения.

Таблица 1.3 – Классификация степеней тяжести синдрома МЖ по Э.И. Гальперину

10	Степень тяжести	Количество	Послеоперационные	Послеоперационная	
Класс	желтухи	баллов	осложнения, % (прогноз)	летальность, %	
A	Легкая	≤ 5	16,3	0,8	
71	Jiei Kun		(благоприятный)	0,0	
В	Средняя	6-15	59	13,6	
	Б Средния 0-13		(сомнительный)	13,0	
C	Тяжелая	≥16	88,4	46,1	
			(неблагоприятный)	10,1	

Для оценки тяжести ПН при синдроме МЖ и прогнозирования исхода заболевания также часто используется классификация, разработанная В.Д. Федоровым и В.А. Вишневским [2]. В таблице 1.4 приведены количественные и качественные показатели, на которых основана данная система оценки тяжести синдрома МЖ.

Таблица 1.4 – Балльная оценка показателей тяжести ПН при синдроме МЖ

Показатели	Степень тяжести в баллах			
	1	2	3	
Длительность желтухи, дни	<7	7-14	>14	
Общий билирубин, мкмоль/л	<100	100-200	>200	
Альбумин-глобулиновый	>1,2	>1.2	0,9-1,2	<0,9
коэффициент		0,5-1,2	⟨0,)	
Наличие неврологической	нет	слегка	выраженная	
симптоматики		выраженная	Быраженная	

Баллы за каждый учитываемый показатель суммируются. Далее, исходя из полученного числа, оценивается степень тяжести ПН при синдроме МЖ и летальность:

- -4-5 баллов; легкая степень, летальность 0%;
- -6-8 баллов; средняя степень, летальность 10,5%;

9-12 баллов; тяжелая степень, летальность 42,9% [97].

Исследователями предлагаются различные подходы к классификации и прогнозированию осложнений и к самому понятию ПН у больных с синдромом МЖ [2,97,114]. Так, в классификации Д.Н. Сизова нарушения функции печени рассматриваются по совокупности признаков (таблица 1.5) [2]:

Таблица 1.5 – Нарушения функции печени по Д.Н. Сизову

Понятие	Признаки	
Дисфункция	- цитолиз (уровни АСТ, АЛТ, сукцинатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы); - билирубинемия (до 60 ммоль/л); - гепатопротекторы.	
Недостаточность	- гипоальбуминемия (<15 г/л); - снижение уровня протромбина (до 60%); - плазмообмен.	
- печеночная кома; - геморрагический синдром; - использование ксеногепатоцитов.		

С.В. Тарасенко, А.А. Натальский и И.А. Луньков предложили классификацию, выделяющую пять стадий ПН [2]:

0 – начальная;

I – манифестации желтухи;

II – полихолическая;

III – гипохолическая;

IV – ахолическая.

Выбор стадии основывается на данных о состоянии желчных протоков по результатам УЗИ, о характере и объеме выделяемой по дренажам желчи, о клинической картине и о результате гистологических исследований [2,97].

1.3.5 Экспертная оценка уровня ошибок диагностики функционального состояния печени

Проведенный обзор существующих методов диагностики функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ показал наличие потребности в методе, как обеспечивающем возможность экономически доступной диагностики с помощью напрямую оцениваемых параметров, так и отличающимся более низкой вероятностью ошибки для конкретной клинической задачи, рассматриваемой в диссертационном исследовании.

При проведении диагностики функционального состояния печени в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии проводится дифференциальный анализ, для которого в качестве нулевой гипотезы примем наличие ухудшения состояния пациента, т.е. отрицательную динамику течения послеоперационного периода. В таком случае результаты диагностики могут оказаться следующими:

- истинно положительные случаи: пациенты с ухудшением состояния в послеоперационном периоде верно атрибутированы в группу наличия отрицательной динамики;
- истинно отрицательные случаи: пациенты с улучшением состояния в послеоперационном периоде верно атрибутированы в группу наличия положительной динамики;
- ложно положительные случаи (ошибка 2-го рода): пациенты с улучшением состояния в послеоперационном периоде неверно атрибутированы в группу наличия отрицательной динамики;
- ложно отрицательные случаи (ошибка 1-го рода): пациенты с ухудшением состояния в послеоперационном периоде неверно атрибутированы в группу наличия положительной динамики.

С точки зрения лечебного процесса последствия ошибки 1-го рода являются более опасными для пациента, так как предполагают пропуск возможного ухудшения состояния из-за прогрессирующей ПН, которое может потребовать

неотложного применения дополнительных лечебных мероприятий (экстракорпоральной детоксикации, интенсивной терапии), именно поэтому уменьшение уровня ошибки 1-ого рода является критически важным.

Для установления текущего и желаемого уровня ошибок при диагностике состояния пациентов с синдромом МЖ в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии было проведено дополнительное экспертное оценивание путем анкетирования \mathbf{c} привлечением группы независимых друг друга, области высококвалифицированных экспертов, компетентных данной исследования.

Минимальное число человек, необходимое для точной оценки без пренебрежения или, наоборот, сильного влияния мнений отдельных экспертов на точность результата оценивания, было вычислено по следующей формуле:

$$n_{min} = 0.5 \cdot \left(\frac{3}{b} + 5\right),\tag{1.3}$$

где b – допустимый уровень ошибки экспертизы ($0 \le b \le 1$).

Таким образом, для значения b=0,2 минимальное количество экспертов составило $n_{min}=10$. В экспертную группу вошли 10 врачей-хирургов, имеющих практический опыт лечения заболеваний осложненных синдромом МЖ, с помощью минимально инвазивных методик, и регулярно сталкивающихся с необходимостью и трудностями диагностики состояния пациента с использованием традиционных методов. Для осуществления оценки был составлен анкетный лист с описанием цели и задач экспертного оценивания, списком основных применяемых терминов и перечнем вопросов к специалистам с возможными вариантами ответов.

Результаты экспертной оценки диагностики функционального состояния печени у пациентов с синдромом МЖ в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии приведены в таблице 1.6.

Таблица 1.6 – Результаты экспертного опроса о вероятности ложноотрицательного результата

Номер эксперта, $i = 1, 2,, n$	Объекты экспертной оценки		
	Текущий уровень вероятности	Максимально допустимый уровень	
	ошибки (<i>j</i> = 1)	вероятности ошибки $(j=2)$	
1	2	3	
1	0,4	0,2	
2	0,3	0,2	
3	0,4	0,2	
4	0,3	0,1	
5	0,4	0,1	
6	0,5	0,2	
7	0,3	0,2	
8	0,4	0,2	
9	0,3	0,1	
10	0,3	0,2	

Ответы, полученные от врачей, обрабатывались по методу для результатов многократных измерений. В первую очередь вычислялось среднее арифметическое $\overline{Q_J}$ массива экспериментальных данных, состоящего из n отдельных независимых значений результата измерения [115]:

$$\overline{Q_J} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Q_{i,j} , \qquad (1.4)$$

где $Q_{i,j}$ – оценка j-го объекта опроса, данная i-м экспертом,

n — число членов экспертной группы.

Среднеквадратическое отклонение (СКО) S_{Q_j} результатов многократных измерений, в свою очередь, было определено по следующей формуле [115]:

$$S_{Q_j} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (Q_{i,j} - \overline{Q_j})^2}.$$
 (1.5)

Для обнаружения и Для выявления и исключения ошибок было выдвинуто предположение, что оценки экспертов распределены согласно нормальному закону. Это предполагает, что среднее арифметическое значение результата измерения подчиняется закону распределения вероятности Стьюдента. Для обнаружения ошибочных оценок использовался критерий Романовского, позволяющий выявить сомнительные результаты, отклоняющиеся от среднего арифметического на величину более tS_{Q_j} , где S_{Q_j} – СКО результата измерения, t – коэффициент Стьюдента (t = 2,3 для N = 10 и доверительной вероятности P = 0,95) [115]. Ни одно из значений $Q_{i,j}$ не отличалось от среднего арифметического $\overline{Q_j}$ больше, чем на величину tS_{Q_j} . Таким образом, можно заключить, что среди оценок экспертов нет ошибочных.

При доверительной вероятности P=0,95 половина доверительного интервала ε_j для определения границ доверительного интервала $\overline{Q_j}-\varepsilon_j$ и $\overline{Q_j}+\varepsilon_j$ была рассчитана по формуле [115]:

$$\varepsilon_j = t S_{\overline{Q_j}},\tag{1.6}$$

где $S_{\overline{Q_J}}$ — стандартное отклонение среднего арифметического.

Стандартное отклонение среднего арифметического $S_{\overline{Q_J}}$ рассчитывалось по формуле:

$$S_{\overline{Q_j}} = \frac{S_{Q_j}}{\sqrt{n}}. (1.7)$$

Параметром, влияющим на точность экспертного оценивания, является степень согласованности мнения экспертов. Для оценки степени согласованности использовался расчет коэффициента вариации [116], при котором степень согласованности оценивается как хорошая, если значение коэффициента не превышает 0,2, и как удовлетворительная, если оно не превышает 0,3. Коэффициент вариации γ_i описывается следующей формулой:

$$\gamma_j = \frac{S_{Q_j}}{Q_i}. (1.8)$$

Результаты расчётов статистических параметров экспертного оценивания вероятности ложноотрицательного результата диагностики функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии представлены в таблице 1.7.

Таблица 1.7 — Обработка результатов экспертного оценивания вероятности ложноотрицательного результата диагностики функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ

Статистические	Объекты экспертной оценки		
параметры экспертного оценивания	Текущий уровень вероятности ошибки $(j=1)$	Максимально допустимый уровень вероятности ошибки $(j=2)$	
$\overline{Q_J}$	0,360	0,170	
S_{Q_j}	0,070	0,048	
tS_{Q_j}	0,161	0,111	
$S_{\overline{Q_J}}$	0,022	0,015	
ε_j	0,051	0,035	
$\overline{Q_j} - \varepsilon_j$	0,309	0,135	
$\overline{Q_j} + \varepsilon_j$	0,411	0,205	
γ_j	0,194	0,284	

Анализ результатов экспертного оценивания позволил сделать следующие выводы:

- 1) Согласно мнению экспертов, текущий уровень вероятности ложноотрицательных результатов при диагностике функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии находится в интервале от 0,31 до 0,41 с доверительной вероятностью 0,95.
- 2) Максимально допустимая вероятность ложноотрицательного результата диагностики функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии не должна превышать 0,21 при доверительной вероятности 0,95. Таким образом, существует необходимость разработки новых диагностических методов и подходов для исследования функционального состояния печени, обеспечивающих дифференциальных анализ с меньшей вероятностью ложноотрицательного результата.
- 3) Коэффициент вариации γ_j составил менее 0,2 для результатов оценки текущего уровня вероятности ложноотрицательного результата диагностики и менее 0,3 для результатов оценки желаемого уровня вероятности ложноотрицательного результата диагностики, что позволяет признать уровень согласованности мнений экспертов удовлетворительным.

1.4 Оптические методы диагностики

Одним из направлений повышения информативности существующих диагностических алгоритмов и внедрения новых диагностических инструментов является применение методов биофотоники. Эти методы основаны на анализе различных физических процессов (рисунок 1.8), возникающих при взаимодействии оптического излучения с биологическими тканями (поглощение, рассеяние, диффузное отражение, флуоресценция, динамическое рассеяние, комбинационное рассеяние и другие [117]), для выявления патологических изменений в режиме реального времени. Технологии оптической диагностики насчитывают большое

количество методов спектроскопии (позволяющих получать спектральную информацию в одной точке исследуемого биологического объекта) и визуализации (позволяющих получать изображение участка или целого исследуемого биологического объекта) и их реализаций [118*,119*], учитывающих специфику диагностики и терапии различных заболеваний, что позволяет решать задачи в широком диапазоне медицинских и биологических приложений, в том числе в областях хирургии [120*–122] и онкологии [123,124].

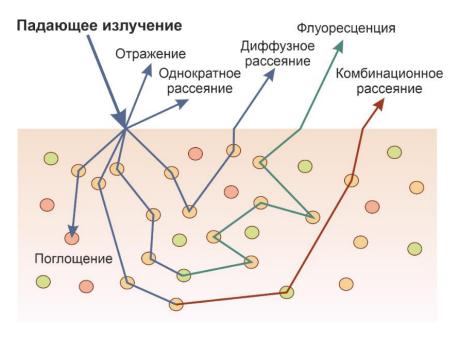


Рисунок 1.8 — Схематическое изображение видов взаимодействий оптического излучения с биологическими тканями

Преимущества оптических технологий также обусловлены рядом факторов: низкой стоимостью оборудования что обеспечивает экономическую доступность исследовательских процедур; высокой производительностью за счет скорости исследования; безопасностью; относительной простотой обучения медицинского персонала. Методы биофотоники позволяют оценивать различные параметры метаболического, структурного и функционального состояния тканей.

В гепатологии оптические методы диагностики продемонстрировали свои возможности для *in vivo* анализа изменений сатурации тканей печени при развитии опухолевого процесса [29*,125], выявления метаболических изменений при

прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени от ранних стадий стеатоза до стеатогепатита и фиброза [20,126], росте злокачественных новообразований [30*,127]). Ведутся исследования для задач дифференциации как незатронутой паренхимы печени, доброкачественных и злокачественных тканей [29*,30*,128], так и для интраоперационной классификации типов первичных опухолей печени и метастазов [129], оценки и определения характера повреждения незлокачественных тканей печени на фоне онкологической патологии [130].

Для решения проблемы поиска дополнительных объективных критериев с целью своевременной диагностики наличия ПН и прогнозирования изменений функционального состояния печени после билиарной декомпрессии в качестве варианта аналогично возможно рассматривать спектроскопические методы Помимо исследований. описанных возможностей выше немаловажными преимуществами для будущего внедрения в рутинную клиническую практику являются простота приборной реализации технологии, обучения и использования медицинским персоналом, а также возможность доставки оптического излучения через волоконно-оптические зонды, конструктивно совместимые существующими стандартными хирургическими инструментами ДЛЯ миниинвазивных манипуляций.

Особый интерес представляет мультимодальный подход – совместное устройстве. использование нескольких методов исследования одном сочетание Распространенным подходом является флуоресцентных отражательных методов, позволяющих оценивать взаимосвязанные параметры метаболических изменений в митохондриях и нарушений кровенаполнения и сатурации в тканях, ведущих в свою очередь к метаболическим нарушениям [28,131]. Сочетание нескольких взаимодополняющих оптических методов дало возможность предоставления дополнительной диагностической информации в онкологии для различных локализаций злокачественных опухолей [132–135]. В гепатологии с помощью мультимодального подхода также показаны решения задач дифференциации злокачественных тканей [29*,30*] И оценки вызванных прогрессированием фиброза [136].

1.4.1 Флуоресцентная спектроскопия

В настоящее время выделяется большое количество подходов к *in vivo* оптической диагностике в хирургии, основанных на явлении флуоресценции. В частности, одним из наиболее распространенных и простых в реализации является метод ФС.

ФС основана на освещении исследуемой ткани монохроматическим световым излучением в УФ или видимом диапазоне с последующей регистрации спектров возбужденной им экзогенной (после введения и накопления в тканях флуоресцентных красителей с заранее известными оптическими свойствами) или эндогенной флуоресценции (автофлуоресценции, флуоресценции веществ, присуствтующих в тканях) [137].

Биологические ткани обладают сложным химическим составом и содержат множество эндогенных биомаркеров — флуорофоров (рисунок 1.9), — выполняющих определенные роли в биохимических процессах в клетках (участие в метаболических реакциях, элементы структурного строения тканей).

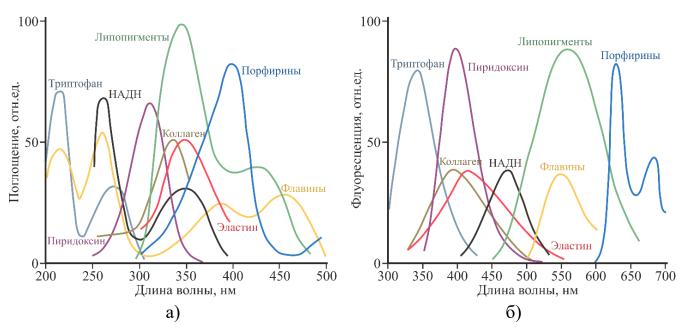


Рисунок 1.9 – Спектры возбуждения (а) и излучения (б) основных эндогенных флуорофоров в биологических тканях (адаптировано из [138])

Каждому из флуорофоров присущи характерные диапазоны возбуждения и эмиссии, квантовые выходы, а также параметры времени жизни флуоресценции в зависимости от их тканевого окружения [139–141], следовательно, изменение их вклада в регистрируемые спектры отражает метаболические и структурные изменения, происходящие в ткани. Применение ФС для решения клинических задач на практике основано на дифференциальном анализе интенсивности и спектрального состава автофлуоресценции тканей в нормальном и патологических (воспаление, некроз, дисплазия, канцерогенез и т.д.) состояниях [142,143].

В ряде случаев для решения задач диагностики или интраоперационной навигации (например, для более четкого выделения кровеносных сосудов) требуется дополнительно выделить отдельные биологические ткани или их области, для чего применяются флуоресцирующие красители. Обнаружение и последующая запись сигналов эндогенной флуоресценции биомаркеров, как правило, представляется более сложной задачей, чем для сигнала флуоресцентного красителя [144].

Первые поисковые исследования возможностей оценки митохондриальной функции оптическими методами на основе автофлуоресценции различных веществ, проводились *in vitro* в 1950-60-е гг. под руководством В. Chance [145,146]. В 1962 г. опубликованы результаты *in vivo* исследования флуоресценции НАДН в тканях мозга и почек [147], а в 1965 г. на примере тканей сердца крысы было продемонстрировано, флуоресценции что мониторинг кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАД) в его восстановленной форме НАДН отслеживать динамику изменений метаболической активности позволяет биологических тканей *in vivo* [148]. Результаты данных исследований по поиску новых путей диагностики состояния биологических тканей по интенсивности их автофлуоресценции [149] заложили основы для развития метода ФС, а также для разработки новых усовершенствования существующих оптических И измерительных приборов.

НАДН, Исследование флуоресценции окисленной формы а также кофермента флавинадениндинуклеотида (ФАД) на протяжении следующих десятилетий и по настоящее время остается одним из наиболее распространенных подходов к оценке интенсивности метаболизма в биологических тканях для диагностики патологических процессов методом ФС [150]. Данные вещества локализуются в митохондриях и цитозоле клеток и участвуют в реакциях энергетического метаболизма, , где функционируют в роли доноров и акцепторов электронов для синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) – одного из ключевых веществ, обеспечивающих протекание биохимических процессов в организме [151]. В ряде исследований под руководством A. Mayevsky было показано, что мониторинг флуоресценции коферментов дыхательной цепи может быть использован для выявления нарушений клеточного метаболизма, обнаружения гипоксии, что в том числе было продемонстрировано коллективом авторов в последующих работах по разработке спектрометров для прикроватного мониторинга состояния больных оптическими методами в режиме реального времени [13,14], а также в целом нашло широкое применение в других исследованиях с помощью метода ФС для решения задач в биологии и медицине [121,152*].

В 80-90 гг. XX века в работах коллектива под руководством R.R. Alfano появляются результаты первых исследований по применению метода ФС для диагностики злокачественных новообразований на примере молочных желез и легких [153,154], в образцах тканей почек, простаты и мочевого пузыря [155]. На этом этапе развития биомедицинской оптики выделяется такое направление, как оптическая биопсия – исследования, ориентированные на разработку и дальнейшее внедрение оптических методов диагностики в клиническую практику с целью получения результата, сопоставимого с результатами традиционных методов морфологического исследования, но без необходимости получения биологического материала в ходе биопсии.

На протяжении десятилетий метод ФС используется для оптической диагностики разнообразных воспалительных и онкологических заболеваний *in vivo* [123,137,143]. Был достигнут значительный прогресс в использовании

автофлуоресценции для выявления опухолей головного мозга [156,157], молочных желез [158,159], легких [160], кожи [161,162], мочевого пузыря [163,164], шейки матки [165], колоректального рака и его метастазов в печень [166,167]. ФС также используется для дифференциации тканей при фотодинамической терапии новообразований (например, коллектив Н.Н. Булгаковой использовал *in vivo* ФС в терапии и лечении опухолей шейки матки [168] и мочевого пузыря [169]).

Ряд исследователей отмечает перспективность внедрения метода ФС в устройствах с оптоволоконными зондами малого диаметра и демонстрирует хорошие результаты для задач получения дополнительной диагностической информации во время забора биоптата, например, из тканей печени [29*], молочных желез [159], легких [170,171].

ФС обладает высокой чувствительностью к метаболическим изменениям и остается перспективным направлением диагностики состояния биологических тканей. Анализ изменения вкладов отдельных флуорофоров (рисунок 1.10), позволяет более точно определить причины и степень изменений функционального тканей, состояния связать изменения оптических характеристик метаболическими И структурными сопровождающими изменениями, патологические процессы и, таким образом, использовать их в качестве критериев для *in vivo* диагностики [15,141,172].

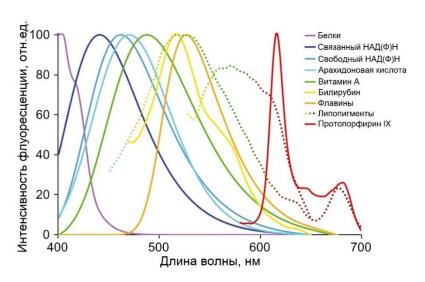


Рисунок 1.10 – Спектры флуоресценции основных эндогенных флуорофоров печени (адаптировано из [173])

Оценка интенсивности флуоресценции веществ, вовлечённых в биохимические реакции в клетках (никотинамиды, флавины, жирные кислоты, билирубин, порфирины и др.), позволяет оценить метаболическое состояние тканей. Содержание флуоресцирующих структурных белков (коллаген и эластин) позволяет выявить структурные изменения, например, рост соединительной ткани при фиброзе [173]. Большой вклад в исследование флуоресцентных свойств печени и развитие подхода к оценке отдельных вкладов основных эндогенных флуорофоров для задач интраоперационной диагностики, в том числе более специфичных для печени билирубина и витамина А, внесли исследователи под руководством А.С. Сгосе (рисунок 1.11).

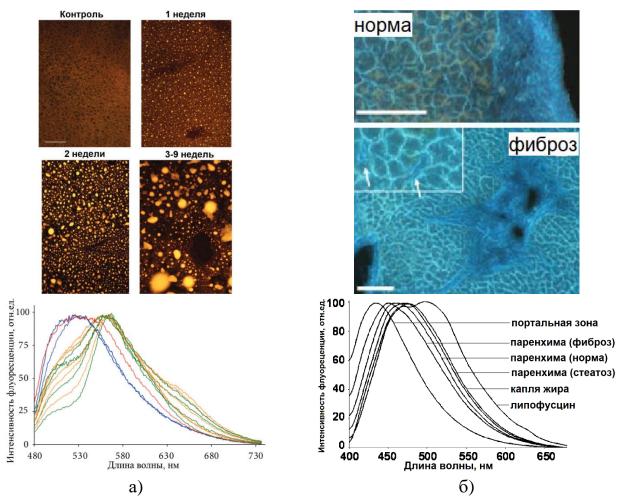


Рисунок 1.11 – Примеры исследования печени методом ФС: сдвиг пика флуоресценции в длинноволновую область и изменение формы спектров при моделировании накопления липидов (а); сдвиг пика флуоресценции при патологих печени (б) [174]

К настоящему времени накоплен обширный теоретический и эмпирический материал по оптическим характеристикам и роли каждого флуорофора на клеточном и тканевом уровне [140,173], проведены исследования на животных моделях патологий печени (рисунок 1.11a) и образцах печени пациентов, полученных в ходе биопсии (рисунок 1.11б) [18–20]. Отдельно рассмотрены вопросы флуоресценции билирубина желчи как биомаркера, отражающего функциональное состояние печени [21,22].

Таким образом, подход к выделению и оценке вкладов отдельных эндогенных флуорофоров в общий сигнал флуоресценции паренхимы печени представляется инструментом с мощным потенциалом для решения различных диагностических задач гепатобилиарной хирургии и представляет интерес для применения у пациентов с синдромом МЖ.

1.4.2 Спектроскопия диффузного отражения

Другим широко распространенным методом оптической диагностики является СДО. Данный метод нашел свое применение для оценки поглощающих и рассеивающих свойств оптически неоднородных сред, к которым в том числе относятся и биологические ткани. В основе измерений лежит явление диффузного отражения, возникающего на поверхности ткани в результате актов поглощения и рассеяния света в широком видимом или ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне на внутренних структурах биологической ткани [175].

Поглощение сопровождается частичным переходом световой энергии в тепловую или колебательную энергию молекул определенных веществ – хромофоров (рисунок 1.12). Биологические ткани содержат ряд хромофоров, концентрация и пространственное распределение которых обуславливает рассеяние и поглощение света в определенных диапазонах длин волн, что может быть использовано для количественного определения их содержания [176]. Самыми важными для жизнедеятельности и часто анализируемыми хромофорами, специфические полосы поглощения света которыми хорошо проявляются на

спектрах диффузного отражения, являются оксигемоглобин, дезоксигемоглобин и вода [177]. В исследованиях кожи также учитывают влияние поглощающих свойств пигмента меланина [178], в исследовании подкожной жировой клетчатки, тканей мозга, поджелудочной и молочных желез и ряда других мягких тканей – липидов [179].

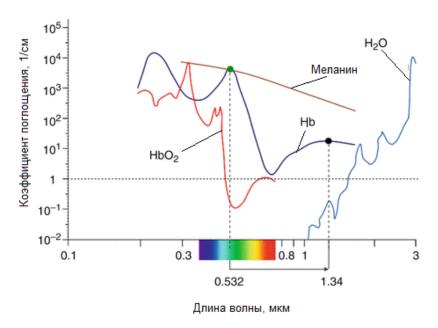


Рисунок 1.12 – Спектры поглощения света основными хромофорами биологических тканей

СДО предоставляет возможность количественной оценки различий в спектральных характеристиках отражённого света в выбранных диапазонах длин волн, оценки относительного вклад каждого из данных веществ в регистрируемый спектр для дальнейшего использования полученных данных для расчета различных диагностических параметров, например, объемного содержания крови в капиллярах, тканевой сатурации, индексов содержания хромофоров [180–182]. Как оптически мутная среда биологическая ткань также характеризуется высоким рассеянием света на неоднородно содержащихся структурах разного размера, изменения в которых также могут свидетельствовать о прогрессировании различных заболеваний [175]. Например, определение объемного содержания крови, желчи и жиров в паренхиме печени по данным СДО в видимом и БИК

диапазоне может быть использовано для диагностики стеатоза, стеатогепатита, фиброза, злокачественных новообразований [183].

Таким образом, поглощение света отражает химический состав, а его рассеяние — морфологическую структуру ткани [184]. Данные процессы определяют процент диффузно отраженного света, который количественно выражается величиной коэффициентом диффузного отражения. Для количественной оценки коэффициентов поглощения и рассеяния на основе данных диффузного отражения и их сравнения с данными, полученными от разных объектов исследования и с помощью различных устройств СДО, перед измерениями необходимо провести калибровку. В качестве эталона диффузного отражения используются материалы, отражающие более 95% падающего на них света (сульфат бария, фторопласт). Коэффициент диффузного отражения определяется по формуле:

$$R(\lambda) = \frac{R_t(\lambda) - R_b(\lambda)}{R_s(\lambda) - R_b(\lambda)'}$$
(1.9)

где $R_t(\lambda)$ — измеренный коэффициент диффузного отражения биологической ткани;

 $R_s(\lambda)$ — измеренный коэффициент диффузного отражения эталона с известной отражательной способностью;

 $R_b(\lambda)$ – фоновый спектр, характеризующий темновой шум детектора.

Для интерпретации результатов диагностики методом СДО помимо измерения и сравнения коэффициентов диффузного отражения на определенных длинах волн поглощения света хромофорами вычисляются индексы содержания основных хромофоров (индексы гемоглобина, меланина, воды и т.д.) и их объемное содержание и концентрации, степень покраснения (индекс эритемы), тканевая сатурация, площади сегментов под кривой спектра и другие параметры. Оценка тканевой сатурации основывается на различии характеристик поглощения оптического излучения окси- и дезоксигемоглобином. При регистрации спектра

диффузного отражения оценивают его вид и, используя известные модели связи коэффициента отражения с концентрацией хромофоров, проводят расчет уровня тканевой сатурации [185].

Метод СДО нашёл широкое применение для диагностики функционального состояния различных типов нарушений в биологических тканях [186]. Известно, что при различных заболеваниях развивается тканевая гипоксия, что приводит к изменению оптических характеристик ткани. Т.к. отражённое излучение содержит в себе информацию о структуре биологической ткани, количестве и кровенаполнении сосудов, пространственном распределении и концентрации хромофоров, патологические состояния, сопровождающиеся данным состоянием (нарушения микроциркуляции у пациентов с синдромом диабетической стопы [181], ишемия поджелудочной железы [187], прогрессирование злокачественных опухолей [188,189]), можно неинвазивно оценивать с помощью метода СДО.

Широкое применение в онкологии и хирургии метод СДО нашел для задач дифференциации злокачественных и здоровых тканей внутренних органов (например, при резекции опухолей ротовой полости [190], легких [170], после мастэктомии [191], колоноскопии и резекции опухолей толстой и прямой кишки [188,192], при кольпоскопии для выявления тканей шейки матки в предраковом состоянии [193]) и кожи [194], в том числе в режиме реального времени.

Опухоли печени являются одними из самых распространенных и летальных из-за трудностей их обнаружения, в связи с чем СДО также продолжает находить приложения *ex vivo* для экспресс-дифференциации здоровых и опухолевых тканей и применения данного подхода в интраоперационной навигации (как показано в [128] и ряде совместных работ D.J. Evers, R. Nachabé и Т.J.М. Ruers [23,167,195]) и *in vivo* во время пункционных биопсий [29*] (рисунок 1.13). Для патологий неопухолевого генеза существуют исследования по применению метода СДО для дифференциации: легкой, умеренной и тяжелой степени макровезикулярного стеатоза по спектрам диффузного отражения только в БИК диапазоне [196]; здоровых тканей и стеатоза от легкой до тяжелой стадии по спектрам диффузного отражения и в видимом, и БИК диапазоне [197]; стадий неалкогольного

стеатогепатита [198]; а также для обнаружения некроза, вызванного физическим или химическим воздействием на паренхиму печени и дальнейшем развитием тканевой гипоксии [199]. Отдельно стоит упомянуть исследования М.S. Nogueira и др. и N. Reistad и др., которые показали использование СДО как оптического метода интраоперационного мониторинга и определения стеатоза на примере модельных животных [24] и в клинических исследованиях на пациентах во время резекции опухолей [25].

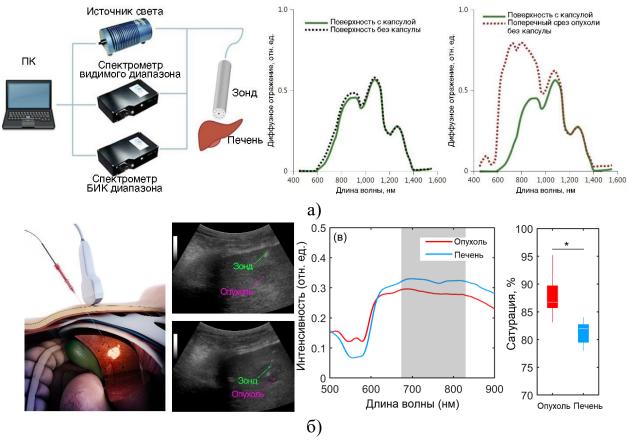


Рисунок 1.13 – Пример схемы исследования методом СДО и регистрации спектров на поверхности и срезе здоровой печени и с опухолевым поражением [183], при пункционной биопсии новообразований печени [29*]

Тем не менее нужно отметить, что многие исследования проведены на животных моделях патологий, следовательно, для дальнейшего развития в виде технологий диагностики функционального состояния печени и структурных изменений требуется получение большего объема экспериментальных данных, в

том числе и для других патологий печени, включая синдром МЖ, и переход к клиническому этапу.

Таким образом, метод СДО так же, как и метод ФС представляет из себя многообещающий инструмент для решения задачи дифференциального анализа функционального состояния печени за счет продемонстрированных возможностей по внедрению в различные медицинские (в том числе миниинвазивные) приложения и высокой чувствительности к патологическим состояниям, маркерами которых являются изменения в поглощающих и рассеивающих характеристиках тканей.

1.5 Оценка возможностей флуоресцентных методов в исследовании энергетического состояния клеток

Как было отмечено ранее, при проведении оперативных вмешательств с целью декомпрессии желчных протоков, у ряда пациентов данная процедура не приводит к ожидаемому положительному результату, причиной чему предполагают изменения в функциональном состоянии печени на момент процедуры.

По одной из версий причиной данных нарушений в выполнении печенью конкретных функций вследствие поражения при синдроме МЖ может являться дефицита метаболического возникновение энергетического И выраженного в недостатке образования молекул АТФ. Данная гипотеза описывает, в частности, что при синдроме МЖ дефицит энергии может быть вызван реакций фосфорилирования угнетением окислительного пентозомонофосфатного пути при повышении доли гликолиза вследствие тканевой гипоксии [200]. Гликолиз является менее эффективным методом синтеза молекул АТФ, вследствие чего он не может скомпенсировать уровень АТФ при нормальном функционировании организма [201].

Таким образом, в качестве показателя функционального состояния печени идеальным параметром, описывающим метаболический статус, является уровень

АТФ. В клинической практике невозможно напрямую оценить количественное содержание АТФ в гепатоцитах, в связи с чем могут быть использованы флуоресцентные методы исследований (например, описанный ранее метод ФС), которым можно обеспечить доступ к паренхиме во время процедуры билиарной декомпрессии.

В связи с этим были проведены предварительные исследования для обоснования подхода к оценке функционального состояния печени с целью дальнейшего применения флуоресцентных методов *in vivo* как косвенного метода измерения уровня АТФ для оценки метаболического состояния тканей печени по интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н как донора электронов в электронтранспортной цепи митохондрий.

В качестве объекта исследования использовалась линия эпителиальных клеток почек собаки MDCK (Madine-Darby Canine kidney cells), широко распространенная в лабораторных и доклинических исследованиях, в том числе в исследованиях при моделировании гипоксии. Клетки культивировали в питательной среде DMEM (Biological Industries, Израиль) с концентрацией глюкозы 1 г/л с добавлением 10% FBS, 2 мМ L-аланил-L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина.

Для оценки уровня АТФ в митохондриях клетки подвергались трансфекции с помощью плазмиды, кодирующей митохондриально-направленный индикатор АТФ АТ1.03, и реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen by ThermoFischer Scientific, США) в течение 45 минут. Генетически кодируемый флуоресцентный зонд АТ 1.03 после экспрессии локализуется в митохондриях. Данный зонд включает в свою структуру два флуоресцирующих белка, определяющих его оптические свойства в зависимости от взаимодействия с молекулами АТФ. Несвязанный зонд обладает максимумами флуоресценции на длине волны 475 нм и 527 нм, при этом при возбуждении флуоресценции на максимуме поглощения 425 нм преобладает флуоресценция 475 нм. При связывании с АТФ происходит изменение структуры зонда, вызывающее явление фёрстеровского переноса энергии и увеличивающее вклад флуоресценции с максимумом 527 нм [202].

Исследование проводилось через сутки после трансфекции при уровне конфлюэнтности 70%. Гипоксию моделировали путем инкубирования клеток в 5 мМ растворе дитионита натрия в течение 180 минут. Непосредственно перед исследованием клетки трижды отмывали с помощью сбалансированного раствора солей Хэнкса (HBSS, ПанЭко, Россия). Контрольные клетки находились в условиях нормоксии в течение 180 минут в растворе HBSS без добавления других веществ.

Регистрацию флуоресценции зонда осуществляли с помощью конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss AG, Германия) при возбуждении на длине волны 405 нм и записи сигналов в диапазонах 460-510 нм и 540-600 нм. С учетом различного уровня трансфекции и экспрессии качестве показателя, характеризующего зонда клетках содержание ΑΤΦ, митохондриального использовали соотношение максимальной интенсивности флуоресценции в диапазоне 540-600 нм к максимальной интенсивности флуоресценции в диапазоне 460-510 нм.

Для визуализации времени жизни флуоресценции молекул НАД(Ф)Н флуоресцентной использовалась система микроскопии на основе инвертированного микроскопа Olympus IX73P1F (Olympus Corporation, Япония). В качестве источника возбуждения применялся лазер LaserNest 375-20 (Omicron, Германия), излучающий на длине волны 375 нм. Мощность излучения на объективе составляла 1 мВт. Источник излучения работает в режиме высокочастотной модуляции 40 МГц, что позволяет проводить измерения времени жизни флуоресценции В частотной области. Для регистрации флуоресценции использовалась камера pco.flim (PCO AG, Германия) с разрешением 1008x1008 пикселей, синхронизированная с модулированным источником возбуждения. Для изображений флуоресцентные фильтры формирования использовались DC/ET455/50m И Optoscan P130/ELE/450 dichroic (Cairn Research Великобритания), размещенными перед детектором камеры. Время экспозиции для получения изображений составляло 1 с. Калибровку системы перед измерениями производили по референсному раствору флуоресцентного красителя Hoechst 33342 (Invitrogen by ThermoFischer Scientific, США) с концентрацией 1 мМ и временем жизни флуоресценции 2,9 нс). Регистрация сигнала проводилась в диапазоне 430-480 нм, соответствующем максимуму эмиссии НАД(Ф)Н и исключающем влияние флуоресценции АТ 1.03. Данные обрабатывались частотным методом, который основан на измерении фазового сдвига и демодуляции флуоресцентного сигнала относительно возбуждающего модулированного сигнала.

Полученные изображения интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции были обработаны с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Результаты статистического анализа выражали в виде средних ± SEM (стандартная ошибка среднего значения). Статистический анализ проводили по критерию Манна-Уитни с использованием программного обеспечения OriginPro 2021 (Microcal Software Inc., США).

На рисунке 1.14 представлены результаты, полученные методом конфокальной микроскопии.

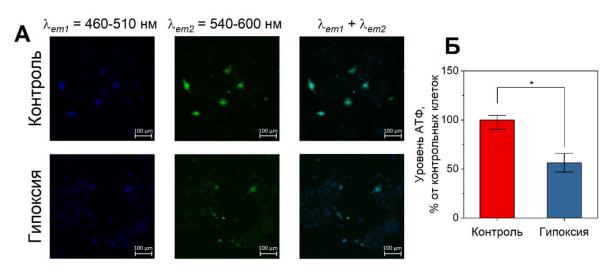


Рисунок 1.14 — Конфокальные изображения клеток MDCK в измеряемых диапазонах (а); результаты расчета относительного изменения уровня АТФ в клетках при гипоксии (б). Статистически значимые различия для *p < 0.05

Приведены раздельные изображения клеток MDCK при измерении на длине волны возбуждения флуоресценции 405 нм в двух диапазонах, а также наложение изображений. В расчете уровня ATФ в клетках применяется ратиометрический подход, основанный на вычислении соотношения между интенсивностями

флуоресценции на двух максимумах. Тем самым представляется возможным наблюдать и количественно оценивать смещение интенсивности флуоресценции от одного из белка в структуре зонда к другому, характеризующее содержание АТФ. В обработанных дитионитом натрия клетках наблюдали снижение уровня АТФ в митохондриях по сравнению с клетками, не подверженными гипоксии.

На рисунке 1.15а приведено сравнение изображений интенсивности IF и фазового времени жизни флуоресценции τ_p в контрольной группе клеток и при гипоксии. На рисунке отмечены области клеток с флуоресценцией в митохондриях, в пределах которых проводился расчет средних значений, сравнение которых представлено на графиках (рисунок 1.156, в).

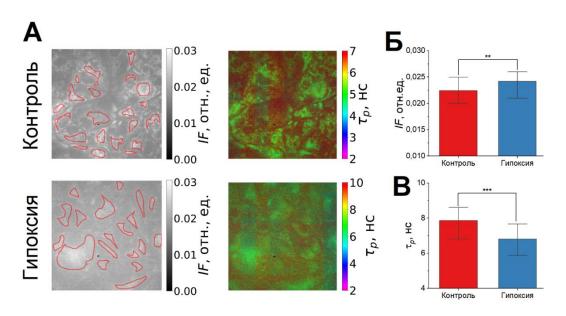


Рисунок 1.15 — Изображения клеток MDCK (а); сравнение интенсивности (б) и времени жизни флуоресценции в норме и при гипоксии (в). Статистически значимые различия для: **p < 0.01; ***p < 0.001

Анализ изображений показывает, что клетки MDCK, подвергнутые гипоксии, характеризовались более высокой интенсивностью флуоресценции в области митохондрий вместе со снижением времени жизни. Полученная картина согласуется с конфокальными изображениями и указывает на то, что возможным объяснением снижения выработки АТФ является дисфункция комплекса I дыхательной цепи митохондрий и переход от окислительного фосфорилирования

к анаэробному гликолизу, производящему меньше молекул АТФ. Снижение уровня связанного митохондриального НАДН с более высоким временем жизни флуоресценции, повышает IF, а также снижает показатель τ_p за счет увеличения вклада свободного НАДН с более коротким временем жизни флуоресценции.

Таким образом, в предварительных исследованиях было обосновано применение ФС как метода оценки энергетического состояния клеток путем сравнения результатов измерения флуоресцентными методами визуализации с измерением уровня АТФ с помощью конфокальной микроскопии в митохондриях в норме и при гипоксии.

1.6 Постановка задачи диссертационного исследования

Представленный обзор литературы свидетельствует о том, что в абдоминальной хирургии актуальными остаются вопросы, связанные с лечением пациентов с синдромом МЖ. Данный синдром сопровождает тяжелые заболевания гепатобилиарной системы, лечение которых откладывается до купирования синдрома МЖ с помощью миниинвазивных хирургических процедур. При этом важной задачей является как можно более раннее выявление и прогнозирование развития осложнений, в частности ПН.

Проведенный обзор методов лабораторной диагностики и анализируемых ими параметров, широкого ряда инструментальных методов (УЗИ, КТ, МРТ и основанные на них), прогностических шкал, моделей и классификаций, продемонстрировал, что применяемые в настоящее время в клинической практике методы позволяют судить о функциональном состоянии печени или нарушениях той или иной функции по совокупным косвенным результатам. При этом сохраняется актуальность поиска дополнительных объективных критериев для своевременной диагностики прогрессирования ПН, дифференциального анализа динамики состояния пациентов и разработки новых технологий на их основе.

Для решения рассмотренной диагностической проблемы перспективным представляется использование оптических методов диагностики, в частности

методов ФС и СДО для создания методов *in vivo* дифференциального анализа функционального состояния печени у пациентов с синдромом МЖ непосредственно в начале чрескожного вмешательства по поводу билиарной декомпрессии.

Таким образом, для решения поставленной цели требуется решить следующие задачи, определяющие структуру диссертационной работы:

- 1) Обоснование специализированных МТТ к мультимодальному устройству флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии с учетом экспериментально полученных оптических характеристик паренхимы печени, для дальнейшей регистрации спектров флуоресценции и диффузного отражения, на основании которых формируется пространство диагностических признаков для разработки метода дифференциального анализа функционального состояния печени.
- 2) Регистрация в клинических условиях и сравнительный анализ спектров флуоресценции и диффузного отражения печени пациентов с синдромом МЖ для формирования пространства диагностических признаков, необходимых для разработки модели классификации пациентов с синдромом МЖ для выявления отрицательной динамики состояния в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии.
- 3) Разработка моделей классификации для прогнозирования отрицательной динамики послеоперационного состояния больных с синдромом МЖ, основанных на регистрации спектров флуоресценции и диффузного отражения и выделении параметров вкладов кривых, отражающих флуоресценцию отдельных эндогенных флуорофоров, в общий спектр флуоресценции и тканевой сатурации.
- 4) Разработка метода дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ различной этиологии и тяжести состояния для выявления отрицательной динамики состояния в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии на основе разработанных моделей классификации по данным спектров флуоресценции и диффузного отражения.

ГЛАВА 2. УСТРОЙСТВО ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ И ДИФФУЗНО-ОТРАЖАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ

Для обоснования специализированных МТТ, предъявляемых к устройствам флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии, так же как и для разработки любых диагностических оптических комплексов, важным этапом является выявление и учет оптических характеристик биологических тканей исследуемого органа, влияющих на регистрируемые сигналы, и исследование последующего взаимодействия светового излучения с ними.

Взаимодействие света с биологической тканью определяется такими параметрами [203,204], как:

- коэффициент поглощения μ_a величина, обратная средней длине свободного пробега фотона до поглощения, или расстоянию, на котором интенсивность падающего оптического излучения уменьшится в e раз от изначальной величины из-за поглощения молекулами веществ в биологической ткани;
- коэффициент рассеяния μ_s величина, обратная средней длине свободного пробега фотона до однократного рассеяния, или расстоянию, на котором интенсивность падающего оптического излучения уменьшится в e раз от изначальной величины из-за рассеяния на клетках, органеллах, мембранах, макромолекулах и т.д.;
- показатель преломления n отношение скорости света в вакууме к скорости распространения оптического излучения в данной среде (биологической ткани);
 - фактор анизотропии g средний косинус угла рассеяния θ фотона;
- коэффициент рассеяния также представляется в виде транспортного (приведенного) коэффициента рассеяния μ'_s , который является величиной, обратной средней длине, на которой после нескольких актов рассеяния теряется исходное направление движения фотона. μ'_s вычисляется с использованием фактора анизотропии по формуле:

$$\mu_s' = \mu_s (1 - g). \tag{2.1}$$

Процессы ослабления интенсивности оптического излучения в биологической ткани вследствие поглощения и однократного рассеяния описываются законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 e^{-\mu_a d} \tag{2.2}$$

$$I = I_0 e^{-\mu_S d} \tag{2.3}$$

где I — интенсивность падающего потока оптического излучения;

I – интенсивность прошедшего потока оптического излучения;

d — толщина образца.

За последние 30 лет исследователями в области биофотоники накоплено большое количество данных [205–207] об оптических характеристиках различных биологических тканей (крови [208,209], кожи и мышц [177,210,211], костей черепа и тканей мозга [212–214], поджелудочной железы [215,216], кишечника [217] и др.), в том числе в сравнении нормальных и патологических состояний [218–220]. Для решения задач гепатологии накоплена различная информация об оптических свойствах печени, желчного пузыря и желчи [221–226], показаны примеры их использования для дифференциации здоровых и злокачественных тканей [23,29*,227], выявления других заболеваний [228], разработки подходов к оптимизации хирургического лечения печени [229,230].

При проведении оптических исследований печени необходимым является учет характерного высокого уровня кровенаполнения вследствие особенностей дополнительного кровоснабжения от окружающих органов и выполнения функции детоксикации [31,222]. Белок эритроцитов гемоглобин и его производные являются одними из основных хромофоров, обладающими высокой способностью к поглощению излучения в видимом спектральном диапазоне, что в значительной степени влияет на результаты оптических измерений различными методами, в частности флуоресцентными и отражательными [231]. Также в ряже случаев

измерения патологических тканей в хирургии могут быть сопряжены с невозможностью провести аналогичные измерения на здоровом участке или у пациента без заболевания, поэтому для интерпретации данных на этапе моделирования необходимо иметь представление об оптических характеристиках тканей с различным содержанием крови, воды, липидов и других хромофоров, а также о характеристиках желчи, вырабатываемой гепатоцитами [232*,233*].

Следовательно, необходимо провести набор данных для описания особенностей взаимодействия оптического излучения в выбранных методах диагностики (ФС и СДО) и объекта исследования (печень).

2.1 Спектрофотометрические исследования оптических характеристик паренхимы печени

Для обоснования специализированных МТТ, предъявляемых к каналу СДО мультимодального устройства проводилось экспериментальное исследование оптических характеристик печени, включавшее в себя измерения срезов тканей печени модельных животных, а также образцов желчи человека методом спектрофотометрии.

Этап исследования с лабораторными животными был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (протокол заседания №18 от 21.02.2020). Манипуляции проводились в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики (GLP), установленными Организацией экономического сотрудничества и развития [234]. Для измерения оптических свойств были использованы срезы тканей печени 7 самцов крыс линии Wistar (возраст – 3 месяца, масса – 220-250 г). У одной группы крыс (n=4) проводилась процедура перфузирования – промывания кровеносных сосудов печени изотоническим раствором 0,9% NaCl для удаления крови из них и тем самым как можно большего снижения влияния поглощающих свойств гемоглобина. Применения данной процедуры известны в биомедицинских исследованиях для следующих задач: сама по себе является моделью для изучения

влияния ишемии и реперфузии в трансплантологии [235], для предварительной подготовки паренхимы печени перед выделением гепатоцитов [236,237], для получения биоматриксов в тканевой инженерии [238]. Для оценки эффективности процедуры перфузирования полученные результаты измерений сравнивали с измерениями характеристик печени крыс контрольной группы (n = 3).

Процедуру перфузирования проводили под наркозом. Для наркотизации животного использовали препараты Zoletil 100 (Vibrac, Франция) и Xyla (Interchemie, Нидерланды) в стандартных дозировках. Крысу закрепляли на специальной платформе в положении на спине при помощи марлевого фиксатора. После наступления глубокого наркоза осуществляли доступ к печени путем послойного рассечения передней брюшной стенки по срединной линии, выделения и изоляции воротной вены печени из соединительнотканного пространства. Под воротную вену проводили фиксирующие лигатуры, одна из которых была необходима для обеспечения препятствия притоку крови. По проводнику в вену вводился сосудистый катетер диаметром 22G с раствором гепарина (5000 ед/мл). Катетер фиксировался лигатурами и при помощи гибких трубок подключался к инфузионному насосу. Далее в сосуды вводили заранее приготовленный теплый буферный раствор Хэнкса с кальцием (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS, pH=7,4, 37 °C) со скоростью потока 1000 мл/ч. При этом нижнюю полую вену перфорировали для обеспечения оттока жидкости. Общий объем использованного раствора составлял около 1,5-2,0 л.

Изменения в долях печени по мере проведения процедуры изначально визуально проявлялись неравномерно, а на поверхности печени становился заметен сосудистый рисунок (рисунок 2.1). В ряде отдельных случаев при наблюдении за процедурой и для устранения вероятных стазов в мелких сосудах выполняли форсированное перфузирование печени. Важной задачей при процедуре являлось поддержание работы сердца крысы, которая ускоряла процесс вымывания крови из сосудов печени. Степень перфузирования, достаточную для оптических измерений, определяли визуально по равномерному изменению цвета печени с

красно- коричневого на желто-серый, что характерно для обескровленного органа, а также по степени окрашенности раствора HBSS из-за вымываемой крови.

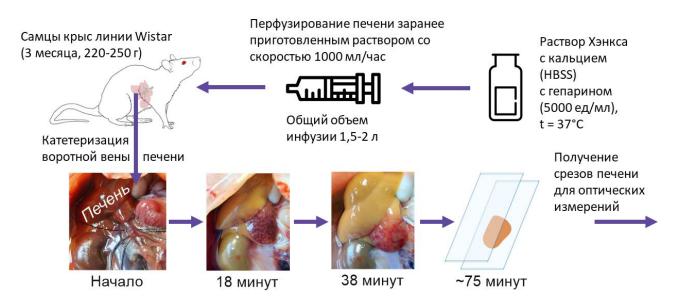


Рисунок 2.1 – Схема эксперимента по перфузированию печени крысы для подготовки образцов тканей к оптическим измерениям [232*]

По окончанию процедуры катетер отсоединялся от сосудов, а животное выводилось из эксперимента. Выделенная из брюшной полости печень крысы помещалась в чашку Петри с раствором HBSS. Из каждой печени ручным способом получали несколько срезов печени. Толщину срезов $(0,9-1,0\,\mathrm{mm})$ рассчитывали с учетом толщины предметного стекла, измеренной микрометром МК 0-25 (диапазон измерений 0-25 мм, погрешность измерения 4 мкм). Полученные срезы тканей $(N=8\,\mathrm{ofpas}_{4})$ в контрольной) помещались между двумя стандартными предметными стеклами толщиной 1 мм.

Для измерения оптических характеристик желчи использовались образцы желчи 9 пациентов с диагнозом МЖ, находившихся на лечении в отделении рентгенохирургических методов диагностики и лечения БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница». Образцы желчи были получены после антеградной декомпрессии желчевыводящих путей под ультразвуковым и рентгенологическим контролем. Желчь доставлялась в лабораторию и исследовалась не позднее, чем через 5 часов после получения. Исследование было

одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (протокол заседания № 14 от 24.01.2019).

Схема всех этапов экспериментального исследования представлена на рисунке 2.2а. Измерения проводились с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-2600 (Shimadzu Corporation, Япония) с дополнительно установленной стандартной интегрирующей сферой ISR-2600Plus (рисунок 2.2б).

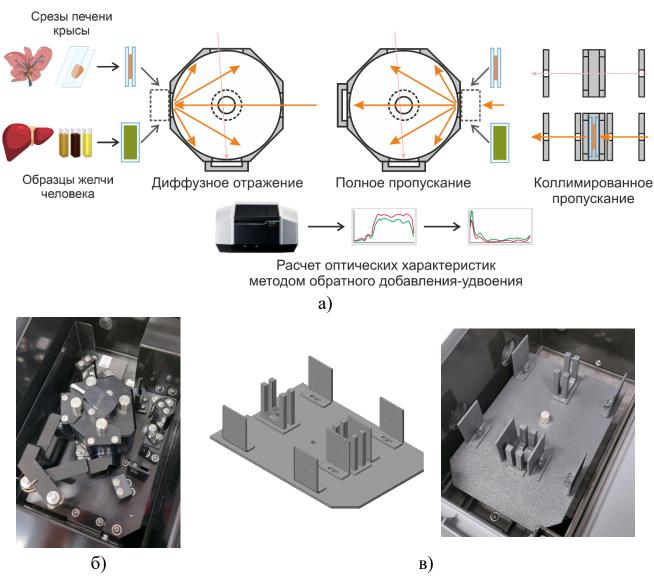


Рисунок 2.2 – Схема измерения оптических характеристик с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2600 (а) с интегрирующей сферой (б), модель и вид изготовленного держателя образцов тканей для измерений коллимированного пропускания (в)

Спектрофотометр реализует двухлучевую схему с галогеновой и дейтериевой лампами в качестве источников излучения и двумя детекторами (фотоумножитель и полупроводниковый детектор InGaAs), расположенными в интегрирующей сфере диаметром 60 мм, позволяющей регистрировать спектральные характеристики в диапазоне 220-1400 нм.

Исходные параметры, измеряемые для расчета основных оптических характеристик, включали в себя: для паренхимы печени — полное и коллимированное пропускание света, диффузное отражение; для желчи — полное пропускание, диффузное отражение.

Для измерения коллимированного пропускания был специально спроектирован и изготовлен держатель образцов с отверстиями диаметром 1,5 мм (рисунок 2.2в). Диаметр отверстий соотносился с шириной луча спектрофотометра, а их расположение относительно образца и в канале сравнения обеспечивало регистрацию части сигнала, претерпевшей рассеяние только в прямом направлении [220]. Во время измерений держатель устанавливался на место стандартного учетом размеров кюветного отделения, c которого был спроектирован. Коллимированное пропускание измерялось в диапазоне 185-900 нм.

Коэффициент поглощения, транспортный коэффициент рассеяния и фактор анизотропии рассчитывались посредством метода обратного добавления-удвоения. Данный подход, основанный на решении задачи, обратной численному решению уравнения теории переноса излучения, широко применяется спектрофотометрических коэффициентов исследованиях определения ДЛЯ поглощения и рассеяния на основе экспериментальных данных о полном пропускании диффузном отражении, полученных использованием сфер. интегрирующих Распространенным подходом является алгоритм, разработанный и описанный S. Prahl [239,240]. Преимуществом алгоритма для решаемой исследовательской задачи наряду с простотой и требованием небольших вычислительных мощностей является то, что при расчете учитывается не только конфигурация интегрирующей сферы и геометрия образцов, но и размещение образцов между предметными стеклами и, следовательно, взаимодействия света на границах раздела воздуха, стекла и ткани.

Оптические характеристики вычислялись по экспериментальным данным путем решения следующих уравнений [240]:

$$\frac{\mu_s'}{\mu_a + \mu_s'} = \begin{cases} 1 - \left(\frac{1 - 4R - T}{1 - T}\right)^2, \text{ если } \frac{R}{1 - T} < 0, 1\\ 1 - \frac{4}{9} \left(\frac{1 - R - T}{1 - T}\right)^2, \text{ если } \frac{R}{1 - T} \ge 0, 1 \end{cases}$$
(2.4)

$$(\mu_a + \mu_s')d = \begin{cases} -\frac{\ln T \ln(0.05)}{\ln R}, \text{ если } R \le 0.1, \\ 2^{1+5(R-T)}, \text{ если } R > 0.1 \end{cases}$$
 (2.5)

$$(\mu_a + \mu_s')d = -\ln T_C, (2.6)$$

где R – диффузное отражение;

T — полное пропускание;

 T_{C} – коллимированное пропускание.

Дальнейшая обработка полученных данных проводилась в программном обеспечении OriginPro 2021.

На рисунке 2.3 представлены результаты спектрофотометрических измерений срезов тканей печени и образцов желчи. В спектрах полного пропускания и диффузного отражения паренхимы печени наблюдалось повышение значений с увеличением длины волны, а также небольшое снижение в диапазоне 500-600 нм. В спектре поглощения оксигенированной крови выделяют характерные максимумы на длинах волн 415 нм (полоса Соре), 542 и 578 нм. Для дезоксигенированной крови подобные пики обнаруживаются на длинах волн 425, 554 и 760 нм [11]. В спектрах тканей печени контрольной группы из перечисленных длин волн наблюдалось увеличение поглощения только в диапазоне около 554 нм, а также незначительное снижение отражения и пропускания на длине волны 760 нм. Все это указывает на то, что по спектральным характеристикам наблюдается специфическая особенность печеночного кровоснабжения. Из-за

выполнения функции детоксикации крови, поступающей от других органов, для печени характерно повышенное содержание венозной крови [241], что приводит к выраженному поглощению света дезоксигемоглобином.

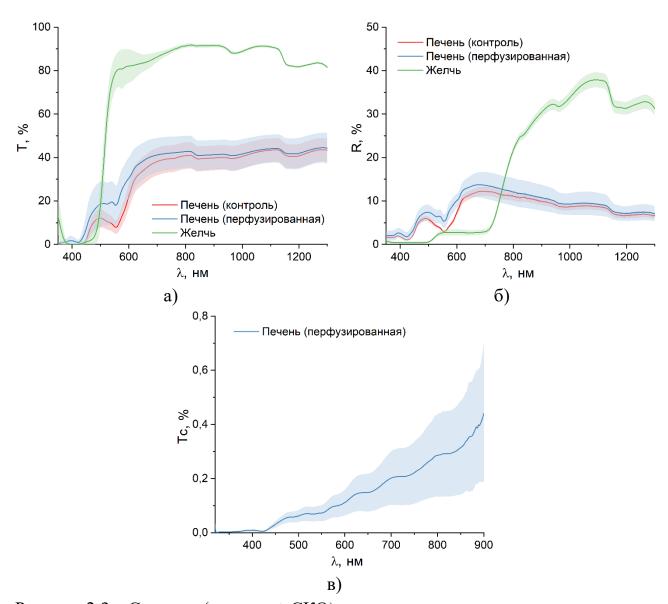


Рисунок 2.3 – Спектры (среднее ± СКО) измеренных оптических характеристик печени и желчи: полное пропускание (а); диффузное отражение (б); коллимированное пропускание (в)

В видимом диапазоне в наблюдаемой картине преобладает влияение присутствия билирубина [21,225] а также окси- и дезоксигемоглобина крови [209]. В БИК диапазоне форма спектра в значительной степени обусловлена пересечением полос поглощения липидов и воды [210,242].

После проведения перфузирования в срезах печени крыс экспериментальной группы поглощение оксигемоглобина стало преобладающим, что могло указывать на то, что прежде всего вымывалась именно венозная кровь, но также наблюдалось смещение данной части спектра в сторону уменьшения длины волны на 15-20 нм. Это может быть обусловлено влиянием спектральных характеристик желчи, оставшейся в желчных канальцах печеночных долек, с локальными максимумами поглощения на длинах волн 409 и 605 нм. В БИК диапазоне после перфузирования значения полного пропускания в печени снизились, в то время как полное отражение повысилось, но при этом не наблюдалось изменений в форме спектров, что может указывать на преимущественно количественные изменения, нежели качественные, которые наблюдаются в диапазоне длин волн поглощения окси- и дезоксигемоглобина.

Спектры полного пропускания и отражения желчи демонстрируют более высокие значения в БИК диапазоне с характерными снижениями, отражающими содержание воды [225], и значительное уменьшение в ближнем УФ и видимом диапазоне (около 350-500 нм) вследствие высокого содержания билирубина [224]. Менее значимые различия в БИК диапазоне могут свидетельствовать о том, что содержание воды в исследованных образцах варьируется в меньшей степени, чем содержание билирубина, влияющее на видимый диапазон.

На рисунке 2.4а приведены результаты расчета коэффициента поглощения для тканей печени до и после перфузирования, а также для образцов желчи. В спектрах коэффициента поглощения наблюдались ожидаемые соотношения значений в полосах, характерных для основных хромофоров биологических тканей. В перфузированных тканях наблюдалось двукратное снижение на длинах волн поглощения окси- и дезоксигемоглобина 540-560 нм. Для спектра желчи 350-500 отчетливо выражен характерный максимум диапазоне HM. обусловленный билирубина. Полученные поглощением зависимости транспортного коэффициента рассеяния (рисунок 2.4б) от длины волны были аппроксимированы в диапазоне 350-1300 нм для дальнейшего анализа.

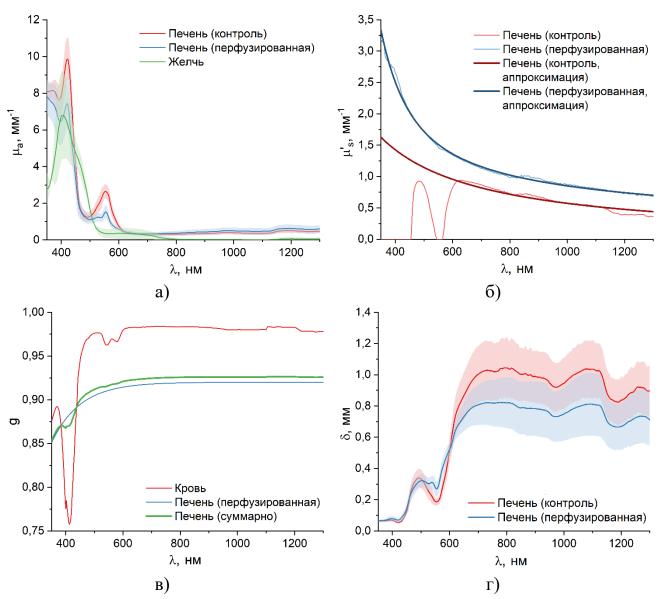


Рисунок 2.4 — Результаты расчета оптических характеристик (среднее ± СКО): коэффициенты поглощения срезов тканей печени и образцов желчи (а); рассчитанные и аппроксимированные транспортные коэффициенты рассеяния срезов печени контрольной группы и после перфузирования (б); факторы анизотропии крови и тканей печени (в); глубина проникновения оптического излучения в ткани печени (г)

Для достаточного описания рассеяния света в биологических тканях в диапазонах около 400-1300 нм возможно применять два вида уравнений [203], второе из которых описывает рассеяние в ткани раздельно через вклады рассеяния Рэлея (рассеяние на частицах меньше длины волны света) и Ми (рассеяние вперед на частицах, сопоставимых с длиной волны света):

$$\mu_s'(\lambda) = a \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-b},\tag{2.7}$$

$$\mu_s'(\lambda) = a \left(f_R \left(\frac{\lambda}{500} \right)^{-4} + (1 - f_R) \left(\frac{\lambda}{500} \right)^{-b_M} \right),$$
 (2.8)

где a – транспортный коэффициент рассеяния на длине волны 500 нм;

b – степень рассеяния;

 b_{M} – степень рассеяния Ми;

 f_R — доля рэлеевского рассеяния;

 λ – длина волны.

Критерием выбора функции аппроксимации экспериментальных данных являлось наибольшее значение коэффициента детерминации R^2 . Таким образом, транспортные коэффициенты рассеяния (рисунок 2.4б) тканей печени обеих исследованных групп были аппроксимированы уравнениями (2.7) и (2.8) по результатам подбора следующих коэффициентов:

$$\mu_{s}^{\prime \text{контроль}}(\lambda) = 1,13 \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-1,03},$$

$$\mu_{s}^{\prime \text{перфузированная}}(\lambda) = 1,72 \left(0,23 \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-4} + 0,77 \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-0,68}\right).$$

Результаты расчета транспортного коэффициента рассеяния подтверждают эффективность предложенной процедуры перфузирования, особенно для длин волн ниже 600 нм. Из-за высокого содержания крови и, соответственно, низкого пропускания и отражения в полосах поглощения гемоглобина рассчитанный коэффициент рассеяния также имеет более низкие значения, чем после перфузирования. Значения транспортного коэффициента рассеяния демонстрируют ожидаемое снижение при увеличении длины волны [222,226].

Полученные зависимости фактора анизотропии (рисунок 2.4в) от длины волны были аппроксимированы в диапазоне 350-1300 нм по формуле:

$$g_{\text{перфузированная}}(\lambda) = a - b \cdot c^{\lambda},$$
 (2.9)

где $g_{\text{перфузированная}}$ – фактор анизотропии перфузированной печени;

a, b, c — коэффициенты функции асимптотической регрессии.

Для расчета фактора анизотропии печени при различного содержания крови в ткани были использованы известные литературные данные о значениях фактора анизотропии крови в диапазоне длин волн от УФ до БИК [209] и полученные экспериментально аппроксимированные данные для срезов тканей перфузированной печени, суммированные по следующей формуле:

$$g_{\text{печень}} = C_{\text{кровь}} \cdot g_{\text{кровь}} + (1 - C_{\text{кровь}}) g_{\text{перфузированная}},$$
 (2.10)

где $g_{\text{печень}}$ – фактор анизотропии ткани печени;

 $C_{\text{кровь}}$ – доля крови в ткани печени;

 $g_{\text{перфузированная}}$ – фактор анизотропии перфузированной печени.

Также рассчитывался показатель зависимости глубины проникновения света в биологическую ткань от длины волны, широко используемый при определении возможностей оптических методов и разрабатываемых на их основе диагностических устройств. Данная величина характеризует глубину, на которой интенсивность оптического излучения снижается до 37% от исходной величины, и вычисляется по формуле [204]:

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')}},\tag{2.11}$$

где δ – глубина проникновения света.

Представленные на рисунке 2.4г значения были рассчитаны для характеристик тканей печени контрольной группы и после перфузирования:

$$\delta_{\text{контроль}}(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a^{\text{контроль}} \left(\mu_a^{\text{контроль}} + 1,13 \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-1,03}\right)}},$$

$$\delta_{\text{контроль}}(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a^{\text{перфузированная}} \left(\mu_a^{\text{перфузированная}} + 1,86 \left(\frac{\lambda}{500}\right)^{-1,21}\right)}}.$$

В тканях печени наблюдались низкие значения оптической глубины проникновения, особенно в УФ и видимом диапазоне, что связано с высоким поглощением в данных областях спектра, преимущественно гемоглобином. В результате наблюдалось незначительное увеличение показателя в диапазоне 400-450 нм, более выраженное – в диапазоне 500-600 нм, а также незначительное снижение в диапазоне 450-500 нм и наиболее значимое уменьшение в БИК диапазоне, что обусловлено замещением крови в сосудах на раствор HBSS. Таким образом, полученный результат указывает на эффективность проведенной процедуры перфузирования, особенно в спектральном диапазоне, представляющем интерес для метода ФС, интенсивность сигнала которого ниже, чем у сигналов метода СДО.

Для дальнейшего аналитического моделирования оптических характеристик объекта исследования были использованы рассчитанные ранее коэффициенты поглощения паренхимы печени и желчи, а также известные данные для основных тканевых хромофоров биологических тканей (рисунок 2.5а), описанные в работах [23,203,209,243]. Суммарные зависимости коэффициента поглощения тканей печени (рисунок 2.5б) были рассчитаны по формуле [203]:

$$\mu_a = C_1 \mu_a^1 + C_2 \mu_a^2 + \dots + C_{N-1} \mu_a^{N-1} + C_N \mu_a^N, \tag{2.12}$$

где $\mu_a^1 \dots \mu_a^N$ — коэффициент поглощения N-го хромофора в биологической ткани; $C_1 \dots C_N$ — доля содержания N-го хромофора в биологической ткани;

N — наименование хромофора в биологической ткани.

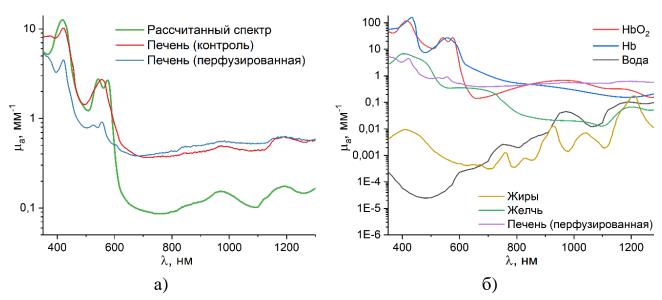


Рисунок 2.5 – Коэффициенты поглощения основных хромофоров тканей печени, а также перфузированной паренхимы (а) и сравнение рассчитанного спектра поглощения с результатами измерений (б)

С учетом количества и вклада компонентов, указанных на рисунке 2.5б, уравнение (2.12) принимает следующий вид:

$$\mu_a^{\text{печень}} = C_{\text{кровь}}(StO_2\mu_a^{HbO2} + (1-StO_2)\mu_a^{Hb}) + C_{\text{вода}}\mu_a^{\text{вода}} + C_{\text{липиды}}\mu_a^{\text{липиды}} + C_{\text{желчь}}\mu_a^{\text{желчь}} + (1-C_{\text{кровь}} - C_{\text{вода}} - C_{\text{липиды}} - C_{\text{желчь}})\mu_a^{\text{перфузированная}}$$

где $\mu_a^{\text{печень}}$ – коэффициент поглощения тканей печени;

 $C_{
m кровь}$, $C_{
m вода}$, $C_{
m желчь}$ — доли содержания крови, воды, липидов и желчи в тканях печени, соответственно;

 StO_2 – тканевая сатурация печени;

 μ_a^{HbO2} , μ_a^{Hb} , $\mu_a^{вода}$, $\mu_a^{липиды}$, $\mu_a^{желчь}$, $\mu_a^{перфузированная}$ — коэффициенты поглощения оксигемоглобина, дезоксигемоглобина, воды, липидов, желчи и тканей печени после перфузирования.

Для расчета суммарного спектра поглощения из обзора литературных источников были выбраны средние значения содержания основных хромофоров, а также величины тканевой сатурации, представляющие нормальное состояние печени, а также минимальные и максимальные значения, отражающие патологические изменения [23,244–246]. Данные приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Значения содержания тканевых хромофоров, использованные для моделирования оптических характеристик печени

Хромофор / параметр	Значение, %			
Хромофор / параметр	Мин.	Среднее	Макс.	
Тканевая сатурация <i>StO</i> ₂	50	80	90	
Кровь	5	10	15	
Вода	60	70	80	
Липиды	1	3	11	
Желчь	2	6	12	

Сравнение рассчитанного спектра с исходными экспериментальными данными (рисунок 2.56) показывает сходство в видимом диапазоне теоретического спектра с измеренным в срезах печени крыс контрольной группы. После процедуры перфузирования отмечено значительное снижение значений коэффициента как в диапазоне до 600 нм вследствие ослабления вклада поглощения света гемоглобином крови, так и в БИК диапазоне. Зафиксированные отличия между расчетными и экспериментальными спектральными зависимостями коэффициента поглощения могут быть обусловлены различиями в измеряемых образцах, в том числе из-за хода перфузирования в каждом случае, различия в котором возможно скорректировать изменением содержания воды и остальных хромофоров при дальнейшем моделировании.

Для использования в моделировании спектров диффузного отражения по формуле (2.12) были рассчитаны коэффициенты поглощения ткани печени (рисунок 2.6) в зависимости от изменения содержания одного из хромофоров или значения тканевой сатурации в пределах, приведенных в таблице 2.1.

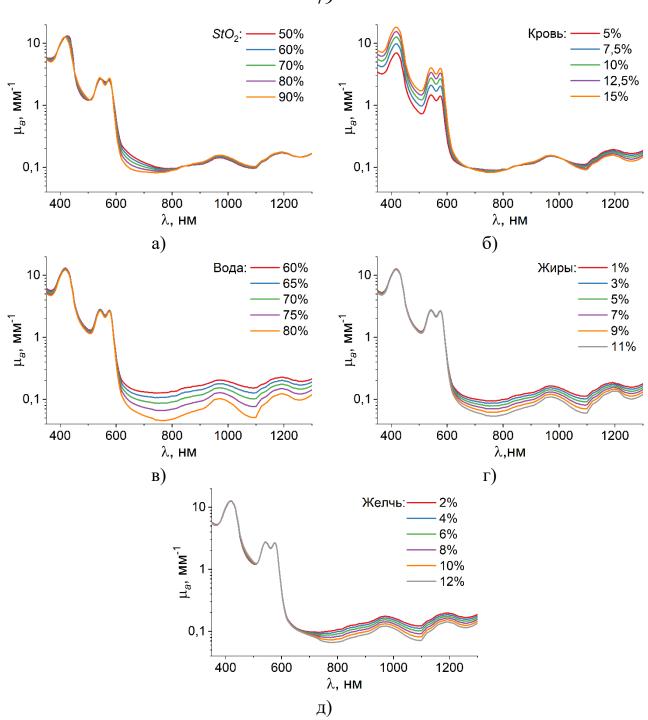


Рисунок 2.6 – Результаты расчета коэффициента поглощения при изменении тканевой сатурации (a) и содержания крови (б), воды (в), липидов (г) и желчи (д)

Полученные результаты показали, что с увеличением вклада хромофоров с более высоким поглощением в видимом диапазоне коэффициент поглощения увеличивается, но в то же время для хромофоров с поглощением преимущественно в БИК диапазоне поглощение уменьшается, при этом характерная форма спектров

становится более выраженной, например, как в случае изменений в содержании воды.

Следующим этапом обоснования специализированных МТТ к разрабатываемому устройству флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии являлось моделирование спектров диффузного отражения, регистрируемых от тканей печени с рассчитанными ранее оптическими характеристиками.

Для математического описания взаимодействия света с биологической тканью как оптически неоднородной средой существуют различные способы, большинство из которых основаны на приближениях уравнения теории переноса излучения [247]. Аналитические решения основного уравнения преимущественно содержат некоторые неточности и отклонения, однако получаемые результаты являются достаточными для решения практических задач при меньших затратах времени, как например при вычислении методом Монте-Карло – более точным, но представляющем результат только в численном виде и требующим больших вычислительных мощностей, чем менее строгие методы [248].

Для моделирования спектров диффузного отражения были выбраны 3 аналитические модели, которые сравнивались с исходными спектрами срезов тканей печени контрольной группы, полученными на спектрофотометре.

В простейшей экспоненциальной модели диффузного отражения от однородной полубесконечной среды делается допущение, что падающий и обратно рассеянный свет характеризуется только экспоненциальным затуханием, зависящим от коэффициентов поглощения и рассеяния [247]:

$$R = \frac{\mu_S'}{\mu_a + \mu_S'}. (2.13)$$

Модели миграции фотонов и расчета диффузного отражения через интеграл по траектории рассматривают рассеяние света как вероятностный процесс [249]. Уравнение для расчета коэффициента диффузного отражения выражается из фейнмановского интеграла по траектории, характеризующего вероятность прохождения пакета фотонов в мутной среде по пути с нулевым поглощением после определенного числа актов рассеяния. Также в расчете учитывается фактор анизотропии *g* и формула принимает следующий вид:

$$R = e^{-2\sqrt{\frac{\ln\left(1 + \frac{\mu_a(1-g)}{\mu_s'}\right)}{2,68 \frac{\ln\left(1 + \frac{\mu_a(1-g)}{\mu_s'}\right)}{1-g}}}.$$
(2.14)

Модель диффузионного приближения является широко используемым в биомедицинских приложениях способом аналитического решения уравнения переноса излучения. Одна из простейших реализаций диффузионного приближения на основе метода изображений позволяет рассчитать коэффициент диффузного отражения по следующим выражениям [248,250]:

$$R = \left(1 + e^{-\frac{4}{3}A\mu z_0}\right) \frac{e^{-\mu z_0}}{2},\tag{2.15}$$

$$A = 2n^2 - 1, (2.16)$$

$$z_0 = \frac{1}{\mu_a + \mu_s'},\tag{2.17}$$

$$\mu = \sqrt{3(\mu_a + \mu_s')\mu_a}. (2.18)$$

Известные литературные данные для показателя преломления печени [223] были апроксимированы для дальнейшего расчета диффузного отражения следующей формулой:

$$n(\lambda) = 1.35 + \frac{12.31}{\lambda - 72.78}. (2.19)$$

Результаты моделирования спектров диффузного отражения приведены на рисунке 2.7 для среднего содержания тканевых хромофоров и тканевой сатурации в неизмененной ткани печени (таблица 2.1).

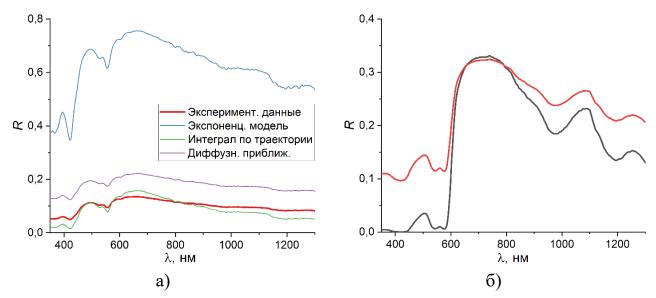


Рисунок 2.7 – Сравнение аналитических моделей спектров диффузного отражения с экспериментальными данными (а), сравнение спектров, полученных с помощью моделей интеграла по траектории и модели диффузного приближения (б)

Исходя из сравнения всех рассматриваемых моделей, для дальнейшего моделирования было выбрано уравнение для модели диффузного приближения. Несмотря на более высокие значения коэффициента диффузного отражения, она более точно передает форму исходного спектра, в то время как в случае уравнения интеграла по траектории наблюдается неравномерное снижение значений в начале и конце выбранного диапазона и незначительное увеличение на отрезке 600-800 нм.

Результаты моделирования спектров диффузного отражения выбранным методом диффузного приближения в пределах, установленных в таблице 2.1, приведены на рисунке 2.8. Аналогично зависимостям коэффициента поглощения, наблюдается снижение отражения для хромофоров с поглощением в видимом диапазоне и повышение — для БИК.

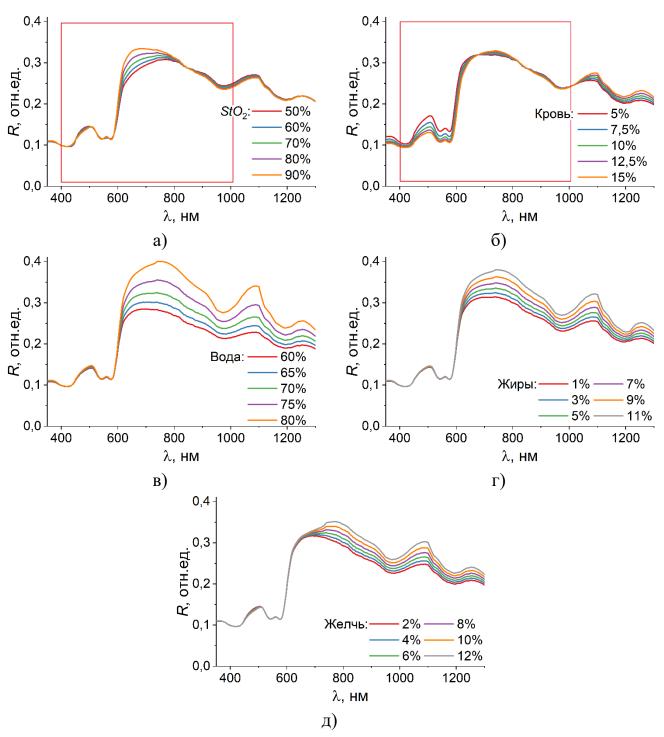


Рисунок 2.8 – Результаты моделирования спектров диффузного отражения печени для различной тканевой сатурации (а) и различного содержания крови (б), воды (в), липидов (г) и желчи (д)

Диапазоны, выделенные на рисунках 2.8а,б, были далее использованы для уточнения МТТ к диапазону спектрометра и широкополосного источника излучения (диапазоны не менее 400-1000 нм), а также учитывались далее при

формулировании специализированных МТТ канала ФС, влияние на спектры которого также оказывает содержание крови и тканевая сатурация.

2.2 Исследования основных флуорофоров тканей печени

Ткани печени, как и любые биологические ткани человека, отличаются сложным составом, который обуславливает их спектры флуоресценции, что требуется учесть при выборе источников и приемников излучения в канале ФС. Оптические характеристики (длина волны возбуждения флуоресценции λ_{ex} , длина волны эмиссии флуоресценции λ_{em}) и роли флуорофоров биологических тканей, вносящих основной вклад в флуоресценцию паренхимы печени, в функционировании организма человека, описаны в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Характеристики и значение основных флуорофоров печени

$N_{\underline{0}}$	Название	Роль в организме и при патологиях	λ_{ex} , HM	λ_{em} , HM
1	2	3	4	5
1	Коллаген и эластин	Фибриллярные белки являются основным	330-340	400-410
	[141,173,251]	компонентом соединительной ткани.	350-420	420-510
		Значительно накапливаются в печени при		
		прогрессировании фиброза.		
2	НАДН и НАДФН,	Кофермент НАДН участвует в реакциях	330-380	440
	совместно	энергетического метаболизма в		(свобод-
	обозначаемые как	митохондриях в качестве одного из		ный
	НАД(Ф)Н	основных доноров электронов в цикле		НАДН),
	[15,141,150,173,251	Кребса. Изменение содержания возникает		465, 480
	,252]	при патологических состояниях		(связан-
		(воспаление, канцерогенез, некроз и т.д.),		ный
		сопровождающихся нарушениями в		НАДН)
		соотношении аэробных и анаэробных		
		реакций энергетического метаболизма.		
		Восстановленный		
		никотинамидадениндинуклеотидфосфат		

Продолжение таблицы 2.2

1	2	3	4	5
		(НАДФН) участвует в анаболических		
		реакциях (синтез липидов и нуклеиновых		
		кислот), в антиоксидантной защите		
		(восстановлении глутатиона). Содержание		
		изменяется при окислительном стрессе и		
		активации НАДФН-оксидазы.		
3	Свободные жирные	Синтезируются из углеводов и	330-350	470-480
	кислоты	преобразуются из одного вида в другой		
	(арахидоновая,	преимущественно в печени и жировой		
	линолевая,	ткани. Участвуют в синтезе триглицеридов		
	линоленовая)	и фосфолипидов. Маркеры липидного		
	[173,253]	обмена, которые значительно		
		накапливаются в печени при стеатозе.		
4	Витамин А	Группа веществ, включающая ретинол и	370-380	490-510
	[173,254]	другие ретиноиды, которые депонируются		
		преимущественно в печени. Участвуют в		
		большом количестве биохимических		
		реакций, в том числе в антиоксидантной		
		защите. Являются структурными		
		компонентами клеточных мембран, играют		
		важную роль в зрении. Избыточное		
		накопление в печени при снижении в		
		сыворотке крови может указывать на		
		нарушения метаболизма ретинола при		
		патологиях печени.		
5	Билирубин	Продукт распада гемоглобина, который	350-500	480-650
	[21,22,173]	переходит из неконьюгированной формы	366-450	540-600
		(непрямой) в конъюгированную (прямую)		
		в гепатоцитах и выводится с желчью.		
		Билирубин является одним из пигментов,		
		ответственных за характерный цвет желчи.		
		Накапливается в печени при холестазе.		

Продолжение таблицы 2.2

1	2	3	4	5
6	Флавины	Коферменты реакций энергетического	350-370	480
	[15,141,173]	метаболизма. Кофермент ФАД участвует в	410-450	510-560
		реакциях энергетического метаболизма в		
		митохондриях клеток, выступая в качестве		
		акцептора электронов в цикле Кребса.		
		Изменение содержания возникает при		
		патологических состояниях (воспаление,		
		канцерогенез, некроз и т.д.),		
		сопровождающихся нарушениями в		
		соотношении аэробных и анаэробных		
		реакций энергетического метаболизма.		
7	Липофусцин	Пигмент, накапливающийся как продукт	340-395	480-700
	[141,173,255,256]	метаболизма различных веществ в клетках	400-500	
		всего организма. Считается индикатором		
		окислительного стресса и старения из-за		
		увеличения содержания с возрастом.		
		Накапливается в печени при		
		прогрессировании патологических		
		состояний.		
8	Протопорфирин IX	Предшественники гема и гемоглобина.	405	615-670
	и производные	Накапливается в печени вследствие	400-450	630-700
	порфирина	нарушений в порфиринового обмена в		
	[15,143,173]	гепатоцитах на фоне патологий печени.		

С целью обоснования специализированных МТТ, предъявляемых к каналу ФС мультимодального устройства и с учетом результатов раздела 2.1, проводилось экспериментальное исследование флуоресценции основных эндогенных флуорофоров, предполагавшее измерение растворов отдельных флуорофоров в различных концентрациях.

Для проведения измерений была собрана экспериментальная установка, включающая в себя спектрометр FLAME T-VIS-NIR-ES (Ocean Optics, США) с

диапазоном 350-1000 нм, светодиод 365 нм, лазерный диод 450 нм, фильтры FGL400 и FGL495 (Thorlabs Inc., США). Характеристики спектрометра для тестирования были выбраны в соответствии с полученными для канала СДО в разделе 2.1, исходя из мультимодальности устройства, для которого проводится обоснование МТТ. Также учитывалась возможность регистрации спектров флуоресценции с высоким спектральным разрешением, исходя из характеристик флуорофоров, приведенных в таблице 2.2, т.к. в дальнейшем будет требоваться оценить вклад отдельных флуорофоров, различия в пиках флуоресценции которых лежат в пределах 10-20 нм.

Измерение представляло собой регистрацию спектров флуоресценции растворов эндогенных флуорофоров с известными свойствами, приготовленных непосредственно перед измерениями и нанесенных на поверхность фольги в равном объеме. Концентрации веществ были подобраны в соответствии с уровнями, которые могут наблюдаться в биологической ткани (0,001-0,5 мМ).

Для исследования использовались следующие вещества:

- НАДН (Sigma-Aldrich, США), растворенный в трис-HCl (рН 8,5);
- билирубин (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия) с добавлением бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 100 мкМ, растворенный в диметилсульфоксиде (ДМСО);
 - ФАД (Sigma-Aldrich, США), растворенный в фосфатно-солевом буфере;
 - протопорфирин IX (Sigma-Aldrich, США), растворенный в ДМСО.

Результаты измерения спектров флуоресценции для длины волны 365 нм представлены на рисунке 2.9. Для всех измеренных веществ наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции с повышением концентрации. Особенно выраженно изменения наблюдались для ФАД и протопорфирина IX (рисунок 2.9в,г). Аналогичные результаты наблюдались для источника излучения 450 нм (рисунок 2.9д,е).

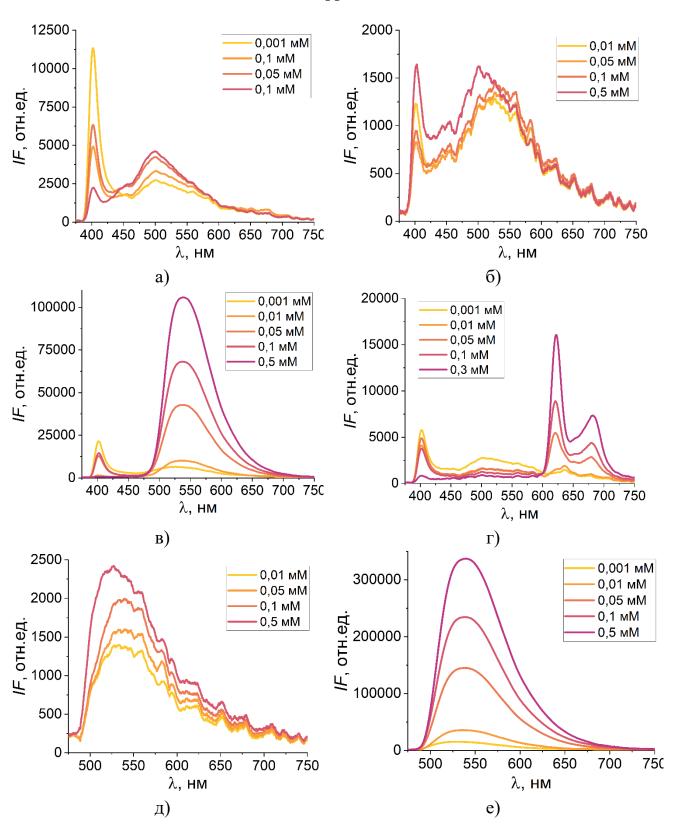


Рисунок 2.9 — Спектры флуоресценции растворов, зарегистрированные для длины волны возбуждения 365 нм: НАДН (а), билирубин (б), ФАД (в) и протопорфирин IX (г); и для длины волны 450 нм: билирубин (д) и ФАД (е)

Таким образом, результаты проведённых измерений подтвердили применимость выбранных параметров монохроматических источников излучения и спектрометра для регистрации спектров флуоресценции основных эндогенных флуорофоров печени и их изменений в зависимости от концентраций в пределах, сопоставимых с биологическими тканями, тем самым позволили уточнить специализированные МТТ к каналу ФС для устройств флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии.

2.3 Волоконно-оптический зонд для флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии

Отдельные требования предъявляются к волоконно-оптическому зонду, необходимому для передачи оптического излучения от источников излучения каналов ФС и СДО и для сбора обратно рассеянного излучения и флуоресценции от исследуемого объема ткани печени к приемнику излучения (спектрометру).

Размеры рабочей части зонда должны обеспечивать возможность доступа к печени через стандартные хирургические инструменты для чрескожных вмешательств и регистрации спектров флуоресценции и диффузного отражения. Для чрескожных дренирующих вмешательств используются специальные наборы пункционных игл для создания миниинвазивного доступа к оперируемому органу, которые далее расширяются с помощью дилататоров и далее в них устанавливаются дренажные катетеры. При разработке специализированных МТТ для волоконно-оптического зонда учитываются размеры только пункционных игл, используемых на начальном этапе создания чрескожного доступа, т.к. регистрация спектров осуществляется до установки дренажного катетера.

На рисунке 2.10 показан внешний вид атравматических пункционных игл из нержавеющей стали диаметром 17,5 G (по шкале Gauge — Гейдж для определения диаметров игл) с маркировкой в виде трех колец на конце иглы для обнаружения под ультразвуковым контролем, с помощью которого осуществляется обеспечение доступа к целевой области.

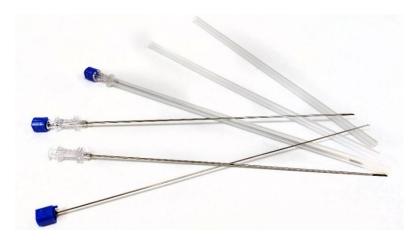


Рисунок 2.10 – Пункционные иглы 17,5 G (игла и внутренний стилет), используемые для чрескожного доступа к печени

Наружный диаметр рабочей части волоконно-оптического зонда определяется внутренним диаметром пункционной иглы, через которую зонд будет вводиться в исследуемые ткани печени. Диаметр зонда должен соответствовать диаметру стилета, входящего в набор к данной игле. Для значения 17,5 G наружный диаметр иглы составляет 1,3 мм; диаметр внутреннего стилета – 1 мм.

Длина рабочей части волоконно-оптического зонда выбирается исходя из того, что она должна быть больше, чем длина пункционной иглы, что обеспечит врачу-хирургу возможность наблюдать перемещение кончика непосредственно зонда при ультразвуковом контроле. При длине пункционной иглы 200 мм длина рабочей части с учетом анатомических особенностей печени и мнения врачей-хирургов была выбрана 250 мм. Т.к. пункционная игла и стилет обладают скосом торца 20°, аналогичное требование предъявляется к торцу волоконно-оптического зонда. Скос необходим как для введения иглы и зонда в паренхиматозную ткань, так и для того, чтобы во время оптических измерений обеспечивался плотный контакт зонда и ткани для более высокого сигнала, в том числе за счет исключения подтеков крови между зондом и тканью.

Оптические волокна должны обеспечивать пропускание оптического излучения в диапазонах, определенных для каналов СДО и ФС в разделах 2.1 и 2.2, соответственно, для чего можно использовать многомодовые кварцевые волокна. При выборе диаметра и количества волокон необходимо учитывать, что

внутренний диаметр металлической трубки рабочей части зонда обладает диаметром менее 1 мм, а также для обеспечения равномерного освещения исследуемой области биологической ткани, целесообразно расположить вокруг центрального приемного волокна несколько освещающих волокон меньшего диаметра для каждого источника излучения.

Среди требований к материалам необходимо отметить требование к изготовлению рабочей части волоконно-оптического зонда из медицинской стали, устойчивой к механическим, термическим и химическим воздействиям, а также применение нефлуоресцирующих материалов внутри зонда.

2.4 Устройство флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии

Таким образом, на основании проведённых исследований сформулированы специализированные МТТ, обеспечивающие возможность проведения дифференциального анализа функционального состояния печени интраоперационно методами ФС и СДО (таблица 2.3).

Таблица 2.3 — Специализированные МТТ, предъявляемые к устройству флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии

№	Параметр	Значение
1	2	3
1	Длина волны источников излучения в канале ФС, нм	$365 \pm 10; 450 \pm 5$
2	Длина волны источника излучения в канале СДО, нм	4001000
3	Мощность излучения на торце волоконно-оптического зонда, мВт	0,2
4	Диапазон регистрации спектров в каналах ФС и СДО, нм	350900
5	Спектральное разрешение приемника, менее, нм	2
6	Длина рабочей части волоконно-оптического зонда, мм	250
7	Диаметр рабочей части волоконно-оптического зонда, мм	1
8	Диаметр приемного волокна волоконно-оптического зонда, мкм:	
	- сердцевина;	200
	- с оболочкой.	290

Продолжение таблицы 2.3

1	2	3
9	Диаметр осветительного волокна волоконно-оптического зонда, мкм:	
	- сердцевина;	100
	- с оболочкой.	150
10	Числовая апертура волокон NA	0,22
11	Количество оптических волокон, шт.:	
	- приемное;	1
	- осветительное.	9
12	Количество разведенных каналов, шт.	4
13	Угол скоса торца рабочей части зонда, °	20

На основании проведенных исследований и сформулированных МТТ на базе научно-технологического центра биомедицинской фотоники ФГБОУ «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» собрана экспериментальная система на основе флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии для дальнейшего дифференциального анализа функционального состояния печени (рисунок 2.11). В качестве источников монохроматического излучения использовались светодиод 365 нм и лазерный диод 450 нм. Для регистрации спектров был использован ПЗС-спектрометр FLAME T-VIS-NIR-ES (Ocean Optics, США), позволяющий получать данные в диапазоне от 350 до 1000 нм со спектральным разрешением 0,2 нм (3648 пикселей ПЗС-матрицы). Чтобы выделить менее мощный полезный сигнал флуоресценции на фоне излучения от источника, в канале ФС перед спектрометром устанавливались оптические фильтры FGL400 и FGL495 (Thorlabs Inc., США), необходимые для отсечения обратно рассеянного излучения источников на длинах волн менее 400 нм и 495 нм, соответственно.

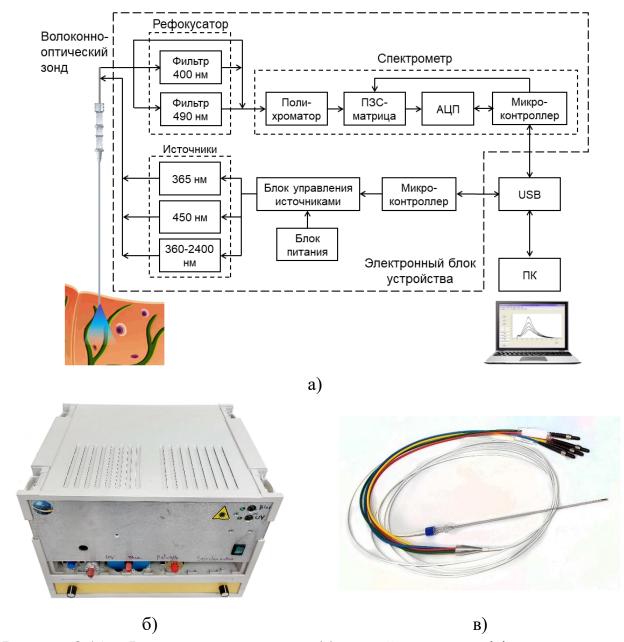


Рисунок 2.11 — Функциональная схема (а) устройства для дифференциального анализа функционального состояния печени на основе флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии, внешний вид электронного блока устройства (б) с волоконно-оптическим зондом (в)

Перед проведением измерений выбирается соотвествующий методу источник излучения – светодиод 365 нм или лазерный диод 450 нм для канала ФС, широкополосный источник – для канала СДО. Включение источников управляется персональным компьютером (ПК) через микроконтроллер и интерфейс USB. Микроконтроллер подает на блок управления сигнал включения источника

излучения. Через волоконно-оптический зонд излучение для выбранного канала поступает к биологическому объекту, возбуждая автофлуоресценцию эндогенных флуорофоров, а также рассеиваясь и поглощаясь хромофорами ткани. Излучение от биологической ткани собирается центральным оптическим волокном зонда и проходит через один из светофильтров в рефокусаторе для отсечения обратно рассеянного излучения источников. При измерениях методом СДО светофильтр убирается. После рефокусатора излучение поступает в спектрометр, который содержит полихроматор, раскладывающий падающий свет плоской решетке дифракционной В спектр, который поступает ПЗС-матрицу, на управляемую микроконтроллером спектрометра. Электрический сигнал ПЗСматрицы оцифровывается с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП) и передается на ПК по интерфейсу USB для дальнейшего анализа и отображения.

Примеры регистрируемых спектров флуоресценции и диффузного отражения, регистрируемых для предлагаемой конфигурации устройства, а также вид спектра широкополосного источника, зарегистрированного с помощью эталона диффузного отражения для калибровки и нормирования спектров для дальнейшей обработки, приведены на рисунке 2.12.

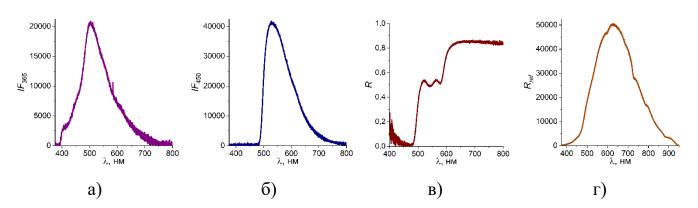


Рисунок 2.12 – Примеры спектров флуоресценции, получаемых с источниками излучения 365 нм (а), 450 нм (б), и спектров диффузного отражения после нормирования (в) на спектр эталона диффузного отражения (г)

Таким образом, система, соответствующая сформулированным специализированным МТТ к устройствам флуоресцентной и диффузно-

отражательной спектроскопии, обеспечивает регистрацию сигналов флуоресценции и диффузного отражения в требуемых диапазонах.

2.5 Оценка чувствительности канала флуоресцентной спектроскопии к метаболическим изменениям в биологических тканях

На следующем этапе проводилось *in vivo* исследование чувствительности к изменениям концентрации основных эндогенных флуорофоров, отражающих метаболическую активность в митохондриях клеток.

Разработка каналов для флуоресцентных измерений биологических тканей, в том числе канала ФС для дифференциального анализа функционального состояния печени требует надежных и воспроизводимых измерений спектральных характеристик как нормальных, так и патологических тканей в в соответствующем диапазоне длин волн и области исследования. Исследования способности предлагаемого устройства оценивать состояние биологических тканей *in vivo* необходимо для более точной интерпретации регистрируемых данных и дальнейшего внедрения технологии в клиническую практику.

Разные формы коферментов НАДН и ФАД (восстановленная форма НАДН и окисленная форма ФАД, длины волн возбуждения и эмиссии флуоресценции которых, а также их роль в биохимических реакциях приведены в таблице 2.2), содержащиеся в митохондриях и цитозоле клеток, обладают специфическими спектрами автофлуоресценции. Изменения интенсивностей флуоресценции НАДН и ФАД, связанные с возникновением различных патологических процессов (воспаление, канцерогенез, некроз и т.д.), возможно регистрировать *in vivo* [15,143]. Однако, спектры флуоресценции тканей являются следствием сложения флуоресценции не только НАДН и ФАД, но и ряда других эндогенных флуорофоров, эмиссия которых вызывается светом с длинами волн, близкими с тем же значениям, которые возбуждают флуоресценцию коферментов. В связи с этим для корректной интерпретации различий, наблюдаемых между тканями с различным функциональным состоянием, необходимо учитывать вклад НАДН и

ФАД в общий регистрируемый сигнал флуоресценции, для чего может быть использован подход ингибиторного анализа клеток и тканей.

Большинство протоколов подобных исследований были разработаны для измерений на клеточных культурах [142,257–260], лишь отдельные работы посвящены исследованиям, адаптирующим данный подход к целым органам модельных животных [261,262]. Для оценки чувствительности к метаболическим изменениями канала ΦC . соответствующего сформулированным **MTT** устройства специализированным флуоресцентной диффузноотражательной спектроскопии с волоконно-оптическим зондом, был разработан протокол измерений спектров флуоресценции in vivo, включающий в себя спектров флуоресценции поверхности регистрацию на предварительно подготовленных участков тканей кожи, скелетных мышц, печени и сердца модельного животного (крысы) после воздействия ингибитором окислительного фосфорилирования.

Протокол исследования схематично представлен на рисунке 2.13. Исследования были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (протокол заседания №12 от 6.09.2018) и проводились в соответствии с GLP [234].

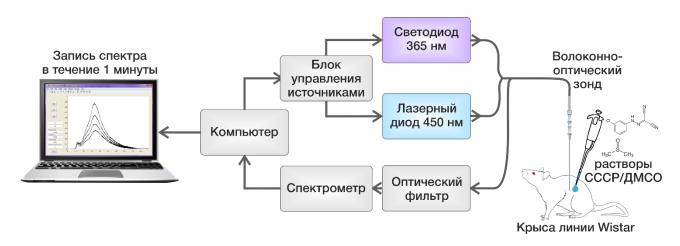


Рисунок 2.13 — Схема проведения эксперимента по оценке чувствительности предлагаемого канала ФС устройства флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии к метаболическим изменениям в биологической ткани

В качестве объекта исследования использовались клинически здоровые самцы крыс линии Wistar (n = 1, возраст 3 месяца, масса — около 220 г). Для моделирования быстрых изменений метаболической активности в клетках тканей использовался разобщитель окислительного фосфорилирования СССР, который ингибирует окислительное фосфорилирование за счет увеличения проницаемости митохондриальной мембраны, приводя к нарушению протонного градиента [263]. Стоковый раствор СССР (Sigma-Aldrich, США) готовили непосредственно перед исследованием с использованием растворителя ДМСО [142]. Помимо своей основной функции как органического растворителя, ДМСО также используется для оптического просветления тканей [264] в течение длительного времени после воздействия [265]. Другими особенностями ДМСО являются проникающая способность и возможность переноса в биологические ткани других химических соединений [266,267], что может быть использовано для получения и последующего наблюдения более выраженного эффекта СССР.

Внесение СССР вызывает снижение содержания НАДН в клетках, в то время как содержание ФАД, наоборот, повышается. Нарушение переноса протонов по электронно-транспортной цепи приводит к значительному снижению синтеза АТФ, а далее – к постепенному разрушению клеток и гибели организма [268]. Для подбора оптимальных значений достоверного отклика флуоресценции в зависимости от типа исследуемой биологической ткани и предполагаемых характеристик разрабатываемого канала ФС в ходе эксперимента использовались различные концентрации раствора СССР.

Перед исследованием крысу анестезировали препаратом Zoletil 100 (Vibrac, Франция) в стандартной дозировке и закрепляли на специальной платформе в положении на спине при помощи марлевого фиксатора. Измерения проводились после наступления глубокого наркоза. На первом этапе измерения проводились после нанесения фиксированного объема растворителя ДМСО (концентрации 100%, 10% и 1% после разведения в натрий-фосфатном буфере) и разобщителя СССР (концентрации 0,1 мМ и 0,01 мМ после разведения в ДМСО) на предварительно подготовленных участках кожи на животе. На втором этапе

проводились измерения на скелетных мышцах задней конечности крысы. Далее выполнялась лапаротомия для обеспечения доступа к брюшной полости с последующим нанесением растворов на поверхности печени и сердца.

Спектры флуоресценции регистрировались с интервалом в 1 с. Подбор мощностей источников излучения осуществлялся исходя из безопасности к воздействию непрерывного некогерентного монохроматического излучения на выбранных длинах волн на биологические ткани [269,270], а также для максимально возможного снижения влияния фотообесцвечивания. Перед нанесением растворов ДМСО и СССР проводилась регистрация спектров флуоресценции при непрерывном освещении ткани для учета наличия данного эффекта. В ряде случаев, преимущественно для источника излучения 450 нм, наблюдалось незначительное фотообесцвечивание тканей. Далее, если фотообесцвечивание не было выражено, наносились растворы веществ ДМСО, затем СССР, и для каждого раствора проводилась регистрация последовательности спектров. В ходе эксперимента спектры для нескольких сочетаний концентраций веществ и областей исследования были признаны неудовлетворительными из-за низкого соотношения сигнал-шум и были исключены из обработки данных.

Для анализа динамики интенсивности флуоресценции BO выбирались максимальные значения в диапазонах 480-530 нм и 500-550 нм в спектрах для источников излучения 365 нм и 450 нм, соответственно. Последовательность значений интенсивности флуоресценции в N-ую секунду IF_N эксперимента нормировалась путем деления на значение IF_0 зарегистрированное в начале измерений, чтобы оценить относительное изменение интенсивности флуоресценции между измеряемыми областями. На основании полученных соотношений были построены кривые изменения максимальных интенсивностей флуоресценции во времени.

Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции в ходе эксперимента с растворами ДМСО представлена на рисунках 2.14 (для источника 365 нм) и 2.15 (для источника 450 нм).

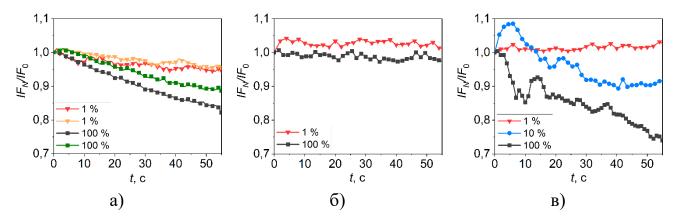


Рисунок 2.14 — Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции для источника излучения 365 нм после нанесения рабочих растворов ДМСО на поверхности кожи (а), мышц (б) и печени (в)

По полученным данным было отмечено, что спектры флуоресценции кожи и мышечной ткани крысы показывают удовлетворительную воспроизводимость. Интенсивность флуоресценции мышечной ткани оставалась относительно стабильной под воздействием раствора ДМСО с разными концентрациями независимо от источника возбуждения, снижаясь не более, чем на 10%. Падение сигнала на коже составило более 10 % в случае воздействия на ткани более высокой концентрацией ДМСО.

Было отмечено более выраженное снижение интенсивности флуоресценции в тканях печени и сердца. В частности, при использовании излучения на длине волны 450 нм снижение флуоресценции в печени достигло более 25 % (рисунок 2.15) даже при малых концентрациях действующего агента. При возбуждении излучением 365 нм падение сигнала было значительным только при воздействии на ткани печени ДМСО в концентрации 100% (рисунок 2.14).

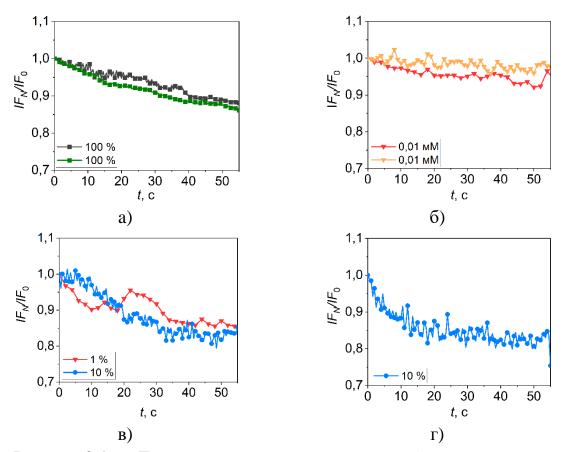


Рисунок 2.15 – Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции для источника излучения 450 нм после нанесения рабочих растворов ДМСО на поверхности кожи (а), мышц (б), печени (в) и сердца (г)

Поскольку при записи спектров флуоресценции были предприняты меры по устранению или как можно большему искажению регистрируемых данных эффектом фотообесцвечивания, можно полагать, что полученный результат был обусловлен токсическим действием ДМСО, который способен вызывать изменения в структуре клеточной мембраны при определенных концентрациях. ДМСО отличается от других веществ, относящихся к группе полярных апротонных растворителей, более низкой токсичностью. Известно, что в исследованиях *in vivo* ДМСО не оказывает токсического действия при концентрациях вплоть до 10 % [271,272], но при более высоких концентрациях проявляются свойства ингибитора митохондриального дыхания, что приводит к апоптозу клеток [273,274]. Встречаются сведения о механизмах токсического действия ДМСО при концентрациях около 2-4 % [275].

Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции в ходе эксперимента с рабочими растворами СССР представлена на рисунках 2.16 (для источника излучения 365 нм) и 2.17 (для источника 450 нм). По аналогии с измерениями с растворами ДМСО было замечено, что ткани кожи и мышц независимо от концентрации вещества показали менее выраженный ожидаемый эффект от СССР в отличие от тканей печени и сердца. Также возможной причиной наблюдаемой динамики могло быть то, что СССР и ДМСО оказывали разнонаправленное влияние на сигнал флуоресценции, тем самым частично компенсируя друг друга.

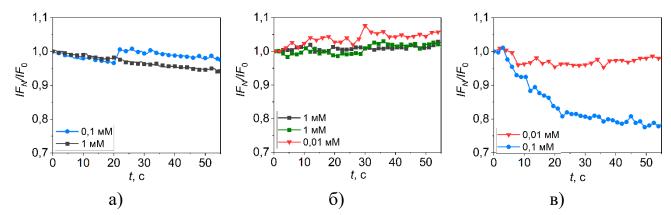


Рисунок 2.16 – Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции для источника излучения 350 нм после нанесения рабочих растворов СССР на поверхности кожи (а), мышц (б) и печени (в)

После воздействия на ткани печени рабочим раствором СССР с концентрацией 0,1 мМ было замечено, что флуоресценция, вызванная излучением источника 365 нм, уменьшилась в той же степени, как при воздействии исходным раствором ДМСО (рисунок 2.14), при этом значительное снижение наблюдалось преимущественно в течение первых 20 с. Т.к. нарушение окислительного фосфорилирования вследствие разобщения протонного перехода приводит к увеличению потребления электронов, реакции окисления донора электронов НАДН до НАД происходят более активно. В отличие от НАДН, НАД не обладает выраженным спектром флуоресценции, в связи с чем снижение содержания

восстановленной формы в клетках обнаруживается по снижению максимальной интенсивности флуоресценции [142].

Для флуоресценции, возбужденной излучением с длиной волны 450 нм (рисунок 2.17), было замечено значительное увеличение в тканях печени и сердца после внесения стокового раствора СССР 1 мМ.

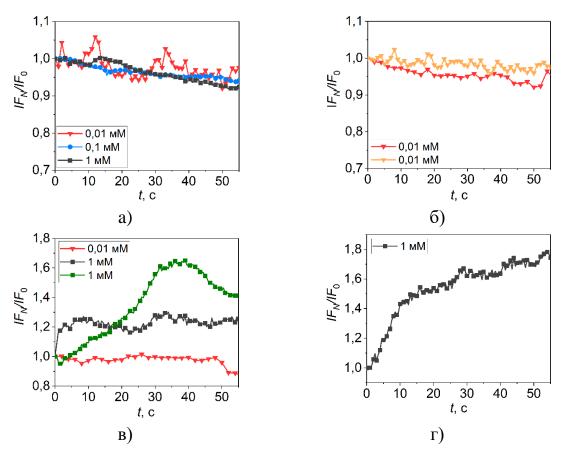


Рисунок 2.17 — Динамика изменения максимальной интенсивности флуоресценции для источника излучения 450 нм после нанесения рабочих растворов СССР на поверхности кожи (а), мышц (б), печени (в) и сердца (г)

Наблюдаемая динамика может быть обусловлена тем, что по мере того, как СССР стимулирует реакции окислительного фосфорилирования, тем самым повышая активность митохондрий, возрастает потребление электронов и окисление восстановленной формы ФАДН₂ до ФАД, что приводит к увеличению интенсивности флуоресценции [276].

Результаты экспериментальных исследований показали, что кожа и скелетные мышцы задней лапы крысы были менее восприимчивы к воздействию использованных химических соединений, в то время как внутренние органы оказались более чувствительными и продемонстрировали как ожидаемый эффект разобщения окислительного фосфорилирования при воздействии СССР, так и токсический эффект растворителя ДМСО. Использование различных концентраций растворов не вызвало различий в скорости и величине изменений интенсивности флуоресценции кожи и мышц в то время, как высокие концентрации растворов на тканях печени и сердца позволили добиться более выраженного и быстрого отклика сигнала флуоресценции за счет изменений метаболической активности клеток в тканях *in vivo*.

Результаты, продемонстрировали возможность канала ФС, соответствующего разработанным специализированным МТТ, регистрировать изменения автофлуоресценции тканей в ходе эксперимента с применением методики ингибиторного анализа клеточного метаболизма *in vitro*, адаптированной для *in vivo* измерений в тканях органов. Наблюдался выраженный эффект на регистрируемые спектры флуоресценции при изменении метаболической активности в тканях различных органов, в том числе печени [277*].

2.6 Выводы по главе 2

1) Предложена методика подготовки тканей печени к измерениям оптических характеристик, позволяющая снизить повышенное влияние поглощения света окси- и дезоксигемоглобином в видимом диапазоне. Предварительное перфузирование печени раствором HBSS позволило снизить влияние гемоглобина на регистрируемые и рассчитываемые оптические параметры в видимом диапазоне и использовать полученные результаты при расчетах спектров диффузного отражения в печени с различным содержанием тканевых хромофоров. Проведено аналитическое моделирование спектров диффузного отражения, учитывающее различия в тканевой сатурации и содержании крови, воды, липидов и желчи в

паренхиме печени, что позволило имитировать структурные изменения при различных патологических состояниях, которые могут сопровождать МЖ. Обоснованы специализированные МТТ для широкополосного источника излучения и спектрометра для регистрации спектров диффузного отражения.

- 2) Проведен обзор основных эндогенных флуорофоров паренхимы печени, определяющих состав спектров флуоресценции. Исходя из данных характеристик и МТТ, обоснованных для канала СДО, проведено измерение спектров флуоресценции растворов флуорофоров НАДН, ФАД, билирубина и протопорфирина IX, продемонстрировавшее возможность регистрации сигналов и их изменений в зависимости от концентраций в пределах, сопоставимых с содержанием в биологических тканях. Обоснованы специализированные МТТ для монохроматических источников излучения 365 нм и 450 нм и спектрометра для регистрации спектров флуоресценции.
- 3) Сформированы специализированные МТТ к каналам ФС и СДО устройства флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии, а также к волоконно-оптическому зонду исходя из применяемых в клинической практике миниинвазивной процедуры билиарной инструментов для декомпрессии. Предложен принцип построения и вариант реализации экспериментальной системы флуоресцентной диффузно-отражательной спектроскопии, И обеспечивающей проведения оптической возможность диагностики за счет доставки оптического интраоперационно излучения помощью c разработанного волоконно-оптического зонда.
- 4) Проведена оценка чувствительности измерений методом ФС на длинах волн монохроматического излучения 365 нм и 450 нм, выбранных исходя из целевых флуорофоров клеточного метаболизма НАД(Ф)Н и ФАД, демонстрирующая способность предлагаемого канала ФС регистрировать изменения флуоресценции, обусловленные метаболическими изменениями в тканях.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХИ

На следующем этапе диссертационного исследования с целью разработки метода дифференциального анализа функционального состояния печени при синдроме МЖ были проведены экспериментальные исследования в условиях клиники, включающие в себя:

- 1) разработка и обоснование протокола экспериментального исследования методами ФС и СДО с участием пациентов с синдромом МЖ различной этиологии и тяжести состояния и алгоритма обработки получаемых данных;
- 2) анализ полученных результатов ФС и СДО, в том числе выявление различий в измеряемых и рассчитываемых параметрах вкладов основных флуорофоров паренхимы печени в сравнении с условной группой и интерпретация полученных результатов в соответствии с известными данными об изменениях, происходящих в тканях печени при развитии ПН для обоснования подхода к оценке различий внутри группы пациентов с МЖ;
- 3) обоснование разделения пациентов с МЖ на группы с положительной и отрицательной динамикой состояния после билиарной декомпрессии и анализ различий полученных результатов ФС и СДО для выделения диагностических параметров в качестве пространства признаков для дальнейшей разработки модели классификации для метода дифференциального анализа функционального состояния печени.

3.1 Методика проведения исследования

Исследование проводилось на базе отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения БУЗ Орловской области «Орловская областная клиническая больница» и было одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО

«Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (протокол заседания № 14 от 24.01.2019).

В первом этапе исследования приняли участие 20 пациентов с диагнозом МЖ следующей этиологии: 15 пациентов — злокачественные опухоли, 4 пациента — холедохолитиаз, 1 пациент — киста головки поджелудочной железы. Критерием исключения являлось наличие у пациентов неалкогольной жировой болезни печени и алкогольного цирроза печени. Оптические измерения проводились во время процедуры декомпрессии желчевыводящих путей путем наружной чрескожной чреспеченочной холангиостомии под ультразвуковым и рентгенологическим контролем.

Ввиду невозможности получения спектров флуоресценции печени здоровых добровольцев без синдрома МЖ для формирования полноценной контрольной группы, были частично использованы данные, полученные ранее в исследованиях по применению оптической биопсии методами ФС и СДО для проведения диагностики у пациентов с новообразованиями печени во время стандартной процедуры пункционной биопсии [29*]. В группу сравнения вошли данные 11 у которых не был диагностирован синдром МЖ. пациентов, Спектры флуоресценции регистрировались по ходу движения пункционной иглы и введенного в нее волоконно-оптического зонда в тканях печени, не затронутых злокачественным новообразованием, исследования проводились по протоколу, описанному в работе [29*]. Таким образом, представилось возможным провести сравнение результатов оптических измерений как при наличии, так и отсутствии синдрома МЖ.

Диагностика функционального состояния биологических тканей с помощью метода ФС является ценным источником информации об изменениях в их структуре и происходящих метаболических процессах. При всех преимуществах и возможностях флуоресцентных методов в измерениях *in vivo*, нужно учитывать, что биологические ткани представляют собой гетерогенные сложные структуры, содержащие различные флуорофоры в разных концентрациях и на разной глубине [278,279]. Учитывая, что регистрируемые спектры флуоресценции тканей являются

суммой спектров отдельных флуорофоров, выполняющих различные метаболические и структурные функции, подход к деконволюции спектров флуоресценции на их основные компоненты продемонстрировал широкие возможности для применения в различных областях медицины [172,280,281]. Возможности выбранной методики получения дополнительной диагностической информации о функциональном состоянии паренхимы печени с помощью гауссовых кривых также были широко продемонстрированы ранее [18,19,173].

Схема исследования для разработки параметров ФС представлена на рисунке 3.1. Полученные спектры флуоресценции обрабатывались и анализировались с помощью программного обеспечения OriginPro 2021.

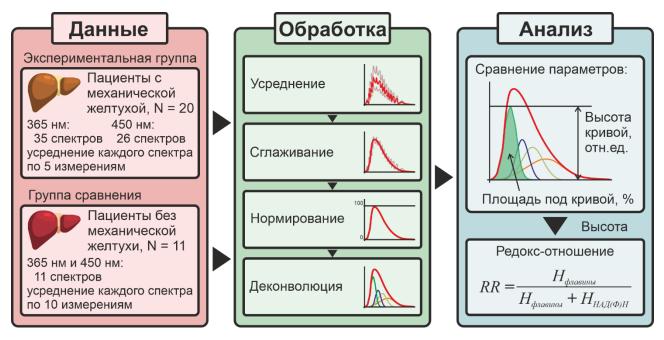


Рисунок 3.1 – Протокол исследования и алгоритм обработки полученных данных

В ходе одного измерения для каждого пациента с синдромом МЖ записывали по 5 спектров флуоресценции на каждой длине волны возбуждения в 1-2 точках, затем данные спектры усредняли в пределах одной точки. Таким образом, далее анализировались 35 усредненных спектров для излучения 365 нм и 26 спектров для излучения 450 нм. В группе сравнения было использовано 11 спектров, каждый из которых аналогично был усреднен по 10 измерениям в одной точке ткани печени.

Для корректного расчета анализируемых параметров и дальнейшего применения при разработке алгоритма дифференциального анализа при выборе спектров проводилась оценка соотношения сигнал-шум:

$$SNR_{ex} = \frac{\overline{IF}_{\lambda_{ex}}}{\sigma_N},\tag{3.1}$$

где $\overline{IF}_{\lambda_{ex}}$ — средняя интенсивность флуоресценции в диапазоне максимальной интенсивности в спектре флуоресценции для источника возбуждения на длине волны λ_{ex} ;

 σ_N — СКО шума в диапазоне 375-385 нм, входящем в полосу подавления излучения светофильтрами 400 нм и 490 нм.

Для расчета соотношений сигнал-шум в спектрах флуоресценции, зарегистрированных при возбуждении источником 365 нм, был выбран диапазон 495-515 нм, для источника 450 нм интенсивность флуоресценции усреднялась в диапазоне 520-540 нм. Примеры спектров флуоресценции, соответствующих различным значениям соотношения сигнал-шум (указаны на рисунке), приведены на рисунке 3.2.

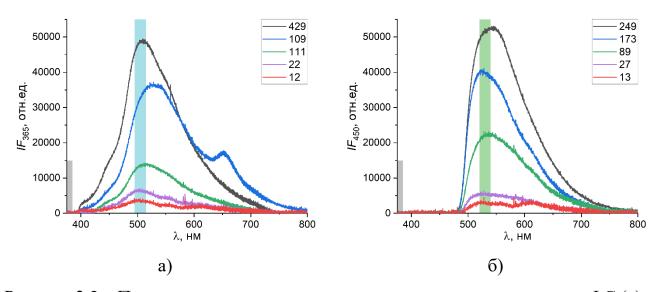


Рисунок 3.2 – Примеры спектров печени, зарегистрированных методами ΦC (a) и СДО (б) при различных значениях соотношения сигнал-шум

Для спектров с низкой интенсивностью полезного сигнала флуоресценции, а также искажением формы спектра из-за влияния поглощающих свойств гемоглобина, было обнаружено, что значения соотношения не превышали 15 (для источника излучения 365 нм) и 20 (для источника излучения 450 нм). Данные спектры не использовались при анализе данных, т.к. влияние гемоглобина не позволяет корректно оценить вклады отдельных флуорофоров в общий спектр флуоресценции. Выбранные значения учитывались в дальнейшем при обработке данных на втором этапе экспериментальных исследований и в разработке алгоритма для применения метода дифференциального анализа функционального состояния печени.

Для последующей обработки усреднённые спектры флуоресценции подвергались сглаживанию с использованием фильтра [282], основанным на методе наименьших квадратов и построении аппроксимирующего полинома по заданному числу точек, что позволяет исключить шум, но не исказить форму спектров. Для сглаживания спектров использовался полином 2 степени, количество точек – 40. Сглаженные спектры были нормированы в масштабе от 0 до 100. Следующий этап обработки включал нелинейную процедуру деконволюции на основе алгоритма Левенберга-Марквардта – распространенного метода решения задачи о наименьших квадратах, основанного на алгоритме Гаусса-Ньютона и градиентного спуска. В ходе расчета были вычислены комбинации гауссовых кривых, отражающих вклад отдельных флуорофоров в общий сигнал, полученный наиболее печени, И суммы которых точно соответствуют ткани зарегистрированным спектрам флуоресценции. Сумма кривых, рассчитанных в соответствии с исходными спектрами флуоресценции, описывается формулой гауссовой функции, выраженной через полуширину:

$$F(\lambda) = F_0 + \sum_{i=1}^{m} \frac{A_i \cdot e^{\frac{-4 \ln(2)(\lambda - \lambda_i)^2}{FWHM_i^2}}}{FWHM_i \cdot \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln(2)}}},$$
(3.2)

где F_0 – базовый уровень флуореценции;

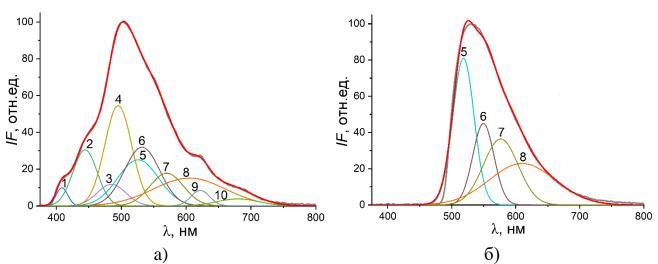
m – число флуорофоров;

 A_i — площадь под гауссовой кривой, соответствующей флуоресценции i-го флуорофора, где $i \in \{0,1,...,m\}$;

 λ_i — центральная длина волны гауссовой кривой, соответствующей флуоресценции i-го флуорофора, где $i \in \{0,1,...,m\}$;

 $FWHM_i$ — полуширина гауссовой кривой, соответствующей флуоресценции i-го флуорофора, где $i \in \{0,1,...,m\}$;

Количество гауссовых кривых, их центральные длины волн и значения полуширины изначально подбирались из литературных данных о флуорофорах паренхимы печени, а затем эмпирически корректировались при обработке, чтобы обеспечить как можно лучшее соответствие измеренным спектрам (рисунок 3.3) [19,172,173,283]. Критерием качества подбора сочетания кривых я наибольшее значение коэффициента детерминации R^2 .



1 — фибриллярные белки (коллаген и эластин); 2 — НАД(Ф)Н (НАДН и НАДФН); 3 — жирные кислоты; 4 — витамин А; 5, 7 — билирубин (два пика на длинах волн 520 и 570 нм); 6 — флавины; 8 — липофусцин; 9 — протопорфирин IX;

10 – производные порфирина

Рисунок 3.3 – Примеры деконволюции спектров флуоресценции печени для длин волн возбуждения 365 нм (а) и 450 нм (б)

Длины волн возбуждения и эмиссии флуоресценции выбранных флуорофоров приведены в таблице 2.2. В общей сложности для восстановления общих спектров флуоресценции, полученных при возбуждении излучением 365 нм, было выделено 10 кривых (рисунок 3.3 а), для спектров, полученных при возбуждении излучением 450 нм — 4 кривые (рисунок 3.3 б), которые были использованы с целью получения информации о потенциальном вкладе флуорофоров в состав флуоресценции паренхимы печени.

Кривые флуорофоров: билирубина, флавинов, липофусцинов и производных протопорфирина одинаковы для обоих типов спектров, но максимумы излучения и, следовательно, центральные длины волн гауссовых кривых смещены вправо для спектров ФС в канале 450 нм.

Оценивались следующие характеристики: высота пиков (H_i) , площади под гауссовыми кривыми (A_i) и их относительный вклад в общие площади под спектрами флуоресценции $(A_i/A_{\text{спектр}})$. Статистическая значимость различий между параметрами проверялась с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни в связи с ограниченным размером выборки и отсутствием подтвержденного нормального распределения результатов в части сравниваемых параметров.

Во втором этапе исследования была использована выборка из данных 40 пациентов (возраст 66±13 лет) с синдромом МЖ различной этиологии (30 человек – со злокачественными новообразованиями гепатопанкреатодуоденальной зоны, 8 человек – с желчнокаменной болезнью, 2 человека – с кистой головки поджелудочной железы) и тяжести состояния. Измерения проводились методами ФС и СДО.

При анализе данных СДО спектр отраженного от ткани печени излучения нормировался на референсный спектр от эталона диффузного отражения, изготовленного из спектралона с известной отражательной способностью, тем же широкополосным источником, который используется непосредственно в измерениях печени. Значение тканевой сатурации рассчитывалось [284] по формуле:

$$StO_2 = \frac{\mu_{Hb}(\lambda_1) - \mu_{Hb}(\lambda_2) \cdot \frac{R(\lambda_2)}{R(\lambda_1)}}{\mu_{Hb}(\lambda_1) - \mu_{HbO2}(\lambda_1)},$$
(3.3)

где μ_{Hb} – коэффициент поглощения дезоксигемоглобина;

 μ_{HbO_2} — коэффициент поглощения оксигемоглобина;

 λ_1 – длина волны неизобестической точки;

 λ_2 – длина волны изобестической точки;

 $R(\lambda)$ — коэффициент диффузного отражения на выбранной длине волны;

Для расчета тканевой сатурации использовали коэффициенты отражения, зарегистрированные в изобестической (805 нм) и неизобестической (760 нм) точках спектров поглощения БИК излучения окси- и дезоксигемоглобином.

3.2 Анализ результатов экспериментальных исследований для подбора параметров флуоресцентной спектроскопии

На рисунке 3.4 приведены усредненные нормированные спектры флуоресценции для двух анализируемых групп пациентов.

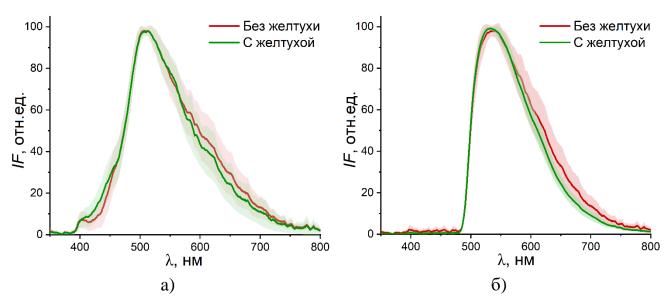


Рисунок 3.4 — Усредненные нормированные (среднее \pm СКО) спектры флуоресценции тканей печени для длин волн возбуждения 365 нм (a) и 450 нм (б)

Для спектров флуоресценции при возбуждении 365 нм в группе пациентов с МЖ наблюдалось увеличение флуоресценции в диапазоне 400-450 нм и снижение – в диапазоне 550-700 нм. Спектры для излучения 450 нм показали снижение в диапазоне около 550-750 нм для группы пациентов с МЖ.

В таблице 3.1 приведены результаты расчета выбранных параметров для флуорофоров в спектрах длины волны возбуждения флуоресценции 365 нм. Результаты представлены в виде: медиана [25-й и 75-й процентили]. * отмечены статистические значимые различия при p < 0.05.

Таблица 3.1 — Результаты расчета параметров гауссовых кривых в спектрах флуоресценции при возбуждении излучением на длине волны 365 нм

Флуорофор	H_i , or	гн.ед.	A_i/A_{cno}	$A_i\!/\!A_{ m cnektp},\%$		
Ψηγοροφορ	Без желтухи	С желтухой	Без желтухи	С желтухой		
1	2	3	4	5		
1 — фибриллярные белки $\lambda_1 = 405$ нм; $FWHM_1 = 21$ нм	5,1	7,9	0,8	1,2		
	[4,4; 9,2]	[3,3; 9,6]	[0,6; 1,6]	[0,5; 1,6]		
$2 - HAД(\Phi)H$ $\lambda_2 = 448 \text{ нм};$ $FWHM_2 = 44 \text{ нм}$	8,5	* 17,3	2,6	* 5,9		
	[7,4; 9,8]	[14,0; 27,8]	[2,5; 3,1]	[4,5; 10,3]		
3 — жирные кислоты $\lambda_3 = 482$ нм; $FWHM_3 = 53$ нм	7,7	* 0,1	3,0	* 0,3		
	[0,0; 14,0]	[0,0; 3,4]	[0,0; 5,0]	[0,0; 1,5]		
4 — витамин А $\lambda_4 = 497\mathrm{HM};$ $FWHM_4 = 49\mathrm{HM}$	43,0	* 50,9	14,1	* 19,2		
	[36,8; 50,3]	[46,3; 61,1]	[13,7; 18,0]	[16,0; 24,6]		
5 — билирубин (1 пик) $\lambda_5 = 522$ нм; $FWHM_5 = 74$ нм	23,9	22,0	13,7	12,6		
	[23,3; 27,9]	[19,0; 24,7]	[11,9; 15,2]	[9,7; 14,2]		
6 — флавины $\lambda_6 = 530$ нм; $FWHM_6 = 65$ нм	30,2	34,6	14,4	* 17,5		
	[27,5; 36,5]	[32,7; 38,6]	[12,6; 17,3]	[15,0; 19,7]		

Продолжение таблицы 3.1

1	2	3	4	5
7 — билирубин (2 пик) $\lambda_7 = 569$ нм; $FWHM_7 = 61$ нм	19,7	18,4	8,6	8,6
	[16,7; 20,6]	[17,0; 20,2]	[8,3; 9,6]	[7,8; 9,5]
8 — липофусцин $\lambda_8 = 603$ нм; $FWHM_8 = 131$ нм	37,3	27,2	35,7	* 26,7
	[26,3; 44,0]	[18,5; 33,4]	[27,1; 39,5]	[19,8; 31,6]
9 — протопорфирин IX $\lambda_9 = 618$ нм; $FWHM_9 = 35$ нм	4,1	6,4	1,1	* 1,8
	[3,1; 7,4]	[5,0; 7,7]	[0,8; 2,1]	[1,4; 2,4]
10 — производные порфирина $\lambda_{10} = 679$ нм; $FWHM_{10} = 76$ нм	6,9	4,0	3,8	2,5
	[2,7; 9,2]	[2,6; 5,6]	[1,7; 4,8]	[1,6; 3,2]

114

Наибольшие значения высоты ожидаемо наблюдались для компонентов, характеризующих флуорофоры со спектрами эмиссии, наиболее близкими к максимуму всего спектра, в частности, витамина А и флавинов. Также был отмечен значительный вклад липофусцина, но без статистически значимых различий. В группе пациентов с МЖ наблюдалось статистически значимое увеличение высоты кривых НАД(Ф)Н и витамина А и уменьшение — жирных кислот. Кривые фибриллярных белков и порфиринов также вносили незначительный вклад на краях спектров, но в ряде спектров наблюдалось небольшое характерное увеличение флуоресценции протопорфирина IX на длине волны 625 нм.

Проценты площади под отдельными гауссовыми кривыми в общей площади спектра показывают большее число статистически значимых различий между группами. Наибольший вклад в площадь спектра был обусловлен кривой липофусцина, которая аналогично высоте демонстрировала большой разброс значений. Также вновь был заметен высокий уровень флуоресценции витамина А. Доля площадей кривых билирубина не показала статистически значимых различий между группами в отличие от флавинов, вклад площади которых увеличивается так

же, как и в случае $HAД(\Phi)H$, что может свидетельствовать об изменениях в энергетическом метаболизме.

Результаты расчетов для спектров, возбуждаемых излучением на длине волны 450 нм, приведены в таблице 3.2. Результаты представлены в виде: медиана [25-й и 75-й процентили]. * отмечены статистические значимые различия при p < 0.05. Для обоих параметров в группе пациентов с МЖ наблюдалось увеличение вклада билирубина и флавинов и уменьшение вклада липофусцина. По высоте кривой наблюдалось двукратное преобладание основного пика флуоресценции билирубина по сравнению со второй кривой билирубина и флавинов. При сравнении процентных соотношений площадей было отмечено преобладание вклада билирубина над вкладом флавинов.

Таблица 3.2 – Результаты расчета параметров гауссовых кривых в спектрах флуоресценции при возбуждении излучением на длине волны 450 нм

Флуорофор	H_i , or	гн.ед.	A_i/A_{cnektp} , %		
Ψηγοροφορ	Без желтухи	С желтухой	Без желтухи	С желтухой	
5 — билирубин (1 пик) $\lambda_5 = 518$ нм; $FWHM_5 = 39$ нм	74,0	79,0	22,3	* 27,2	
	[70,2; 80,6]	[74,7; 81,6]	[20,7; 28,8]	[25,5; 29,0]	
6 — флавины $\lambda_6 = 549 \; \mathrm{HM};$ $FWHM_6 = 39 \; \mathrm{HM}$	39,7	* 46,0	12,3	* 16,3	
	[34,8; 44,4]	[43,7; 48,5]	[10,3; 15,6]	[15,3; 17,4]	
$7 -$ билирубин (2 пик) $\lambda_7 = 577$ нм; $FWHM_7 = 63$ нм	32,4	* 37,4	17,1	* 21,0	
	[30,6; 37,3]	[35,5; 38,4]	[15,0; 19,7]	[19,4; 22,2]	
8 — липофусцин $\lambda_8 = 610$ нм; $FWHM_8 = 123$ нм	49,9	* 31,1	49,5	* 34,6	
	[31,1; 53,0]	[29,2; 37,1]	[35,2; 53,6]	[32,6; 39,8]	

Параметры кривых в диапазоне 450-600 нм претерпевали наиболее значительные изменения в группе пациентов с синдромом МЖ. Эти изменения наблюдались в спектрах флуоресценции для обоих источников излучения, поэтому

они были рассмотрены далее как потенциальные маркеры для дифференциального анализа функционального состояния печени. Стоит отдельно отметить, что параметры кривых, представляющих флуоресценцию жирных кислот, чаще принимали значения, близкие к нулю, при этом наблюдался их большой разброс в группе пациентов без синдрома МЖ. В целом, считается, что вклад жирных кислот в общую флуоресценцию печени незначителен, и исследования, направленные на его учет, в настоящее время не так широко распространены [174,253].

Поскольку исследование было посвящено поиску новых диагностических инструментов для оценки наличия и степени ПН, на данном этапе было решено более подробно проанализировать флуорофоры, содержание которых позволило бы судить о состоянии энергетического метаболизма и выделительной функций печени: НАД(Ф)Н, флавины и билирубин. Вклад витамина А также был оценен в качестве еще одного важного флуорофора, перспективного в качестве возможного маркера ПН.

На основании значений высоты кривых флуоресценции НАД(Ф)Н и флавинов было дополнительно рассчитано окислительно-восстановительное, или редокс-отношение, служащее для оценки изменений в клеточном метаболизме, в частности соотношения продукции АТФ в митохондриях через гликолиз и окислительное фосфорилирование. Для расчета редокс-отношения был использован один из распространенных подходов к его оценке, выраженный в формуле [173,285,286]:

$$RR = \frac{H_{\phi \text{лавины}}}{H_{\text{НАД}(\Phi)\text{H}} + H_{\phi \text{лавины}}},$$
 (3.4)

где RR – редокс-отношение;

 $H_{\rm флавины}$ — высота кривой, относящейся к флуоресценции флавинов в спектрах, возбужденных на длине волны 450 нм;

 $H_{\rm HAД(\Phi)H}$ — высота кривой, относящейся к флуоресценции НАД(Ф)Н в спектрах, возбужденных на длине волны 365 нм.

Анализ параметров кривых (рисунок 3.5) показал статистически значимое преобладание флуоресценции НАД(Φ)Н для значений обоих параметров в спектрах, возбужденных излучением 365 нм.

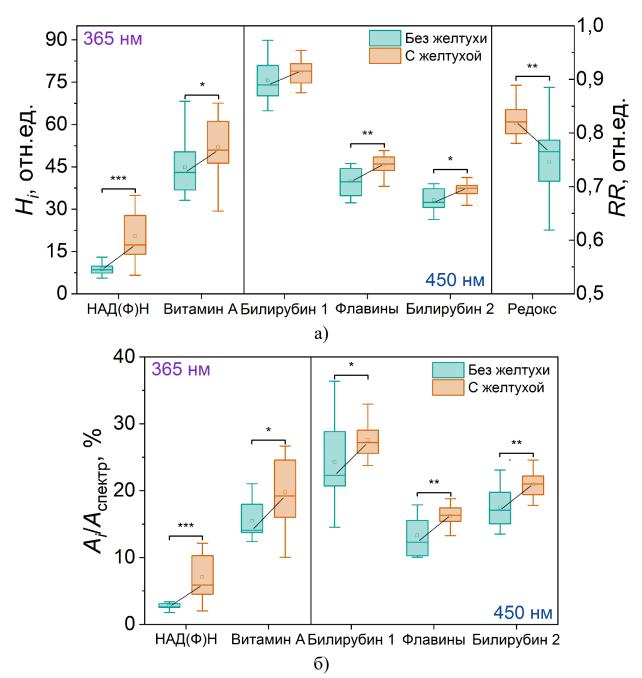


Рисунок 3.5 — Сравнение параметров гауссовых кривых флуорофоров печени: высота гауссовых кривых и редокс-отношение (а), процент площади под гауссовыми кривыми флуорофоров в общей площади под кривой спектра флуоресценции (б). Медианные значения между группами соединены линиями. Статистически значимые различия для: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Анализ кривых, полученных для спектров, возбуждаемых излучением на длине волны 450 нм, выявил статистически значимое увеличение процента площади как кривых билирубина, так и флавинов, и менее выраженное увеличение этого параметра для кривой флавинов и второго пика флуоресценции билирубина [287*,288*]. Рассчитанные значения редокс-отношения претерпели статистически значимое снижение в группе пациентов с МЖ (медиана 0,77; 25-й и 75-й процентили: 0,71-0,79) по сравнению с пациентами без этого синдрома (медиана 0,82; 25-й и 75-й процентили: 0,80-0,84).

На данном этапе экспериментального сбора данных обработка была направлена на то, чтобы учесть влияние как можно большего числа компонентов спектров флуоресценции для более точного подбора кривых и определения того, какие именно флуорофоры в дальнейшем лучше подойдут для решения описанной ранее диагностической задачи. Тем не менее необходимо отметить, что при выборе входных параметров были сделаны некоторые допущения, исходя из технических возможностей используемой реализации метода ФС и отсутствия необходимости более детального разделения отдельных кривых внутри группы флуорофоров. В частности, вклад флуоресценции свободной и связанной формы НАД(Ф)Н не анализировался раздельно, также не выделялись различные типы свободных жирных кислот [173,289].

При дальнейшем анализе параметров кривых флуорофоров, представляющих интерес для диагностики функционального состояния печени – НАД(Ф)Н, флавинов и билирубина – были сделаны следующие выводы. Прежде всего, увеличение вклада билирубина в спектры флуоресценции у больных с синдромом МЖ было ожидаемым эффектом, поскольку это является прямым следствием нарушения оттока желчи из печеночных ацинусов в протоки. Развивающаяся билиарная гипертензия является одним из факторов нарушения кровоснабжения клеток печени, что приводит к повреждению мембран холангиоцитов и гепатоцитов.

Результаты, полученные для остальных флуорофоров и отражающие метаболические изменения, являются следствием билиарной обструкции с

накоплением билирубина и желчных кислот. Увеличение содержания билирубина приводит к нарушениям окислительного фосфорилирования и антиоксидантной защиты, снижению биоэнергетических процессов в митохондриях гепатоцитов, ингибированию активности цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы [290,291]. Преобладание НАД(Ф)Н может указывать на нарушение утилизации кислорода, что приводит к тяжелой тканевой гипоксии и последующему повреждению гепатоцитов и печени в целом. Длительная и прогрессирующая желтуха приводит к нарушению функции печени, что в конечном итоге приводит к ПН, а гипоксия считается одной из наиболее распространенных причин этого состояния [292].

Можно предположить, что другой донор электронов в цитозоле – НАДФН – также мог повлиять на вклад в общую флуоресценцию от кривой $HAД(\Phi)H$. HAДHи НАДФН имеют схожие спектры флуоресценции, но при этом эти вещества выполняют разные роли в клетках. НАДН преимущественно участвует в реакциях энергетического метаболизма, а НАДФН – в анаболических реакциях, в том числе связанных антиоксидантной защитой [293]. Вследствие эндогенной интоксикации гепатоцитов усиливается накопление активных форм кислорода вместе со снижением антиоксидантной защиты, тем самым приводя к развитию окислительного стресса [294–296]. Поскольку одним из факторов окислительного стресса при различных заболеваниях печени является активация НАДФН-оксидазы [297,298], катализирующей реакцию, при которой НАДФН окисляется до НАДФ+, предполагается, что большая часть наблюдаемого увеличения вклада кривой НАД(Ф)Н в спектр флуоресценции обусловлена повышением уровня НАДН вследствие гипоксии, нежели изменениями в содержании НАДФН из-за окислительного стресса. Однако более точное разделение флуоресценции этих коферментов методом ФС представляется затруднительным.

Изменения в скорости метаболических процессов, обусловленные гипоксией, также подтверждаются значениями редокс-соотношений [299]. Согласно методу, который был использован для расчета значений редокс-соотношения, снижение можно интерпретировать как преобладание гликолиза над

окислительным фосфорилированием вследствие гипоксии. При окислительном фосфорилировании НАД(Ф)Н теряет электрон и преобразуется в НАД(Ф)+, который не флуоресцирует. В отличие от этого, НАД(Ф)Н накапливается во время гликолиза. В случае флавинов флуоресцирующий кофермент ФАД образуется преимущественно в результате окислительного фосфорилирования из нефлуоресцирующей формы ФАДН₂. При гипоксии в клетке наблюдается угнетение реакций окислительного фосфорилирования и усиление использования гликолитического пути синтеза АТФ, что приводит к увеличению содержания НАДН и, соответственно, к увеличению вклада НАД(Ф)Н во флуоресценцию, что снижает значение редокс-соотношения. Именно снижение этого соотношения было обнаружено в тканях печени пациентов с синдромом МЖ [285,286,300].

В дополнение к флуорофорам, рассмотренным ранее, были выявлены статистически значимые различия во вкладе флуоресценции витамина А. Согласно литературным данным, в нормальных условиях печень запасает значительное количество витамина А, что, помимо прочих факторов, ранее рассматривалось исследователями как дополнительный фактор, отрицательно влияющий на возможность обнаружения флуоресценции НАД(Ф)Н [301,302]. Однако, поскольку печень является местом хранения витамина А в организме человека, нарушение нормального функционирования печени, в том числе из-за МЖ, также влияет на эту функцию, что, возможно, отразилось на полученных данных ФС.

В литературе есть сведения о накоплении витамина А в гепатоцитах при снижении его уровня в сыворотке крови при билиарном циррозе и неалкогольной жировой болезни печени, что может указывать на изменения в метаболизме ретинола и его распределении из печени, а не на общий дефицит в организме Развитие [303,304]. билиарного цирроза может явиться осложнением [305]. Известны непроходимости желчных протоков также результаты эксперимента по перевязке желчных протоков у крыс, при которых было выявлено перераспределение витамина А в печени и его накопление, при этом уровень ретинола в сыворотке крови снижался [254]. Также было отмечено, что изменение содержания витамина А влияет на гомеостаз желчных солей и кислот, который

также обычно регулируется витамином А. Возможно, что повышенное накопление витамина А является механизмом предотвращения чрезмерного повреждения печени при холестазе. Стоит также отметить, что нарушение оттока желчи из печени ограничивает уровень желчных кислот в кишечнике, что затрудняет эффективное усвоение витамина А [254].

Ключевую роль в метаболизме витамина А играют находящиеся в состоянии покоя звездчатые клетки печени, которые хранят большую часть витамина А в организме в виде ретиниловых эфиров [306]. Поэтому, когда уровень ретинола в сыворотке снижается, остается неясным, указывает ли это на общий дефицит витамина А или на патологические изменения его метаболизма в печени [304]. Известно, что при повреждении печени звездчатые клетки активируются и трансдифференцируются в миофибробласты, продуцирующие белки внеклеточного матрикса (в том числе фибриллярных белков коллагена и эластина), что приводит к развитию фиброза [304]. Исследования, проведенные методом флуоресцентной микроскопии, показывают, что пространственное распределение звездчатых клеток пересекается с участками фиброза, что приводит к разрушению паренхимы и снижению выделительной функции печени [307]. Известно, что одним из факторов активации также является аэробный гликолиз [308]. То, что билиарная обструкция вызывает холестатическое повреждение печени, включая фиброз печени, отмечалось неоднократно [305,309–312].

При обработке полученных данных также наблюдалось увеличение вклада флуоресценции фибриллярных белков в общий сигнал флуоресценции в группе пациентов с МЖ. Таким образом, повышение вклада флуоресценции витамина А может быть косвенным признаком снижения выделительной функции ткани печени [307], наряду с накоплением фибриллярных белков как предиктора развития фиброза.

3.3 Анализ результатов исследований методами флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии пациентов с положительной и отрицательной динамикой состояния после билиарной декомпрессии

На втором этапе с целью разработки диагностического критерия для дифференциального анализа функционального состояния печени требовалось провести разделение группы всех пациентов с МЖ, принявших участие в исследовании, на две группы в зависимости от исхода первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей.

На основании данных лабораторных (показатели биохимического анализа крови) и инструментальных методов исследований, наблюдений в ходе лечения и заключения лечащего врача, пациенты были ретроспективно разделены на группы в зависимости от динамики их состояния после процедуры:

- положительная если наблюдалось общее улучшение состояния,
 значительное снижение уровня билирубина и печеночных ферментов в крови;
- отрицательная если наблюдалось ухудшение состояния вплоть до необходимости проведения интенсивной терапии, незначительное снижение, его отсутствие или повышение уровня билирубина и печеночных ферментов, мочевины и креатинина.

Значения показателей для полученных группы приведены в таблице 3.3 в виде: медиана [25-й и 75-й процентили]. Статистически значимые различия показателей внутри группы между моментом оптического измерения и на 10-е сутки после измерения: * при p < 0.05; ** при p < 0.01; *** при p < 0.001. Нормальные значения выбранных биохимических показателей:

- билирубин общий / прямой: 0..17 / 0..3,4 мкмоль/л;
- $\mathbb{H}\Phi$: 80..270 ед/л;
- АЛТ: 10..38 ед/л;
- ACT: 10..40 ед/л;
- креатинин: 53..115 мкмоль/л;
- мочевина: 2,5..7,5 ммоль/л;

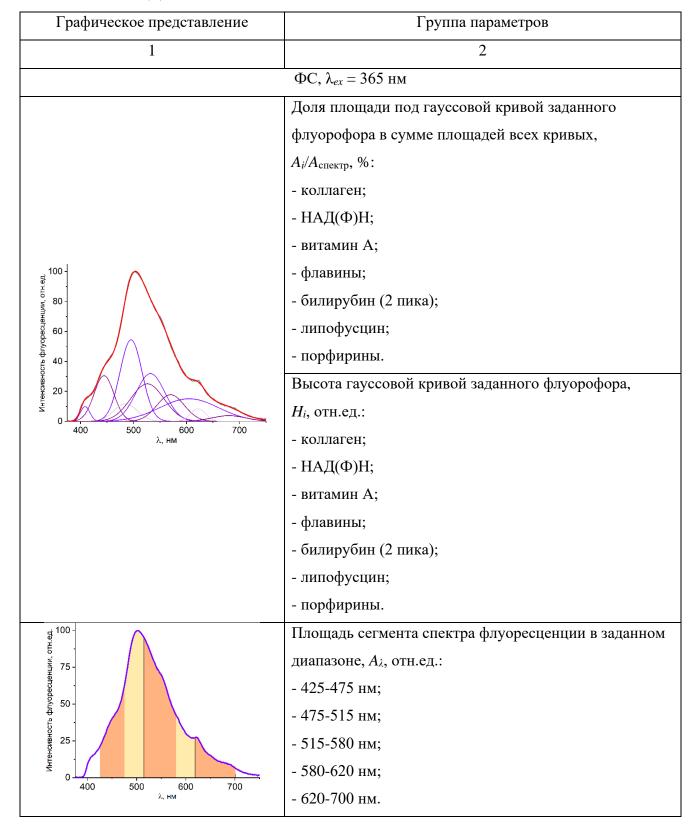
– общий белок: 65..85 г/л.

Таблица 3.3 – Параметры исследуемых групп

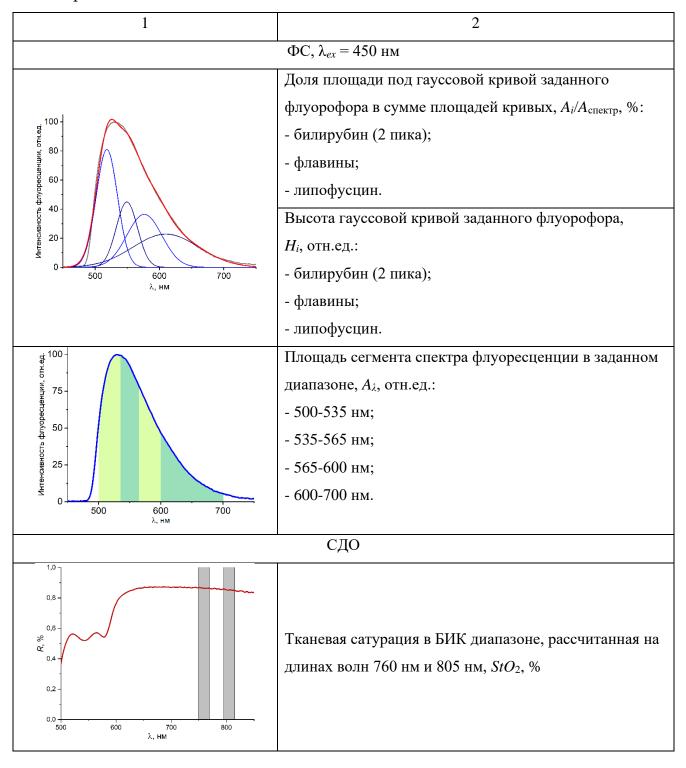
Показатели		Положительная динамика $(n=24)$		ная динамика = 16)
Показатели	На момент измерения	На 10-е сутки	На момент измерения	На 10-е сутки
Билирубин общий / прямой, мкмоль/л	227 [160; 365] / 120 [76;137]	*** 77 [56; 94] / *** 34 [16; 39]	253 [197; 410] / 110 [88; 202]	** 122 [74; 175] / ** 50 [24; 62]
ЩФ, ед/л	454 [257; 513	*** 218 [165; 255]	559 [368; 661]	* 289 [244; 440]
АЛТ, ед/л	232 [90; 354]	*** 60 [46; 94]	335 [184; 366]	** 150 [98; 191]
АСТ, ед/л	126 [105; 233]	*** 53 [31; 91]	190 [127; 227]	*** 102 [72; 122]
Креатинин, мкмоль/л	94 [87; 118]	** 79 [75; 87]	94 [86; 97]	90 [81; 107]
Мочевина, ммоль/л	5,5 [4,8; 8,7]	* 4,7 [3,9; 5,5]	6,5 [5,1; 9]	5,6 [4,0; 8,0]
Общий белок, г/л	68 [66; 74]	71 [66; 75]	69 [65; 73]	70 [64; 71]

Анализируемые параметры, рассчитанные из данных спектроскопических методов, включали в себя: высоты и площади гауссовых кривых выбранных флуорофоров, площади под кривой спектра флуоресценции в нескольких диапазонах (для метода ФС), тканевая сатурация (для метода СДО). Список анализируемых параметров приведен в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Анализируемые параметры, полученные на основе данных методов ФС и СДО



Продолжение таблицы 3.4



На рисунке 3.6 представлены результаты сравнения рассчитанных значений тканевой сатурации между группами. В группе пациентов с положительной динамикой послеоперационного состояния наблюдался больший разброс значений и меньшее среднее значение тканевой сатурации, но при этом среднее и медианное значения сатурации были выше в группе пациентов с отрицательной динамикой.

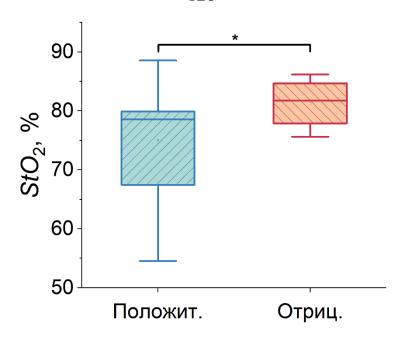


Рисунок 3.6 — Сравнение тканевой сатурации между группами пациентов с синдромом МЖ с положительной и отрицательной динамикой состояния после билиарной декомпрессии. Статистически значимые различия для *p < 0.05

На рисунке 3.7 приведены результаты сравнения рассчитанных значений вкладов флуорофоров В общий спектр флуоресценции параметров возбуждении на длине волны 365 нм для двух анализируемых групп пациентов. Изменения параметрах, отражающих вклад отдельных флуорофоров, наблюдались в основном для билирубина. Для липофусцина не было отмечено статистически значимых различий, тем не менее данные кривые вносили значительный вклад в спектры флуоресценции, а также наблюдалось повышение медианного значения в группе пациентов с негативной динамикой. Различия, аналогичные тем, что наблюдались при сравнении с данными пациентов без синдрома МЖ, также отмечались для НАД(Ф)Н и флавинов. Повышение тканевой сатурации в группе пациентов с отрицательной динамикой послеоперационного периода вместе с повышением вклада НАД(Ф)Н в спектры флуоресценции как в данной выборке, так и при сравнении с пациентами без синдрома МЖ может указывать на более выраженное проявление тканевой (или гистотоксической) гипоксии.

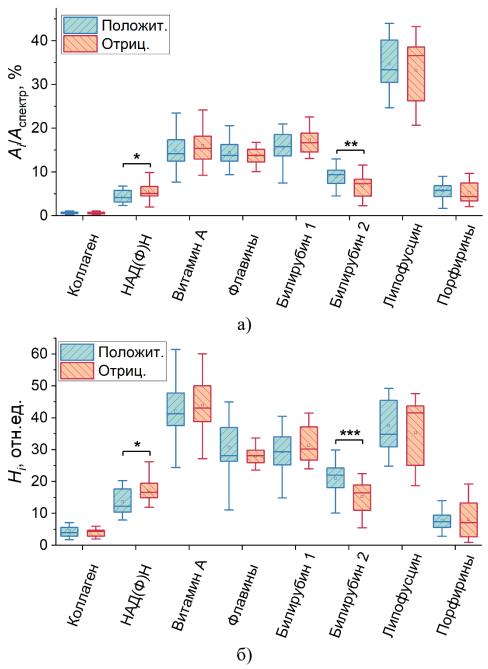


Рисунок 3.7 — Сравнение между группами пациентов параметров процента площади (а) и высоты гауссовых кривых флуоресценции (б) основных флуорофоров тканей печени при возбуждении на длине волны 365 нм. Статистически значимые различия для: *p < 0.05, ***p < 0.001

Данное состояние отличается от других видов гипоксии тем, что возникает из-за нарушения способности клеток к поглощению кислорода, приносимого кровью в нормальном количестве [313]. При тканевой гипоксии как вследствие токсических воздействий, так и влияния присутствия разнообразных

патологических процессов отмечается ряд нарушений к процессах клеточного дыхания - снижение активности цитохромоксидазы, нарушения процессов окислительного фосфорилирования (при этом в том числе начинает усиливаться анаэробный гликолиз и повышается содержание НАДН) и антиоксидантной защиты [314]. При билиарной обструкции затрудненный отток желчи приводит к механическим и токсическим повреждениям гепатоцитов, что сказывается на их способности к утилизации кислорода [290,291]. При этом повышение сатурации смешанной крови в случае тканевой гипоксии можно объяснить тем, что из-за недостаточного потребления кислорода гепатоцитами его парциальное давление в венозной крови снижается в меньшей степени, чем при нормальном газообмене в тканях [314]. Поскольку в печени из-за двойного кровоснабжения, обусловленного функцией детоксикации крови, поступающей от друих внутренних органов, преобладает именно венозная кровь, данное явление могло проявиться более заметно, тем самым повышая перспективность тканевой сатурации диагностического параметра.

На рисунке 3.8 аналогично приведены результаты сравнения между группами пациентов рассчитанных значений параметров вкладов флуорофоров в общий спектр флуоресценции печени при возбуждении на длине волны 450 нм. Как и для спектров при возбуждении на длине волны 365 нм были отмечены статистически значимые различия для билирубина, преимущественно для более коротковолнового пика. Также, в отличие от спектров на рисунке 3.8, несмотря на значительный вклад по площади, наблюдалось статистически значимое снижение вклада липофусцина, которое, тем не менее, может быть связано со значительным повышением вклада билирубина, флуоресценция которого более выражена для зондирующего излучения 450 нм.

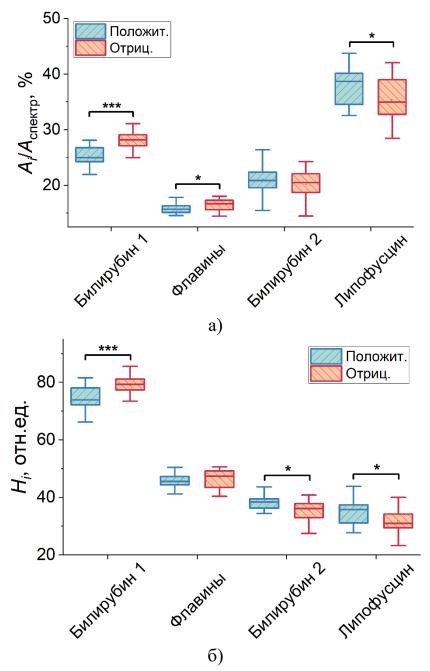


Рисунок 3.8 — Сравнение между группами пациентов параметров процента площади (а) и высоты гауссовых кривых флуоресценции (б) основных флуорофоров тканей печени при возбуждении на длине волны 450 нм. Статистически значимые различия для: *p < 0.05, ***p < 0.001

На рисунке 3.9 приведены сравнения площадей под кривой нормированного спектра флуоресценции в выбранных диапазонах.

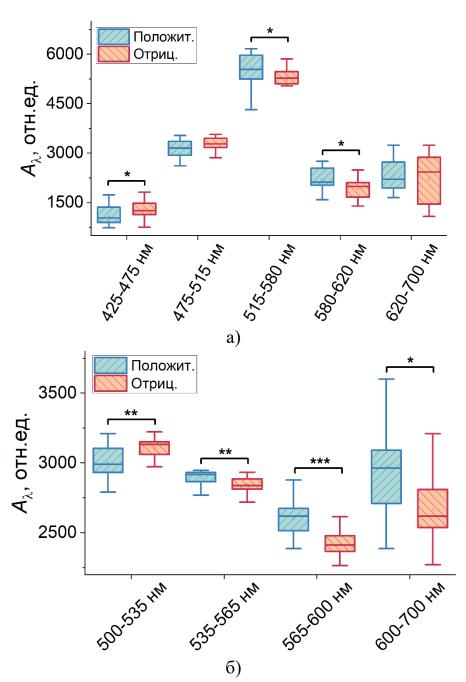


Рисунок 3.9 — Сравнение между группами пациентов параметров площадей под кривыми спектра флуоресценции при возбуждении на длине волны 365 нм (а) и 450 нм (б). Статистически значимые различия для: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Данные диапазоны были выбраны дополнительно по результатам исследования, т.к. было замечено, что несмотря на то, что ряд кривых флуорофоров не проявили статистически значимых различий в своих вкладах как при сравнении с группой без МЖ, так и среди пациентов, тем не менее их вклад значителен и

влияет на форму спектров в определенных диапазонах, что было подтверждено далее, особенно для диапазонов, связанных с флуоресценцией билирубина, липофусцина, порфиринов, а также НАД(Ф)Н и флавинов, непосредственно участвующих в биохимических реакциях клеточного метаболизма [315*].

Таким образом, при исследовании двух групп пациентов с синдромом МЖ различной этиологии и степени тяжести в качестве пространства признаков для разработки метода дифференциального анализа функционального состояния печени были выделены группы параметров, показавшие статистически значимые различия:

- для спектров диффузного отражения: рассчитываемая по значениям R
 тканевая сатурация;
- для спектров флуоресценции при возбуждении на длине волны 365 нм: вклады гауссовых кривых, отражающих флуоресценцию НАД(Ф)Н, билирубина; площади под кривыми спектров в диапазонах 425-475 нм, 515-580 нм и 580-620 нм;
- для спектров флуоресценции при возбуждении на длине волны 450 нм: вклады гауссовых кривых, отражающих флуоресценцию билирубина, флавинов, липофусцина; площади под кривыми спектров в диапазонах 500-535 нм, 535-565 нм, 565-600 нм и 600-700 нм.

3.4 Выводы по главе 3

- 1) Проведены экспериментальные исследования целью оценки возможностей разработанного сформулированным применения ПО **MTT** специализированным устройства флуоресцентной диффузно-И отражательной спектроскопии c волоконно-оптическим зондом ДЛЯ дифференциального анализа функционального состояния печени при синдроме МЖ.
- 2) Предложен протокол проведения исследований у пациентов с диагностированной МЖ, предполагающий последовательное измерение спектров диффузного отражения и спектров флуоресценции при возбуждении светом на

длинах волн 365 нм и 450 нм и дальнейший анализ с выделением вкладов основных тканевых флуорофоров в спектры флуоресценции паренхимы, расчет тканевой сатурации.

- 3) Согласно разработанному протоколу проведены исследования во время первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей под ультразвуковым и рентгенологическим контролем.
- 4) Проведено сравнение результатов с данными, полученными для группы пациентов без МЖ. Выявлены значимые различия вкладов флуорофоров НАД(Ф)Н, флавинов, билирубина, характеризующие дисфункцию гепатоцитов. Также отмечалось увеличение флуоресценции витамина А, что может указывать на нарушение его метаболизма и являться маркером для выявления нарушений функционального состояния печени. Также отмечен значительный вклад флуоресценции липофусцина и порфиринов в зарегистрированные спектры.
- 5) Проведено сравнение параметров, выбранных на основе проведения предыдущего этапа и рассчитанных на основе данных методов ФС и СДО, между двумя ретроспективно выбранными группами пациентов с МЖ, исходя из результатов клинической диагностики, наблюдений и мнения лечащего врача о наблюдаемой положительной или отрицательной динамике послеоперационного периода билиарной декомпрессии. Параметры, показавшие статистически значимые различия между группами, выбраны в качестве пространства признаков для дальнейшей разработки модели классификации метода дифференциального анализа функционального состояния печени.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО АНАЛИЗА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХИ

4.1 Построение модели классификации с применением линейного дискриминантного анализа

С целью построения модели классификации, позволяющей разделить исследуемых пациентов с синдромом МЖ на два класса по положительной или отрицательной динамике состояния после проведенной билиарной декомпрессии, было проведено моделирование с целью определения дискриминантной функции, которая позволила бы максимально разделить рассматриваемые группы с минимальной вероятностью ошибки. Основным требованием было, что уровень ошибки 1-ого рода, установленный ранее на основе экспертного анализа с привлечением ведущих врачей-специалистов в данной области, должен составить менее 0,21.

Для построения модели классификации и выявления признаков, наилучшим образом разделяющих объекты по предполагаемой положительной или отрицательной динамике состояния, был применён распространенный подход, основанный на метода ЛДА [316–318]. Результатом ЛДА является дискриминантная функция, вид которой определяется формулой:

$$f(x) = \sum_{1}^{n} a_i x_i + c,$$
 (4.1)

где, $X = (x_1, ..., x_n)$ – вектор значений дискриминантных переменных;

 $a = (a_1, ..., a_n)$ — вектор коэффициентов дискриминантной функции;

n – количество рассматриваемых переменных;

c — свободный член (константа).

Исходные матрицы переменных для 1-й и 2-й групп имеют вид:

$$X_{1} = \begin{pmatrix} x_{1,1} & x_{2,1} \\ x_{1,2} & x_{2,2} \\ \vdots & \vdots \\ x_{1,p_{1}} & x_{2,p_{1}} \end{pmatrix}, \tag{4.2}$$

$$X_{1} = \begin{pmatrix} x_{1,1} & x_{2,1} \\ x_{1,2} & x_{2,2} \\ \vdots & \vdots \\ x_{1,p_{1}} & x_{2,p_{1}} \end{pmatrix}, \tag{4.2}$$

$$X_{2} = \begin{pmatrix} x_{1,1} & x_{2,1} \\ x_{1,2} & x_{2,2} \\ \vdots & \vdots \\ x_{1,p_{2}} & x_{2,p_{2}} \end{pmatrix}, \tag{4.3}$$

где p_1 , p_2 – количество объектов в 1-й и 2-й группах: $p_1 = 24$, $p_2 = 16$.

В качестве $x_1...x_n$ в таблице были рассмотрены полученные методами ФС и СДО несколько сочетаний параметров, представленных в результатах раздела 3.3, а именно:

- площади под гауссовыми кривыми, отражающими вклад флуоресценции билирубина и липофусцина ($A_{\rm билирубин~2}^{365~{\rm нм}},\,A_{\rm билирубин~1}^{450~{\rm нм}},\,A_{\rm липофусцин}^{450~{\rm нм}}$) для обеих длин волн возбуждения флуоресценции 365 нм и 450 нм;
- высоты гауссовых кривых кривых, отражающих вклад флуоресценции билирубина и липофусцина ($H_{\text{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}}, H_{\text{липофусцин}}^{450 \text{ нм}}$);
- площади под кривой спектра флуоресценции в диапазоне 565-600 нм $(A_{565-600 \text{ нм}}^{450 \text{ нм}})$ для источника излучения 450 нм;
 - тканевая сатурации (StO_2).

Выбранные сочетания параметров удовлетворяют принципам статистической независимости и значимости различий значений в исследуемых группах, которые были подтверждены в главе 3 на этапе обоснования принципа получения диагностической информации из данных методов ФС и СДО.

В качестве X_1 выступают параметры, зарегистрированные методом ΦC на длине волны возбуждения 365 нм, а также тканевая сатурация, в качестве X_2 – параметры, зарегистрированные методом ФС на длине волны возбуждения 450 нм. Проверка гипотезы о законе распределения многомерной величины с применением непараметрического критерия Колмогорова-Смирнова подтвердила соответствие случайного значения каждой из дискриминантных переменных внутри рассматриваемых групп нормальному закону распределения.

Коэффициенты дискриминантной функции $a_1...a_n$ вычисляются по формуле:

$$A = S_*^{-1} \left(\overline{X_2} - \overline{X_1} \right), \tag{4.4}$$

где, $\overline{X_1}$ и $\overline{X_2}$ — векторы средних значений дискриминантных переменных в 1-й и 2-й группах;

 S_* — совместная ковариационная матрица;

 S_*^{-1} — матрица, обратная совместной ковариационной матрице.

Переменные в группах X_1 и X_2 описываются бинормальным распределением для уровня значимости $\alpha = 0.05$ с параметрами вектора средних значений дискриминантных переменных $\overline{X_1}$ и $\overline{X_2}$, и параметрами рассеяния: СКО σ_I и σ_2 , коэффициент корреляции Пирсона ρ . Для бинормального распределения матрица ковариаций вычисляется по формуле (4.5) [319]:

$$S = \begin{pmatrix} \sigma_1^2 & \rho \sigma_1 \sigma_2 \\ \rho \sigma_1 \sigma_2 & \sigma_2^2 \end{pmatrix}. \tag{4.5}$$

Совместная ковариационная матрица S_* вычисляется как сумма ковариационных матриц для 1-й и 2-й групп. Свободный член, определяющий границу, которая разделяет рассматриваемые группы, рассчитывается по формуле:

$$c = -A\frac{1}{2}(\overline{X_1} + \overline{X_2}). \tag{4.6}$$

Результаты расчета вектора значений дискриминантных переменных $\overline{X_1}$ и $\overline{X_2}$ и параметров рассеяния σ_1 , σ_2 и ρ для выбранных комбинаций диагностических параметров приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 — Векторы средних значений дискриминантных переменных $\overline{X_1}$ и $\overline{X_2}$, параметры рассеяния σ_I , σ_2 и ρ для исследуемых групп

	Группа							
Дискриминантные	Пациен	ты с по	ложитель	ной	Пацие	нты с от	рицательн	ой
переменные		динам	икой			динамі	икой	
	$\overline{X_1}$	σ_{l}	σ_2	ρ	$\overline{X_2}$	σ_{l}	σ_2	ρ
А ^{365 нм} сіўна 19 да 1	(9,03;	2.05	1.50	0.01	(6,83;	2.62	1.60	0.27
$A_{ m билирубин\ 1}^{ m 450\ нм}$	25,33)	2,05	1,59	0,01	28,07)	2,62	1,69	0,27
$A_{ m билирубин 2}^{ m 365 \ нм}$	(9,03;	2.05	115 40	-0,12	(6,83;	2.62	116 22	0.24
$A_{565-600\ m HM}^{450\ m HM}$	2602,45)	2,05	115,48	-0,12	2421,36)	2,62	116,22	-0,24
H ^{365 нм} билирубин 2;	(21,00;	4.74	1.50	0.12	(15,23;	4,95	1,69	0,09
$A_{ m билирубин\ 1}^{ m 450\ нм}$	25,33)	4,74	4,74 1,59	-0,13	28,07)	4,33	1,09	0,09
H ^{365 нм} ;	(21,00;	4.74	1.06	0.45	(15,23;	4.05	2.64	0.52
$A_{ m { m { m { m { m { m { m { m { m { m $	38,27)	4,74	4,06	-0,45	35,24)	4,95	3,64	-0,52
StO_2 ;	(75,05;	7.70	1.50	0.12	(81,24;	2.69	1.60	0.16
А ^{450 нм} билирубин 1	25,33)	7,78	1,59	-0,13	28,07)	3,68	1,69	0,16
StO_2 ;	(75,05;	7.70	5 10	0.49	(81,24;	2.69	1 21	0.05
H ⁴⁵⁰ нм липофусцин	35,53)	7,78	5,48	0,48	31,55)	3,68	4,34	0,05
StO_2 ;	(75,05;	7.70	115 40	0.44	(81,24;	2.69	116 22	0.00
A ⁴⁵⁰ нм 565-600 нм	2602,45)	7,78	115,48	0,44	2602,45)	3,68	116,22	-0,09

Рассчитанные матрицы ковариаций для групп пациентов с синдромом МЖ с положительной и отрицательной динамикой состояния после билиарной декомпрессии и матрица, обратная совместной ковариационной матрице, полученные для выбранных комбинаций дискриминантных переменных, представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Матрицы ковариаций для групп пациентов с положительной и отрицательной динамикой состояния и матрица, обратная совместной ковариационной матрице

Дискриминантные переменные	S_1	S_2	S^{*-1}	
A365 нм Абилирубин 2; A450 нм Абилирубин 1	$\begin{pmatrix} 4,21 & 0,04 \\ 0,04 & 2,52 \end{pmatrix}$	(6,85 1,21) (1,21 2,84)	$\begin{pmatrix} 0.09 & -0.02 \\ -0.02 & 0.19 \end{pmatrix}$	
$A_{ m билирубин}^{365{ m нм}}_2; \ A_{ m 565-600{ m нм}}^{450{ m нм}}$	$\begin{pmatrix} 4,21 & -27,62 \\ -27,62 & 13334,79 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 6,85 & -73,31 \\ -73,31 & 13506,06 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0.09 & 0.0004 \\ 0.0004 & 0.00004 \end{pmatrix}$	
H ^{365 нм} Н _{билирубин 2} ; А ^{450 нм} Килирубин 1	$\begin{pmatrix} 22,49 & -0,99 \\ -0,99 & 2,52 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 24,51 & 0,74 \\ 0,74 & 2,84 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0.02 & 0.001 \\ 0.001 & 0.19 \end{pmatrix}$	
H ^{365 нм} Н _{билирубин 2} ; А ^{450 нм} А _{липофусцин}	$\begin{pmatrix} 22,49 & -8,57 \\ -8,57 & 16,49 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 24,51 & -9,40 \\ -9,40 & 13,26 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0.03 & 0.02 \\ 0.02 & 0.04 \end{pmatrix}$	
StO ₂ ; А ^{450 нм} Коилирубин 1	$\begin{pmatrix} 60,55 & -1,59 \\ -1,59 & 2,52 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 13,57 & 0,96 \\ 0,96 & 2,84 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0,01351 & 0,00159 \\ 0,00159 & 0,18675 \end{pmatrix}$	
StO ₂ ; Н ^{450 нм} Илипофусцин	(60,55 20,68) (20,68 30,03)	$\begin{pmatrix} 13,57 & 0,78 \\ 0,78 & 18,86 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0.02 & -0.01 \\ -0.01 & 0.02 \end{pmatrix}$	
StO ₂ ; А ^{450 нм} 565-600 нм	(60,55 398,99 398,99 13334,79)	(13,57 -38,37 -38,37 13506,06)	$\begin{pmatrix} 0.01 & -0.0002 \\ -0.0002 & 0.00004 \end{pmatrix}$	

В таблице 4.3 представлены результаты расчета вектора коэффициентов и свободного члена, а также общий вид дискриминантной функции, полученные для всех комбинаций дискриминантных переменных для групп пациентов с синдромом МЖ с положительной и отрицательной динамикой состояния после билиарной декомпрессии.

Таблица 4.3 — Вектор коэффициентов A, свободный член c и общий вид дискриминантной функции f

Дискриминантные переменные	A	С	Общий вид дискриминантной функции
$A_{ m билирубин 2}^{ m 365 \ нм}$, $A_{ m билирубин 1}^{ m 450 \ нм}$	(-0,53;1,13)	-26,56	$f\left(A_{ ext{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}}, A_{ ext{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}}\right) = -0,53 \cdot A_{ ext{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}} + 1,13 \cdot A_{ ext{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}} - 26,56$
$A_{ m билирубин}^{ m 365\ нм}$ 2; $A_{ m 565-600\ нm}^{ m 450\ hm}$	(-0,56; -0,02)	42,26	$f\left(A_{ m билирубин}^{365{ m hm}}{}_{2},A_{565-600{ m hm}}^{450{ m hm}} ight)=-0,56\cdot$ $A_{ m билирубин}^{365{ m hm}}{}_{2}-0,02\cdot A_{565-600{ m hm}}^{450{ m hm}}+42,26$
H _{билирубин 2} ; А ^{450 нм} Абилирубин 1	(-0,23; 1,00)	-23,29	$f\left(xH_{ ext{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}},A_{ ext{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}} ight)=-0,23 \cdot \ H_{ ext{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}}+\cdot A_{ ext{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}}-23,29$
$H_{ m билирубин 2}^{ m 365 HM}$; $A_{ m липофусцин}^{ m 450 HM}$	(-0,42; -0,43)	22,85	$fig(H_{ m билирубин\ 2}^{365\ { m hm}},A_{ m липофусцин}^{450\ { m hm}}ig)=-0,42\cdot \ H_{ m билирубин\ 2}^{365\ { m hm}}-0,43\cdot A_{ m липофусцин}^{450\ { m hm}}+22,85$
StO ₂ ; А ^{450 нм} Коилирубин 1	(0,18; 1,10)	-44,08	$f(StO_2, A_{\text{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}}) = 0,18 \cdot StO_2 +$ $1,1 \cdot A_{\text{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}} - 44,08$
StO ₂ ; Н ^{450 нм} _{липофусцин}	(0,21; -0,26)	-8,34	$f(StO_2, H_{ m липо фусцин}^{ m 450\ hm}) = 0,21 \cdot StO_2 - 0,26 \cdot H_{ m липо фусцин}^{ m 450\ hm} - 8,34$
StO ₂ ; А ^{450 нм} 565-600 нм	(0,22; -0,02)	27,22	$f(StO_2, H_{\text{липофусцин}}^{450 \text{ нм}}) = 0,22 \cdot StO_2 - $ $0,02 \cdot A_{565-600 \text{ нм}}^{450 \text{ нм}} + 27,22$

Таким образом, с применением ЛДА для набора дискриминантных переменных определён общий вид дискриминантных функций, на которых будет базироваться итоговая модель классификации.

4.2 Верификация, оценка чувствительности и специфичности полученных моделей классификации

Для проведения верификации полученных дискриминантных функций был применён метод скользящего экзамена (leave-one-out) [320]. При применении данного подхода исходная выборка из $m=p_1+p_2$ объектов разделялась на обучающую выборку L, состоящую из (m-1) объектов, и контрольную K из 1

объекта. С учётом изменившихся матриц ковариации и вектора средних значений дискриминантных переменных вычислялись значения вектора коэффициентов дискриминантной функции, свободного члена, формировалась модифицированная дискриминантная функция, с применением которой оценивалось, к какой из двух распределяемых групп принадлежит контрольный объект.

После верификации для каждой дискриминантной функции рассчитывались значения показателей чувствительности (Se) и специфичности (Sp) [321]:

$$Se = \frac{TP}{TP + FN'} \tag{4.7}$$

где TP — количество пациентов с отрицательной динамикой состояния после проведенной билиарной декомпрессии, у которых ожидалась отрицательная динамика (истинно положительные);

FN — количество пациентов с отрицательной динамикой состояния после проведенной билиарной декомпрессии, у которых ожидалась положительная динамика (ложноотрицательные).

$$Sp = \frac{TN}{TN + FP'} \tag{4.8}$$

где TN — количество пациентов с положительной динамикой состояния после проведенной билиарной декомпрессии, у которых ожидалась положительная динамика (истинно отрицательные):

FP — количество пациентов с положительной динамикой состояния после проведенной билиарной декомпрессии, у которых ожидалась отрицательная динамика (ложноположительные).

Также рассчитывался параметр точности — доля истинно установленных положительных и отрицательных случаев среди всех пациентов:

$$Acc = \frac{TP + TN}{TP + FN + TN + FP}. (4.9)$$

Также для каждой дискриминантной функции рассчитывались значения ошибок 1-ого (FNR) и 2-ого (FPR) рода для сравнения с целевыми показателями, полученными по результатам экспертной оценки:

$$FNR = \frac{FN}{TP + FN'} \tag{4.10}$$

$$FPR = \frac{FP}{TN + FP}. (4.11)$$

Значения чувствительности, специфичности, точности, площади под ROC-кривой (AUC) и ошибок для полученных дискриминантных функций представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 — Значения чувствительности, специфичности, точности, AUC и ошибок 1-ого и 2-ого рода для полученных дискриминантных функций

Дискриминантные переменные	Se	Sp	Acc	AUC	FNR	FPR
1	2	3	4	5	6	7
$A_{ m билирубин 2}^{ m 365 HM}$, $A_{ m билирубин 1}^{ m 450 HM}$	0,88	0,90	0,89	0,91	0,12	0,10
$A_{ m билирубин\ 2}^{ m 365\ нм}; \ A_{ m 565-600\ нм}^{ m 450\ нm}$	0,75	0,90	0,85	0,90	0,25	0,10
H _{билирубин 2} ; А ^{450 нм} Абилирубин 1	0,88	0,90	0,89	0,90	0,12	0,10
$H_{ m 6илирубин~2}^{ m 365~hm}$; $A_{ m липофусцин}^{ m 450~hm}$	0,88	0,89	0,89	0,89	0,12	0,11
StO ₂ ; А ^{450 нм} А _{билирубин 1}	0,75	0,91	0,85	0,93	0,25	0,09

Продолжение таблицы 4.4	4
-------------------------	---

1	2	3	4	5	6	7
StO ₂ ; Н ^{450 нм} _{липофусцин}	0,80	0,94	0,89	0,92	0,20	0,06
StO ₂ ; А ^{450 нм} 565-600 нм	0,85	0,91	0,89	0,94	0,15	0,09

С точки зрения достижения наибольшей чувствительности и специфичности для всех используемых методов в качестве наиболее приемлемых выбраны дискриминантные функции с применением в качестве дискриминантных переменных значений площадей гауссовых кривых $A_{\rm билирубин\ 2}^{365\ {\rm hm}}$ и $A_{\rm билирубин\ 2}^{450\ {\rm hm}}$ тканевой сатурации StO_2 и площади $A_{565-600\ {\rm hm}}^{450\ {\rm hm}}$.

При этом ошибка 1-го рода (ложноотрицательный результат) в двух указанных моделях составляет 0,12 и 0,15, а 2-го рода (ложноположительный результат) — 0,1 и 0,09 соответственно, что меньше желаемого уровня ошибки 0,21, полученного по результатам экспертной оценки.

4.3 Синтез итоговых моделей классификации для дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи

На основании наиболее высоких значений показателей чувствительности и специфичности итоговые модели классификации на основе сочетаний параметров, полученных методами ФС и СДО, имеют следующий вид:

$$f_1$$
 ($A_{\text{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}}, A_{\text{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}}$) = $-0.53 \cdot A_{\text{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}}$ (4.12)
+1,13 · $A_{\text{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}} - 26.56$,

$$f_2(StO_2, A_{565-600 \text{ hm}}^{450 \text{ hm}}) = 0.22 \cdot StO_2 - 0.02 \cdot A_{565-600 \text{ hm}}^{450 \text{ hm}} + 27.22.$$
 (4.13)

На рисунке 4.1 представлены результаты ЛДА для двух пар параметров в виде графика рассеяния параметров, рассчитанных по экспериментальным данным методов ФС и СДО, с нанесением дискриминантных линий, которые делят экспериментальные точки на две группы [315*].

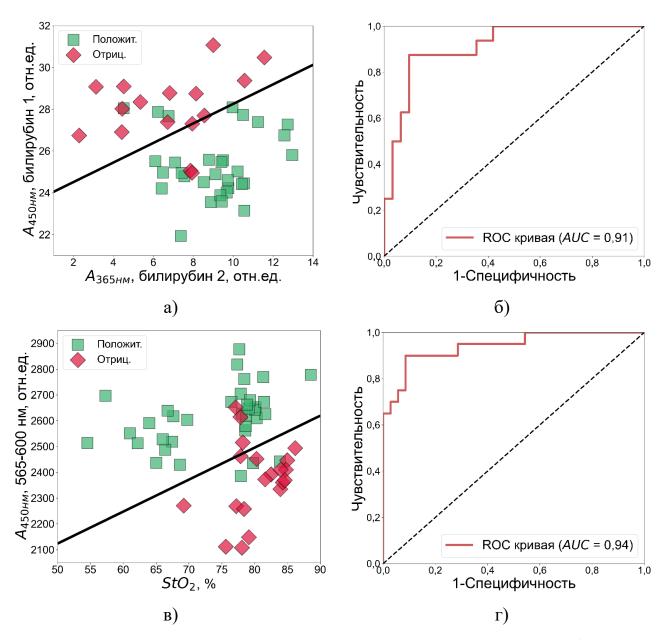


Рисунок 4.1 – Результаты ЛДА – диаграмма рассеяния значений выбранных параметров (а, в); ROC-кривая для оценки эффективности соответствующих моделей классификации (б, г)

Немаловажным фактором является и то, что во второй классификатор включен, рассчитанный методом СДО, параметр тканевой сатурации, интуитивно

понятный врачам. Также, несмотря на то, что модель классификации на основе метода ФС обеспечивает более низкий уровень ложноотрицательного результата, в ходе исследования наблюдалось, что регистрация данных каналом ФС с источником излучения 365 нм могла быть затруднена из-за повышенного кровенаполнения печени [233*,322*]. Непосредственным диагностическим критерием является модель классификации в виде дискриминантной функции, позволяющая классифицировать наличие или отсутствие отрицательной динамики состояния пациентов после билиарной декомпрессии.

Для полученных моделей классификации были построены матрицы ошибок (рисунок 4.2) и проведено сравнение классификации с помощью параметров, использованных для метода ЛДА, с результатами оценки по системе классификации тяжести МЖ по Э.И. Гальперину.



Рисунок 4.2 — Матрицы ошибок для диагностических параметров $A_{\text{билирубин 2}}^{365 \text{ hм}}$; $A_{\text{билирубин 1}}^{450 \text{ hм}}$ (а) и StO_2 ; $A_{565-600 \text{ нм}}^{450 \text{ нм}}$ (б) для классификации методом ЛДА; для классификации тяжести МЖ по Э.И. Гальперину (в)

В таблице 4.5 приведены параметры чувствительности, специфичности и точности двух разработанных методов классификации и классификации пациентов по системе Э.И. Гальперина.

Таблица 4.5 — Сравнение параметров точности для методов классификации прогнозирования послеоперационного состояния пациентов МЖ

Метод классификации	Se	Sp	Acc
ЛДА — $A_{ m билирубин}^{ m 365\ hm}$ $_2$; $A_{ m билирубин}^{ m 450\ hm}$ $_1$	0,88	0,90	0,89
ЛДА – StO_2 ; $A_{565-600~{ m HM}}^{450~{ m HM}}$	0,85	0,91	0,89
Классификация тяжести МЖ по Э.И. Гальперину	0,47	0,63	0,54

Таким образом, можно сделать вывод о том, что применение методов ФС и СДО позволяет синтезировать решающие правила для выявления пациентов с положительной и отрицательной динамикой лечения после проведенной билиарной декомпрессии с уровнем ошибки первого рода менее 0,2, что соответствует величине, полученной по результатам экспертной оценки, и превышает показатели точности в случае прогнозирования послеоперационного состояния пациентов по классификации тяжести МЖ по Э.И. Гальперину.

4.4 Метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи

На основе разработанного классификатора предложен метод дифференциального анализа функционального состояния печени у пациентов с синдромом МЖ различной этиологии и тяжести состояния (рисунок 4.3). Алгоритм базируется на применении методов ФС и СДО для выявления пациентов с ПН и прогнозирования отрицательной динамики течения заболевания после проведения первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей под ультразвуковым и рентгенологическим контролем [323*].

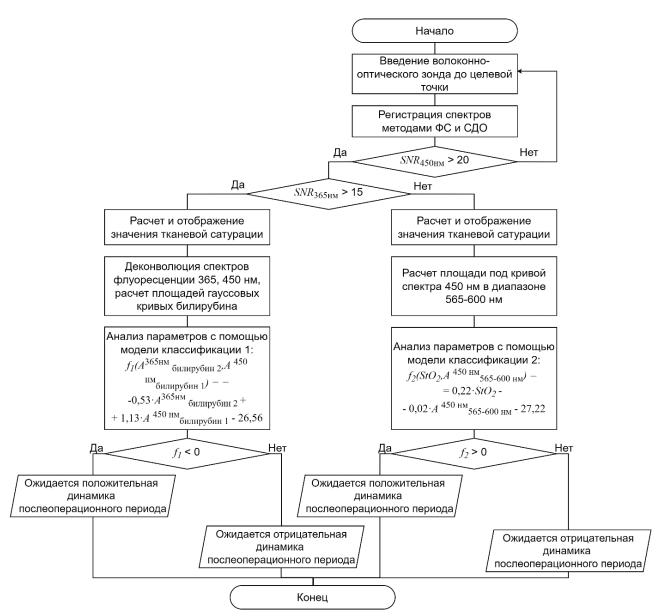


Рисунок 4.3 — Блок-схема метода дифференциального анализа функционального состояния печени с синдромом МЖ во время проведения первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей

Предлагаемый метод дифференциального анализа функционального состояния печени включается в себя следующую последовательность действий:

1) После подготовки пациента к процедуре первичной антеградной декомпрессии и формирования чрескожного доступа к желчевыводящим путям через паренхиму печени под ультразвуковым контролем врач-хирург вводит волоконно-оптический зонд в канюлю пункционной иглы, расположенной на

траектории проведения инструмента в паренхиме печени перед стенкой желчного протока.

- 2) С помощью методов ФС и СДО последовательно регистрируют спектры флуоресценции и диффузного отражения паренхимы печени, соответственно.
- 3) Т.к. в оба решающих правила входят параметры, рассчитываемые из спектров флуоресценции, возбужденной излучением на длине волны 450 нм, проверяется качество зарегистрированных данных канала Φ С для данных спектров. Проверка осуществляется путем расчета соотношения сигнал-шум на длине волны максимальной интенсивности флуоресценции для данного вида спектров (SNR_{450}). В случае $SNR_{450} < 20$ (значение было определено в разделе 3.1) врач-хирург перемещает волоконно-оптический зонд в другую возможную точку измерения и цикл измерения повторяется.
- 4) В случае $SNR_{450} > 20$ для выбора решающего правила далее проводится аналогичная проверка данных канала ФС для длины волны возбуждения 365 нм путем расчета соотношения сигнал-шум на длине волны максимальной интенсивности флуоресценции для данного вида спектров (SNR_{365}).
- 5) В случае $SNR_{365} > 15$ в зарегистрированных спектрах рассчитываются параметры (площади ПОД гауссовыми кривыми, отражающими вклад флуоресценции билирубина при возбуждении на длинах волн 365 нм и 450 нм), входящие в первую дискриминантную функцию $f_1(A_{\text{билирубин 2}}^{365 \text{ нм}}, A_{\text{билирубин 1}}^{450 \text{ нм}})$, проводится анализ с использованием первого решающего правила. В случае SNR₃₆₅ < 15 анализ данных и получение вывода продолжается с использованием второго классификатора $f_2(StO_2, A_{565-600 \text{ нм}}^{450 \text{ нм}})$, для которого рассчитываются другие параметры (тканевая сатурация, площадь под кривой спектра флуоресценции в диапазоне 565-600 нм при возбуждении на длине волны 450 нм). Оптимальное значение 15 было выбрано в разделе 3.1 и отличается от значения SNR_{450} исходя из их более низкой интенсивности, связанной с большим поглощением ближнего УФ излучения печенью по сравнению с излучением 450 нм.

- 6) В обоих случаях также проводится расчет тканевой сатурации, информация о которой выводится на экране ПК для врача.
- 7) По результатам расчета делаются выводы о предполагаемой динамике состояния пациента Данная дополнительная диагностическая информация передается врачу-хирургу.

4.5 Выводы по главе 4

- 1) Разработаны модели классификации, позволяющие выявлять пациентов с ПН и прогнозировать отрицательную динамику лечения после первичной антеградной декомпрессии, базирующиеся на методе ЛДА с улучшенными показателями чувствительности и специфичности (показатели чувствительности 0,88 и 0,85; показатели специфичности 0,90 и 0,91).
- 2) Сравнение разработанных моделей классификации с результатами классификации пациентов по используемой в клинической практике системе Э.И. Гальперина для оценки тяжести синдрома МЖ, а также с результатами экспертной оценки, подтверждает, что предлагаемые модели на основе данных флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии обеспечивают более высокие показатели точности.
- Предложен метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ различной этиологии и тяжести состояния для выявления пациентов с ПН и прогнозирования отрицательной динамики течения заболевания после проведения первичной антеградной декомпрессии желчевыводящих путей под ультразвуковым и рентгенологическим контролем, основанный на измерении спектров флуоресценции и диффузного отражения с анализом параметров флуоресценции и тканевой сатурации и отличающийся возможностью выявления пациентов с отрицательной динамикой с моделей классификации помощью предложенных cвероятностью ложноотрицательного результата менее 0,2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной диссертационной работе разработан метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ на основе флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии для прогнозирования отрицательной динамики состояния в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии.

В диссертационной работе получены следующие основные научные результаты:

- 1) Проведённый анализ состояния современных методик исследования, применяемых в клинической практике для диагностики функционального состояния печени при лечении синдрома МЖ, показал, что несмотря на широкий ряд лабораторных и инструментальных методов, а также прогностических шкал, моделей и систем, проблема поиска дополнительных критериев для дифференциального анализа функционального состояния печени, своевременного выявления и определения степени ПН с помощью простых подходов, дающих прямой объективный результат, остается актуальной.
- 2) Проведено обоснование специализированных МТТ к устройствам на флуоресцентной И диффузно-отражательной спектроскопии дифференциального анализа функционального состояния печени с учетом оптических свойств паренхимы печени, а именно: различных параметров воды и липидов; содержания крови, желчи, содержания И оптических флуорофоров. C разработанной характеристик эндогенных помощью экспериментальной установки проведены предварительные исследования для тестирования чувствительности канала ФС к метаболическим изменениям в биологической ткани.
- 3) Проведена регистрация оптических данных в клинических условиях с привлечением пациентов (40 человек) с диагностированным синдромом МЖ различной этиологии и тяжести состояния с помощью флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии во время билиарной декомпрессии для

выделения пространства диагностических признаков, использованных далее с целью разработки модели классификации функционального состояния печени в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии.

- 4) На основе теоретических исследований и анализа экспериментальных данных разработаны модели классификации для прогнозирования отрицательной динамики состояния пациентов с синдромом МЖ в послеоперационном периоде билиарной декомпрессии, включающие в себя параметры вкладов гауссовых кривых (высота, процент площади в общей площади спектра), рассчитываемые по спектрам флуоресценции для длин волн возбуждения 365 и 450 нм, либо по спектрам флуоресценции для длины волны возбуждения 450 нм и спектрам диффузного отражения (площадь под кривыми флуоресценции и тканевая сатурация), регистрируемым *in vivo*, и обеспечивающие прогнозирование отрицательной динамики с чувствительностью 0,88 и 0.85, специфичностью 0,90 и 0,91, площадью под ROC-кривой 0,91 и 0,94, для каждой из моделей соответственно.
- Разработан метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом МЖ, основанный на регистрации параметров флуоресценции и диффузного отражения in vivo с использованием флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии специальным волоконно-оптическим зондом и направленный на прогнозирование динамики течения послеоперационного периода билиарной декомпрессии с предложенной классификации помощью модели c вероятностью ложноотрицательного результата 0,12 и 0,15 в зависимости от модели, что соответствует результатам экспертной оценки.

Предложенный метод позволит врачам-хирургам повысить качество диагностики состояния пациентов в послеоперационном периоде и тем самым повысить эффективность оперативного лечения синдрома МЖ. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы как для решения дополнительных диагностических задач в рамках рассмотренной научной проблемы, так и при разработке методов оптической диагностики для новых задач

дифференциального анализа функционального состояния паренхимы печени при других фиброз патологиях (например, стеатоз, И др.). Перспективным представляется расширение диапазона регистрации спектров диффузного отражения для большего охвата БИК диапазона и добавления диагностических критериев, отражающих изменения в содержании липидов и воды. При увеличении объема массивов регистрируемых данных интерес представляет приложение более продвинутых подходов к анализу на основе машинного обучения и искусственного интеллекта, а также дальнейшее применение полученной выборки для построения систем поддержки принятия врачебных решений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза;

АСТ – аспартатаминотрансфераза;

 $AT\Phi$ – аденозинтрифосфат;

АЦП – аналого-цифровой преобразователь;

ДМСО – диметилсульфоксид;

БИК диапазон – ближний инфракрасный диапазон;

ИЦЗ – индоцианин зеленый;

КТ – компьютерная томография;

ЛДА – линейный дискриминантный анализ;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

МЖ – механическая желтуха;

МНО – международное нормализованное отношение;

МРТ – магнитно-резонансная томография;

МРХПГ – магнитно-резонансная холангиопанкреатография;

МТТ – медико-технические требования;

НАД – никотинамидадениндинуклеотид;

НАДН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид;

НАДФН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

НАД(Ф)Н – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид и никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

ПК – персональный компьютер;

ПН – печеночная недостаточность;

СДО – спектроскопия диффузного отражения;

СКО – среднеквадратическое отклонение;

УЗИ – ультразвуковое исследование;

УФ диапазон – ультрафиолетовый диапазон;

ФАД – флавинадениндинуклеотид;

 $\Phi A \Pi H_2$ – восстановленный флавинадениндинуклеотид;

ФС – флуоресцентная спектроскопия;

ЧЧХГ – чрескожная чреспеченочная холангиография;

ЩФ – щелочная фосфатаза;

ЭРХПГ – эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография;

AUC – площадь под ROC-кривой;

СССР – карбонилцианид м-хлорфенил-гидразон;

GLP – Принципы надлежащей лабораторной практики;

HBSS – раствор Хэнкса с кальцием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Гальперин, Э.И. Руководство по хирургии желчных путей / Э.И. Гальперин, П.С. Ветшев. М.: Издательский дом Видар-М, 2009. 568 с.
- 2. Натальский, А.А. Современные представления о печеночной недостаточности в хирургии / А.А. Натальский, С.В. Тарасенко, О.В. Зайцев, О.Д. Песков // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. Т. 22. № 94. С. 138-147.
- 3. Ломакин, И.А. Диагностика и лечебная тактика у больных с механической желтухой / И.А. Ломакин, Ю.В. Иванов, Д.В. Сазонов, Д.П. Лебедев // Клиническая практика. 2012. № 3. С. 42-50.
- 4. See, T.C. Acute biliary interventions / S. Eriksson, N. Jan, L. Gert, C. Sturesson // Clinical Radiology. 2020. Vol. 75. № 5. P. 398.e9-398.e18.
- 5. Ревишвили, А.Ш. Хирургическая помощь в Российской Федерации. Информационно-аналитический сборник за 2023 год / А.Ш. Ревишвили, В.Е. Оловянный, Б.Ш. Гогия, Б.Н. Гурмиков, П.В. Марков, Д.В. Ручкин, А.В. Кузнецов, Н.В. Шелина. М.: ФГБУ «НМИЦ хирургии имени А.В. Вишневского» Минздрава России, 2024. 192 с.
- 6. Moole, H. Efficacy of preoperative biliary drainage in malignant obstructive jaundice: a meta-analysis and systematic review / H. Moole, M. Bechtold, S.R. Puli // World Journal of Surgical Oncology.— 2016. Vol. 14. P. 1-11.
- 7. Shaib, Y. Preoperative biliary drainage for malignant biliary obstruction: results from a national database / Y. Shaib, M.A. Rahal, M.O. Rammal, A. Mailhac, H. Tamim // Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences. − 2017. − Vol. 24. − № 11. − P. 637-642.
- 8. Гальперин, Э.И. Механическая желтуха: состояние «мнимой стабильности», последствия «второго удара», принципы лечения / Э.И. Гальперин // Анналы хирургической гепатологии. 2011. Т. 16. № 3. С. 16-25.

- 9. Барванян, Г.М. Выбор способа хирургической декомпрессии желчных путей при нерезектабельных опухолях билиопанкреатодуоденальной зоны / Г.М. Барванян // Анналы хирургической гепатологии. 2017. Т. 21. № 4. С. 55-62.
- 10. Kumar, S. Factors predicting recovery of liver function after percutaneous drainage in malignant biliary obstruction: the role of hospital-acquired biliary sepsis / S. Kumar, S. Masood, U. Srivastava, S.M. Madhavan, S. Chauhan, A. Pandey // Clinical and Experimental Hepatology. -2020. -Vol. 6. -No. 4. -P. 295-303.
- 11. Tuchin, V.V. Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics, Third Edition / V.V. Tuchin. SPIE Press, 2015. 988 p.
- 12. Jacques, S.L. Tutorial on diffuse light transport / S.L. Jacques, B.W. Pogue // Journal of Biomedical Optics. 2008. Vol. 13. № 4. P. 41302.
- 13. Mayevsky, A. Tissue spectroscope: a novel in vivo approach to real time monitoring of tissue vitality / A. Mayevsky, T. Manor, E. Pevzner, A. Deutsch, R. Etziony, N. Dekel, A. Jaronkin // Journal of Biomedical Optics. − 2004. − Vol. 9. − № 5. − P. 1028-1045.
- 14. Mayevsky, A. Mitochondrial function and tissue vitality: bench-to-bedside real-time optical monitoring system / A. Mayevsky, R. Walden, E. Pewzner, A. Deutsch, E. Heldenberg, J. Lavee, S. Tager, E. Kachel, E. Raanani, S. Preisman // Journal of Biomedical Optics. $-2011. \text{Vol}.\ 16. \text{N} \underline{0}\ 6. \text{P}.\ 067004.$
- 15. Koenig, K. Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis / K. Koenig, H. Schneckenburger // Journal of fluorescence. 1994. Vol. 4. P. 17-40.
- 16. Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd edition / J.R. Lakowicz. Springer Science & Business Media, 2013. 954 p.
- 17. Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy in vivo / N. Ramanujam // Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation. Wiley Online Library, 2006.
- 18. Croce, A.C. Autofluorescence properties of rat liver under hypermetabolic conditions / A.C. Croce, U. De Simone, M. Vairetti, A. Ferrigno, G. Bottiroli // Photochemical & Photobiological Sciences. − 2007. − Vol. 6. − № 11. − P. 1202-1209.

- 19. Croce, A.C. Autofluorescence of liver tissue and bile: organ functionality monitoring during ischemia and reoxygenation / A.C. Croce, A. Ferrigno, G. Santin, V.M. Piccolini, G. Bottiroli, M. Vairetti // Lasers in Surgery and Medicine. -2014. Vol. 46. No 5. P. 412-421.
- 20. Palladini, G. MCD Diet Rat Model Induces Alterations in Zinc and Iron during NAFLD Progression from Steatosis to Steatohepatitis / G. Palladini, L.G. Di Pasqua, M. Cagna, A.C. Croce, S. Perlini, B. Mannucci, A. Profumo, A. Ferrigno, M. Vairetti // International Journal of Molecular Sciences. − 2022. − Vol. 23. − № 12. − P. 6817.
- 21. Croce, A.C. Bilirubin: an autofluorescence bile biomarker for liver functionality monitoring / A.C. Croce, A. Ferrigno, G. Santin, M. Vairetti, G. Bottiroli // Journal of Biophotonics. -2014. Vol. 7. № 10. P. 810-817.
- 22. Croce, A.C. Fluorescence excitation properties of bilirubin in solution and in serum / A.C. Croce, A. Ferrigno, G. Bottiroli, L.G. Di Pasqua, C. Berardo, M. Vairetti // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2021. Vol. 215. P. 112121.
- 23. Nachabé, R. Effect of bile absorption coefficients on the estimation of liver tissue optical properties and related implications in discriminating healthy and tumorous samples / R. Nachabé, D.J. Evers, B.H.W. Hendriks, G.W. Lucassen, M. van der Voort, J. Wesseling, T.J.M. Ruers // Biomedical Optics Express. − 2011. − Vol. 2. − № 3. − P. 600-614.
- 24. Nogueira, M.S. Diffuse reflectance spectroscopy for determination of optical properties and chromophore concentrations of mice internal organs in the range of 350 nm to 1860 nm / M.S. Nogueira, M. Raju, J. Gunther, K. Grygoryev, K. Komolibus, H. Lu, S. Andersson-Engels // Proceedings of SPIE. 2018. Vol. 10685. P. 520-539.
- 25. Reistad, N. Intraoperative liver steatosis characterization using diffuse reflectance spectroscopy / N. Reistad, J.H. Nilsson, M. Bergenfeldt, P. Rissler, C. Sturesson // HPB. -2019. Vol. 21. No 2. P. 175-180.
- 26. Tuchin, V.V. Multimodal optical diagnostics of cancer / V.V. Tuchin, J. Popp, V. Zakharov. Springer International Publishing, 2020. 597 p.

- 27. Jürgens, M. Introduction to biophotonics / M. Jürgens, T. Mayerhöfer, J. Popp, G. Lee, D.L. Matthews, B.C. Wilson // Handbook of Biophotonics. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2013. P. 1-38.
- 28. Georgakoudi, I. The combined use of fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in Barrett's esophagus / I. Georgakoudi, M.S. Feld // Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America. -2004. Vol. 14. No 3. P. 519-537.
- 29*. Dremin, V. Optical percutaneous needle biopsy of the liver: a pilot animal and clinical study / V. Dremin, E. Potapova, E. Zherebtsov, **K. Kandurova**, V. Shupletsov, A. Alekseyev, A. Mamoshin, A. Dunaev // Scientific Reports. 2020. Vol. 10. P. 14200.
- 30*. Zherebtsov, E.A. Fluorescence lifetime needle optical biopsy discriminates hepatocellular carcinoma / E.A. Zherebtsov, E.V. Potapova, A.V. Mamoshin, V.V. Shupletsov, **K.Y. Kandurova**, V.V. Dremin, A.Y. Abramov, A.V. Dunaev // Biomedical Optics Express. -2022. Vol. 13. No 2. P. 633-646.
- 31. Mahadevan, V. Anatomy of the liver / V. Mahadevan // Surgery. -2020. Vol. $38. N_2 8. P. 427-431.$
- 32. Tortora, G.J. Principles of Anatomy and Physiology, 15th Edition / Tortora G.J., B.H. Derrickson. John Wiley & Sons, 2016. 1248 p.
- 33. Самусев, Р.П. Атлас анатомии человека / Р.П. Самусев, В.Я. Липченко. М.: Оникс, 2002. 320 с.
- 34. Azparren-Angulo, M. Extracellular vesicles in hepatology: Physiological role, involvement in pathogenesis, and therapeutic opportunities / M. Azparren-Angulo, F. Royo, E. Gonzalez, M. Liebana, B. Brotons, J. Berganza, F. Goñi-de-Cerio, N. Manicardi, L. Abad-Jordà, J. Gracia-Sancho, J.M. Falcon-Perez // Pharmacology & Therapeutics. 2021. Vol. 218. P. 107683.
- 35. Привес, М.Г. Анатомия человека / М.Г. Привес, Н.К. Лысенков, В.И. Бушкович. 12-е изд., перераб. и доп. СПб.: Издательский дом СПб МАПО, 2006. 720 с.

- 36. Nguyen-Lefebvre, A.T. Kupffer cell metabolism and function / A.T. Nguyen-Lefebvre, A. Horuzsko // Journal of Enzymology and Metabolism. -2015. Vol. $1.-N_{\odot}$ 1.-P. 101.
- 37. Айдагулова, С.В. Полиморфизм звездчатых клеток печени и их роль в фиброгенезе / С.В. Айдагулова, В.И. Капустина // Сибирский научный медицинский журнал. -2008. -№ 6. C. 93-97.
- 38. Abdel-Misih, S.R.Z. Liver anatomy / S.R.Z. Abdel-Misih, M. Bloomston // Surgical Clinics of North America. 2010. Vol. 90. № 4. P. 643-653.
- 39. Гайворонский, И.В. Анатомия и физиология человека: учеб. для студ. учреждений сред. проф. образования / И.В. Гайворонский, Г.И Ничипорук., А.И. Гайворонский. М.: Издательский центр «Академия», 2015. 496 с.
- 40. Brüggenwirth, I.M.A. Bile composition as a diagnostic and prognostic tool in liver transplantation / I.M.A. Brüggenwirth, R.J. Porte, P.N. Martins // Liver Transplantation. 2020. Vol. 26. № 9. P. 1177-1187.
- 41. Черешнев, В.А. Патофизиология / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков. М.: Вече, 2001. 703 с.
- 42. Патофизиология печени: методические разработки для самостоятельной работы студентов лечебного и педиатрического факультета / под.ред. Г.В. Порядина. М.: РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2015. 28 с.
- 43. Гуцол, Л.О. Клиническая патофизиология печени / Л.О. Гуцол, С.Ф. Непомнящих. Иркутск: ИГМУ, 2014. 41 с.
- 44. Национальные клинические рекомендации «Механическая желтуха доброкачественного характера» [Электронный ресурс]. 2018. 63 с. Режим доступа: http://общество-хирургов.рф/stranica-pravlenija/klinicheskie-rekomendaci/urgentnaja-abdominalnaja-hirurgija/okonchatelnyi-variant-utverzhdenyh-29-sentjabrja-na-sezde-hirurgov-v-nizhnem-novgorode-nkr-mehanicheskaja-zheltuha.html.
- 45. Багненко, С.Ф. Механическая желтуха: маршрутизация, диагностика, тактика лечения / С.Ф. Багненко, А.Ю. Корольков, Д.Н. Попов, С.А. Шаталов, Л.А. Логвин // Анналы хирургической гепатологии. − 2023. − Т. 28. − № 4. − С. 24-31.

- 46. Клинические рекомендации «Механическая желтуха опухолевого генеза» [Электронный ресурс]. 2023. 44 с. Режим доступа: http://общество-хирургов.рф/stranica-pravlenija/klinicheskie-rekomendaci/urgentnaja-abdominalnaja-hirurgija/mehanicheskaja-zheltuha-opuholevogo-geneza-2023.html.
- 47. Hwang, S.I. Surgical palliation of unresectable pancreatic head cancer in elderly patients / S.I. Hwang, H.O. Kim, B.H. Son, C.H. Yoo, H. Kim, J.H. Shin // World Journal of Gastroenterology. -2009. Vol. 15. № 8. P. 978-982.
- 48. Scott, E.N. Surgical bypass vs. endoscopic stenting for pancreatic ductal adenocarcinoma / E.N. Scott, G. Garcea, H. Doucas, W.P. Steward, A.R. Dennison, D.P. Berry // HPB. -2009. Vol. 11. No 2. P. 118-124.
- 49. Buxbaum, J.L. Inoperable pancreatic cancer patients who have prolonged survival exhibit an increased risk of cholangitis / J.L. Buxbaum, S.W. Biggins, K.C. Bagatelos, J.M. Inadomi, J.W. Ostroff // JOP Journal of the Pancreas. 2011. Vol. 12. N_{\odot} 4. P. 377-383.
- 50. Yu, J. Retrospective evaluation of endoscopic stenting of combined malignant common bile duct and gastric outlet-duodenum obstructions / J. Yu, J. Hao, D. Wu, H. Lang // Experimental and Therapeutic Medicine. − 2014. − Vol. 7. − № 4. − P. 1173-1177.
- 51. Iacono, C. Role of preoperative biliary drainage in jaundiced patients who are candidates for pancreatoduodenectomy or hepatic resection: highlights and drawbacks / C. Iacono, A. Ruzzenente, T. Campagnaro, L. Bortolasi, A. Valdegamberi, A. Guglielmi // Annals of Surgery. − 2013. − Vol. 257. − № 2. − P. 191-204.
- 52. Duan, F. Comparison of efficacy and complications of endoscopic and percutaneous biliary drainage in malignant obstructive jaundice: a systematic review and meta-analysis / F. Duan, L. Cui, Y. Bai, X. Li, J. Yan, X. Liu // Cancer imaging. -2017. $-\text{Vol.}\ 17. -\text{No}\ 1. -\text{P.}\ 27$.
- 53. Pavlidis, E.T. Pathophysiological consequences of obstructive jaundice and perioperative management / E.T. Pavlidis, T.E. Pavlidis // Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International. 2018. Vol. 17. \mathbb{N} 1. P. 17-21.

- 54. Kong, Y.L. Improving biliary stent patency for malignant obstructive jaundice using endobiliary radiofrequency ablation: experience in 150 patients / Y.L. Kong, H.Y. Zhang, C.L. Liu, X.J. He, G. Zhao, C. Wang, L.H. Kong, J. Zhao // Surgical Endoscopy. -2022. Vol. 36. No 2. P. 1789-1798.
- 55. Lukmonov, S. Minimally invasive biliary decompression methods in management of obstructive jaundice of malignant etiology / S. Lukmonov // HPB. 2018. Vol. 20. P. S730.
- 56. Tanaka, M. Intrahepatic microcirculatory disorder, parenchymal hypoxia and NOX4 upregulation result in zonal differences in hepatocyte apoptosis following lipopolysaccharide-and D-galactosamine-induced acute liver failure in rats / M. Tanaka, K. Tanaka, Y. Masaki, M. Miyazaki, M. Kato, K. Kotoh, M. Enjoji, M. Nakamuta, R. Takayanagi // International Journal of Molecular Medicine. − 2014. − Vol. 33. − № 2. − P. 254-262.
- 57. Fedorov, V.E. Features of mechanical jaundice course caused by complications of bile disease / V.E. Fedorov, B.S. Kharitonov, V.V. Masljakov, O.E. Logvina, M.A. Naryzhnaja // Grekov's Bulletin of Surgery. − 2020. − Vol. 179. − № 3. − P. 48-57.
- 58. Sakka, S.G. Assessing liver function / S.G. Sakka // Current Opinion in Critical Care. 2007. Vol. 13. № 2. P. 207-214.
- 59. De Gasperi, A. Indocyanine green kinetics to assess liver function: ready for a clinical dynamic assessment in major liver surgery? / A. De Gasperi, E. Mazza, M. Prosperi // World Journal of Hepatology. − 2016. − Vol. 8. − № 7. − P. 355-367.
- 60. Rassam, F. Current modalities for the assessment of future remnant liver function / F. Rassam, P.B. Olthof, R.J. Bennink, T.M. van Gulik // Visceral Medicine. 2017. Vol. 33. № 6. P. 442-448.
- 61. Клинические рекомендации «Механическая желтуха неопухолевого генеза» [Электронный ресурс]. 2023. 68 с. Режим доступа: http://общество-хирургов.рф/stranica-pravlenija/klinicheskie-rekomendaci/urgentnaja-abdominalnaja-hirurgija/mehanicheskaja-zheltuha-neopuholevogo-geneza-2023.html.

- 62. Roche, S.P. Jaundice in the adult patient / S.P. Roche, R. Kobos // American Family Physician. 2004. Vol. 69. № 2. P. 299-304.
- 63. Thapa, B.R. Liver function tests and their interpretation / B.R. Thapa, A. Walia // Indian Journal of Pediatrics. 2007. Vol. 74. P. 663-671.
- 64. Macías-Rodríguez, R.U. Reclassifying hepatic cell death during liver damage: ferroptosis a novel form of non-apoptotic cell death? / R.U. Macías-Rodríguez, M.E. Inzaugarat, A. Ruiz-Margáin, L.J. Nelson, C. Trautwein, F.J. Cubero // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21. № 5. P. 1651.
- 65. Verma, A. Analysis of bile in various hepatobiliary disease states: A pilot study / A. Verma, V. Bhatnagar, S. Prakash, A.K. Srivastava // Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons. − 2014. − Vol. 19. − № 3. − P. 151-155.
- 66. Потапова, Е.В. Оценка содержания билирубина в печеночной желчи пациентов с механической желтухой методом спектроскопии комбинационного рассеяния / Е.В. Потапова, В.Н. Приземин, Д.С. Сумин, А.В. Мамошин // Оптика и спектроскопия. 2023. Т. 131. № 8. С. 1152-1160.
- 67. Shiffman, M.L. Changes in gallbladder bile composition following gallstone formation and weight reduction / M.L. Shiffman, H.J. Sugerman, J.M. Kellum, E.W. Moore // Gastroenterology. − 1992. − Vol. 103. − № 1. − P. 214-221.
- 68. Парфенов, И.П. Современные представления об этиопатогенезе желчнокаменной болезни / И.П. Парфенов, М.А. Зорбасов, А.Л. Ярош, А.А. Карпачев, А.В. Солошенко // Актуальные проблемы медицины. 2011. Т. 15. № 16. С. 27-32.
- 69. Matton, A.P.M. Biliary bicarbonate, pH, and glucose are suitable biomarkers of biliary viability during ex situ normothermic machine perfusion of human donor livers / A.P.M. Matton, Y. de Vries, L.C. Burlage, R. van Rijn, M. Fujiyoshi, V.E. de Meijer, M.T. de Boer, R.H.J. de Kleine, H.J. Verkade, A.S.H. Gouw // Transplantation. − 2019. − Vol. 103. − № 7. − P. 1405-1413.
- 70. Uemura, S. Level of total bilirubin in the bile of the future remnant liver of patients with obstructive jaundice undergoing hepatectomy predicts postoperative liver

- failure / S. Uemura, R. Higuchi, T. Yazawa, W. Izumo, T. Otsubo, M. Yamamoto //
 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences. 2020. Vol. 27. № 9. P. 614-621.
- 71. Малаханов, В.А. Лучевая диагностика при стенозирующих поражениях желчевыводящих путей (обзор литературы) / В.А. Малаханов, П.В. Селиверстов // Acta Biomedica Scientifica. 2017. Т. 2. № 1. С. 112-120.
- 72. Siddique, K. Evaluation of the aetiological spectrum of obstructive jaundice / K. Siddique, Q. Ali, S. Mirza, A. Jamil, A. Ehsan, S. Latif, A.Z. Malik // Journal of Ayub Medical College Abbottabad. − 2008. − Vol. 20. − № 4. − P. 62-66.
- 73. Admassie, D. Validity of ultrasonography in diagnosing obstructive jaundice / D. Admassie, A. Denke // East African Medical Journal. 2005. Vol. 82. № 7. P. 379-381.
- 74. Keating, A. Obstructive jaundice induced by biliary ascariasis / A. Keating, J.A. Quigley // Case Reports. 2012. Vol. 2012. P. bcr2012007250.
- 75. Mendonça, E.Q. Endoscopic versus surgical treatment of ampullary adenomas: a systematic review and meta-analysis / E.Q. Mendonça, W.M. Bernardo, E G.H. de Moura, D. M. Chaves, A. Kondo, LZ.C.T.Pu, F.I.Baracat // Clinics. 2016. Vol. 71. P. 28-35.
- 76. Gurusamy, K.S. Ultrasound versus liver function tests for diagnosis of common bile duct stones / K.S. Gurusamy, V. Giljaca, Y. Takwoingi, D. Higgie, G. Poropat, D. Štimac, B.R. Davidson // Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015. Vol. 2015. № 2. P. CD011548.
- 77. Морозов, С.В. Непрямая ультразвуковая эластография печени: от диагностики фиброза печени-к контролю над лечением / С.В. Морозов, Ю.А. Кучерявый, Н.Ю. Стукова, Е.А. Краснякова // Доказательная гастроэнтерология. 2013. Т. 2. № 2. С. 31-37.
- 78. Катрич, А.Н. К вопросу о роли лучевых методов исследования в диагностике синдрома механической желтухи в условиях приемного отделения / А.Н. Катрич, С.В. Польшиков, А.М. Курильская // Инновационная медицина Кубани. 2020. № 3. С. 68-76.

- 79. Barr, R.G. Update to the society of radiologists in ultrasound liver elastography consensus statement / R.G. Barr, S.R. Wilson, D. Rubens, G. Garcia-Tsao, G. Ferraioli // Radiology. 2020. Vol. 296. № 2. P. 263-274.
- 80. Sharma, M.P. Aetiological spectrum of obstructive jaundice and diagnostic ability of ultrasonography: a clinician's perspective / M.P. Sharma, V. Ahuja // Tropical gastroenterology: official journal of the Digestive Diseases Foundation. 1999. Vol. 20. N = 4. P. 167-169.
- 81. Бурдюков, М.С. Холедохолитиаз: обзор литературы / М.С. Бурдюков, А.М. Нечипай // Доказательная гастроэнтерология. 2020. Т. 9. № 4. С. 55-66.
- 82. Tongdee, T. Accuracy of multidetector computed tomography cholangiography in evaluation of cause of biliary tract obstruction / T. Tongdee, O. Amornvittayachan, R. Tongdee // Journal of the Medical Association of Thailand. -2010. -Vol. 93.-No. 5.-P. 566-573.
- 83. Anderson, S.W. Accuracy of MDCT in the diagnosis of choledocholithiasis / S.W. Anderson, B.C. Lucey, J.C. Varghese, J.A. Soto // American Journal of Roentgenology. 2006. Vol. 187. № 1. P. 174-180.
- 84. Tseng, C. Can computed tomography with coronal reconstruction improve the diagnosis of choledocholithiasis? / C. Tseng, C. Chen, T. Chen, F. Chang, H. Lin, S. Lee // Journal of Gastroenterology and Hepatology. − 2008. − Vol. 23. − № 10. − P. 1586-1589.
- 85. Mathew, R.P. Value and accuracy of multidetector computed tomography in obstructive jaundice / R.P. Mathew, A. Moorkath, R.S. Basti, H.B. Suresh // Polish Journal of Radiology. 2016. Vol. 81. P. 303-309.
- 86. Pietryga, J.A. Imaging preoperatively for pancreatic adenocarcinoma / J.A. Pietryga, D.E. Morgan // Journal of Gastrointestinal Oncology. 2015. Vol. 6. № 4. P. 343-357.
- 87. Ni, Q. MDCT assessment of resectability in hilar cholangiocarcinoma / Q. Ni, H. Wang, Y. Zhang, L. Qian, J. Chi, X. Liang, T. Chen, J. Wang // Abdominal Radiology. 2017. Vol. 42. P. 851-860.

- 88. Кононенко, С.Н. Диагностика механической желтухи и пути повышения эффективности миниинвазивных технологий, направленных на ее ликвидацию / С.Н. Кононенко, С.В. Лимончиков // Хирургия. Журнал им. НИ Пирогова. 2011. N 9. С. 4-10.
- 89. Yoon, J.H. Clinical feasibility of 3-dimensional magnetic resonance cholangiopancreatography using compressed sensing: comparison of image quality and diagnostic performance / J.H. Yoon, S.M. Lee, H.J. Kang, E. Weiland, E. Raithel, Y. Son, B. Kiefer, J.M. Lee // Investigative radiology. − 2017. − Vol. 52. − № 10. − P. 612-619.
- 90. Koh, D.M. Functional magnetic resonance imaging of the liver: parametric assessments beyond morphology / D.M. Koh, A.R. Padhani // Magnetic Resonance Imaging Clinics. -2010. Vol. 18. N @ 3. P. 565-585.
- 91. Río Bártulos, C. Assessment of liver function with MRI: where do we stand? / C. Río Bártulos, K. Senk, M. Schumacher, J. Plath, N. Kaiser, R. Bade, J. Woetzel, P. Wiggermann // Frontiers in Medicine. 2022. Vol. 9. P. 839919.
- 92. Chalya, P.L. Etiological spectrum and treatment outcome of Obstructive jaundice at a University teaching Hospital in northwestern Tanzania: A diagnostic and therapeutic challenges / P.L. Chalya, E.S. Kanumba, M. Mchembe // BMC research notes. $-2011.-Vol.\ 4.-P.\ 1-7.$
- 93. Мамошин, А.В. Антеградные эндобилиарные вмешательства в лечении стриктуры билиодигестивного анастомоза в сочетании с мегахолелитиазом / А.В. Мамошин, А.Л. Альянов, А.В. Борсуков, Ю.В. Иванов, В.Ф. Мурадян, А.В. Аболмасов, Д.С. Сумин // Эндоскопическая хирургия. 2018. Т. 24. № 5. С. 55-59.
- 94. Koc, B. Complications following endoscopic retrograde cholangiopancreatography: minimal invasive surgical recommendations / B. Koc, H.Y. Bircan, G. Adas, O. Kemik, A. Akcakaya, A. Yavuz, S. Karahan // PLoS One. 2014. Vol. 9. № 11. P. e113073.
- 95. Olsson, G. Antibiotic prophylaxis in ERCP with failed cannulation / G. Olsson, L. Enochsson, F. Swahn, B. Andersson // Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2021. Vol. 56. № 3. P. 336-341.

- 96. Debourdeau, A. Effectiveness of endoscopic ultrasound (EUS)-guided choledochoduodenostomy vs. EUS-guided gallbladder drainage for jaundice in patients with malignant distal biliary obstruction after failed endoscopic retrograde cholangiopancreatography: Retrospective, multicenter study (GALLBLADEUS Study) / A. Debourdeau, J. Daniel, L. Caillo, E. Assenat, M. Bertrand, T. Bardol, F.R. Souche, P. Pouderoux, R. Gerard, D. Lorenzo, J.F. Bourgaux // Digestive Endoscopy. − 2025. − Vol. 37. − № 1. − P. 103-114.
- 97. Кабанов, М.Ю. Трудности оценки тяжести дисфункции печени при механической желтухе / М.Ю. Кабанов, К.В. Семенцов, Д.Ю. Бояринов, М.Н. Мянзелин, М.Я. Беликова, В.В. Алексеев // Анналы хирургической гепатологии. 2021. Т. 26. № 2. С. 129-136.
- 98. Юсупова, А.Ф. Динамическая сцинтиграфия гепатобилиарной системы в диагностике постхолецистэктомического синдрома / А.Ф. Юсупова, Н.М. Валиуллина, А.Х. Одинцова // Казанский медицинский журнал. 2007. Т. 88. № 1. С. 44-46.
- 99. Levesque, E. Current use and perspective of indocyanine green clearance in liver diseases / E. Levesque, E. Martin, D. Dudau, C. Lim, G. Dhonneur, D. Azoulay // Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine. − 2016. − Vol. 35. − № 1. − P. 49-57.
- 100. Дзидзава, И.И. Количественная оценка функции печени методом клиренс-теста с индоцианином зеленым / И.И. Дзидзава, Б.Н. Котив, Д.П. Кашкин, А.А. Кочаткова, С.А. Бугаев, А.В. Смородский, А.В. Слободяник // Трансплантология. 2010. № 1. С. 30-37.
- 101. Краснов, О.А. Современные методы оценки функционального резерва печени в резекционной хирургии органа / О.А. Краснов, В.В. Павленко, К.А. Краснов, А.О. Краснов, В.А. Пельц, А.Б. Старцев, И.Х. Аминов, А.С. Сохарев, С.Е. Керопян // Journal of Siberian Medical Sciences. − 2014. − № 6. − С. 37.
- 102. Дзидзава, И.И. Применение КТ-волюметрии и клиренс-теста с индоцианином зеленым для определения показаний к предоперационной эмболизации воротной вены / И.И. Дзидзава, А.В. Слободяник, А.В. Кудрявцева,

- И.С. Железняк, Б.Н. Котив, С.А. Алентьев, М.В. Лазуткин, С.А. Солдатов // Анналы хирургической гепатологии. -2017. T. 21. № 3. C. 34-46.
- 103. Dellatore, P. Prognostic Models in Acute and Acute on Chronic Liver Failure / P. Dellatore, A. Mishra, V. Rustgi // Liver Failure: Acute and Acute on Chronic. 2020. P. 91-107.
- 104. Child, C.G. Surgery and portal hypertension / C.G. Child, J.G. Turcotte // Major problems in clinical surgery. 1964. Vol. 1. P. 1-85.
- 105. Pugh, R.N.H. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices / R.N.H. Pugh, I.M. Murray-Lyon, J.L. Dawson, M.C. Pietroni, R. Williams // British journal of surgery. 1973. Vol. 60. № 8. P. 646-649.
- 106. Ивашкин, В.Т. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации по лечению осложнений цирроза печени / В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская, Ч.С. Павлов, Е.А. Федосьина, Е.Н. Бессонова, И.Ю. Пирогова, Д.В. Гарбузенко // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2016. Т. 26. № 4. С. 71-102.
- 107. Новрузбеков, М.С. Применение индоцианина зеленого (ICG) при трансплантации печени / М.С. Новрузбеков, К.Н. Луцык, О.Д. Олисов, К.М. Магомедов, Б.И. Казымов, К.Ф. Алекберов, А.Р. Ахмедов, Б.И. Яремин // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2023. № 9—2. С. 63—72.
- 108. Kamath, P.S. A model to predict survival in patients with end–stage liver disease / P.S. Kamath, R.H. Wiesner, M. Malinchoc, W. Kremers, T.M. Therneau, C.L. Kosberg, G. D'Amico, E.R. Dickson, W.R. Kim // Hepatology. 2001. Vol. 33. № 2. P. 464-470.
- 109. Kim, H.J. Important predictor of mortality in patients with end-stage liver disease / H.J. Kim, H.W. Lee // Clinical and molecular hepatology. -2013. Vol. 19. No. 2. P. 105.
- 110. Deng, M. Clinical application of Albumin-Bilirubin (ALBI) score: The current status / M. Deng, S.W.Y. Ng, S.T. Cheung, C.C.N. Chong // The Surgeon. -2020. Vol. 18. No. 3. P. 178-186.

- 111. Toyoda, H. The ALBI score: From liver function in patients with HCC to a general measure of liver function / H. Toyoda, P.J. Johnson // JHEP Reports. -2022. Vol. 4. N 10. P. 100557.
- 112. Rimini, M. Child Pugh and ALBI grade: past, present or future? / M. Rimini, G. Rovesti, A. Casadei-Gardini // Annals of translational medicine. 2020. Vol. 8. № 17. P. 1044.
- 113. Гальперин, Э.И. Классификация тяжести механической желтухи / Э.И. Гальперин // Анналы хирургической гепатологии. 2012. Т. 17. № 2. С. 26-33.
- 114. Гальперин, Э.И. Классификация тяжести механической желтухи / Э.И.
 Гальперин, О.Н. Момунова // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2014. № 1.
 С. 5-9.
- 115. Шишкин, И.Ф. Теоретическая метрология. Ч.1. Общая теория измерений: учеб. пособие для вузов / И.Ф. Шишкин. СПб.: Питер, 2010. 190 с.
- 116. Григан, А.М. Управленческая диагностика: теория и практика: монография / А.М. Григан. Ростов-на-Дону: РСЭИ, 2009. 316 с.
- 117. Tuchin, V.V. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics, Second Edition, Volume 1: Light-Tissue Interaction / V.V. Tuchin. SPIE Press, 2016. 864 p.
- 118*. **Кандурова, К.Ю.** Методы оптической биопсии и их перспективы применения для интраоперационного анализа тканевого метаболизма и микроциркуляции крови в мини-инвазивной хирургии / **К.Ю. Кандурова**, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов, А.Л. Альянов, А.В. Мамошин, Е.В. Потапова, А.В. Дунаев, В.Ф. Мурадян, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018. Т. 17. № 3. С. 71-79.
- 119*. **Kandurova, K.** Fiber-Optic System for Intraoperative Study of Abdominal Organs during Minimally Invasive Surgical Interventions / **K. Kandurova**, V. Dremin, E. Zherebtsov, E. Potapova, A. Alyanov, A. Mamoshin, Y. Ivanov, A. Borsukov, A. Dunaev // Applied Sciences. 2019. Vol. 9. № 2. P. 217.
- 120*. Zherebtsov, E. Machine learning aided photonic diagnostic system for minimally invasive optically guided surgery in the hepatoduodenal area / E.A. Zherebtsov, M. Zajnulina, **K.Yu. Kandurova**, E.V. Potapova, V.V. Dremin, A.V.

- Mamoshin, S.G. Sokolovski, A.V. Dunaev, E.U. Rafailov // Diagnostics. -2020. Vol. 10. № 11. P. 873.
- 121. Kim, J.A. Optical spectroscopy for in vivo medical diagnosis—a review of the state of the art and future perspectives / J.A. Kim, D.J. Wales, G.Z. Yang // Progress in Biomedical Engineering. $-2020. \text{Vol.} \ 2. \text{N} \ 4. \text{P.} \ 042001.$
- 122. Keereweer, S. Optical image-guided surgery where do we stand? / S. Keereweer, J.D. Kerrebijn, P.B. van Driel, B. Xie, E.L. Kaijzel, T.J. Snoeks, I. Que, M. Hutteman, J.R. van der Vorst, J.S. Mieog, A.L. Vahrmeijer, C.J. van de Velde, R.J. Baatenburg de Jong, C.W. Löwik // Molecular Imaging and Biology. 2011. Vol. 13. P. 199-207.
- 123. Shahzad, A. Diagnostic application of fluorescence spectroscopy in oncology field: hopes and challenges / A. Shahzad, M. Knapp, M. Edetsberger, M. Puchinger, E. Gaubitzer, G. Köhler // Applied Spectroscopy Reviews. -2010. Vol. 45.-No 1. P. 92-99.
- 124. Bratchenko, I.A. In vivo hyperspectral imaging of skin malignant and benign tumors in visible spectrum / I.A. Bratchenko, V.P. Sherendak, O.O. Myakinin, D.N. Artemyev, A.A. Moryatov, E. Borisova, L. Avramov, L.A. Zherdeva, A.E. Orlov, S.V. Kozlov, V.P. Zakharov // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. -2018. Vol. 4.-N 1.- P. 5-12.
- 125. Voulgarelis, S. Evaluation of visible diffuse reflectance spectroscopy in liver tissue: validation of tissue saturations using extracorporeal circulation / S. Voulgarelis, F. Fathi, A.G. Stucke, K.D. Daley, J. Kim, M.A. Zimmerman, J.C. Hong, N. Starkey, K.P. Allen, B. Yu // Journal of Biomedical Optics. − 2021. − Vol. 26. − № 5. − P. 055002.
- 126. Croce, A.C. Fatty liver oxidative events monitored by autofluorescence optical diagnosis: Comparison between subnormothermic machine perfusion and conventional cold storage preservation / A.C. Croce, A. Ferrigno, V. Bertone, V.M. Piccolini, C. Berardo, L.G. Di Pasqua, V. Rizzo, G. Bottiroli, M. Vairetti // Hepatology Research. 2017. Vol. 47. № 7. P. 668-682.

- 127. Surazynski, L. Real-Time Tissue Classification Using a Novel Optical Needle Probe for Biopsy / L. Surazynski, V. Hassinen, M.T. Nieminen, T. Seppänen, T. Myllylä // Applied spectroscopy. − 2024. − Vol. 78. − № 5. − P. 477-485.
- 128. Keller, A. Diffuse reflectance spectroscopy of human liver tumor specimenstowards a tissue differentiating optical biopsy needle using light emitting diodes / A. Keller, P. Bialecki, T.J. Wilhelm, M.K. Vetter // Biomedical Optics Express. -2018. Vol. 9. No 3. P. 1069-1081.
- 129. Potapova, E.V. In Vivo Time-Resolved Fluorescence Detection of Liver Cancer Supported by Machine Learning / E.V. Potapova, V.V. Shupletsov, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, A.V. Mamoshin, A.V. Dunaev // Lasers in Surgery and Medicine. 2024. Vol. 56. № 10. P. 836-844.
- 130. Reistad, N. Diffuse reflectance spectroscopy of liver tissue / N. Reistad, J. Nilsson, O.V. Timmermand, C. Sturesson, S. Andersson-Engels // Biophotonics South America. SPIE, 2015. Vol. 9531. P. 587-596.
- 131. Shi, H. Early identification of acute hypoxia based on brain NADH fluorescence and cerebral blood flow / H. Shi, N. Sun, A. Mayevsky, Z. Zhang, Q. Luo // Journal of Innovative Optical Health Sciences. − 2014. − Vol. 7. − № 2. − P. 1450033.
- 132. Lee, S.Y. Characterizing human pancreatic cancer precursor using quantitative tissue optical spectroscopy / S.Y. Lee, W.R. Lloyd, M. Chandra, R.H. Wilson, B. McKenna, D. Simeone, J. Scheiman, M.A. Mycek // Biomedical Optics Express. 2013. Vol. 4. № 12. P. 2828-2834.
- 133. Du Le, V.N. Dual-modality optical biopsy of glioblastomas multiforme with diffuse reflectance and fluorescence: ex vivo retrieval of optical properties / V.N. Du Le, J. Provias, N. Murty, M.S. Patterson, Z. Nie, J.E. Hayward, T.J. Farrell, W. McMillan, W. Zhang, Q. Fang // Journal of biomedical optics. − 2017. − Vol. 22. − № 2. − P. 027002.
- 134. Harris, K. Optical imaging of tissue obtained by transbronchial biopsies of peripheral lung lesions / K. Harris, D.J. Rohrbach, K. Attwood, J. Qiu, U. Sunar // Journal of Thoracic Disease. -2017. Vol. 9. N 25. P. 1386-1392.
- 135. Lloyd, W.R. In vivo optical spectroscopy for improved detection of pancreatic adenocarcinoma: a feasibility study / W.R. Lloyd, R.H. Wilson, S.Y. Lee, M.

- Chandra, B. McKenna, D. Simeone, J. Scheiman, M.A. Mycek // Biomedical Optics Express. 2013. Vol. 5. № 1. P. 9-15.
- 136. Fabila, D. In vivo assessment of liver fibrosis using diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy: a proof of concept / D. Fabila, J.M. de la Rosa, S. Stolik, E. Moreno, K. Suárez-Álvarez, G. López-Navarrete, C. Guzmán, J. Aguirre-García, C. Acevedo-García, D. Kershenobich // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. − 2012. − Vol. 9. − № 4. − P. 376-382.
- 137. Alfano, R. Optical biopsy for cancer detection / R. Alfano, Y. Pu. Lasers for Medical Applications. Woodhead Publishing, 2013. P. 325-367.
- 138. Nogueira, M.S. Assessing the photoaging process at sun exposed and non-exposed skin using fluorescence lifetime spectroscopy / M.S. Nogueira, C. Kurachi // Optical Biopsy XIV: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis. SPIE, 2016. Vol. 9703. P. 278-286.
- 139. Marcu, L. Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics / L. Marcu, P.M.W. French, D.S. Elson. CRC press, 2014. 553 p.
- 140. Croce, A.C. Light and autofluorescence, multitasking features in living organisms / A.C. Croce // Photochem. 2021. Vol. 1. № 2. P. 67-124.
- 141. Shrirao, A.B. Autofluorescence of blood and its application in biomedical and clinical research / A.B. Shrirao, R.S. Schloss, Z. Fritz, M. V Shrirao, R. Rosen, M.L. Yarmush // Biotechnology and bioengineering. − 2021. − Vol. 118. − № 12. − P. 4550-4576.
- 142. Bartolomé, F. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells / F. Bartolomé, A.Y. Abramov // Mitochondrial Medicine: Volume I, Probing Mitochondrial Function. 2015. Vol. 1264. P. 263-270.
- 143. Croce, A.C. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis / A.C. Croce, G. Bottiroli // European journal of histochemistry: EJH. -2014. Vol. 58. No 4. P. 320-337.

- 144. Дунаев, А.В. Мультимодальная оптическая диагностика микроциркуляторно-тканевых систем организма человека: монография / А.В. Дунаев. Старый Оскол: ТНТ, 2022. 440 с.
- 145. Chance, B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization / B. Chance, G.R. Williams // Journal of Biological Chemistry. 1955. Vol. 217. № 1. P. 383-393.
- 146. Chance, B. Fluorescence measurements of mitochondrial pyridine nucleotide in aerobiosis and anaerobiosis / B. Chance, B. Thorell // Nature. 1959. Vol. 184. P. 931-934.
- 147. Chance, B. Intracellular Oxidation-Reduction States in Vivo: The microfluorometry of pyridine nucleotide gives a continuous measurement of the oxidation state / B. Chance, P. Cohen, F. Jobsis, B. Schoener // Science. − 1962. − Vol. 137. − № 3529. − P. 499-508.
- 148. Chance, B. Properties and kinetics of reduced pyridine nucleotide fluorescence of the isolated and in vivo rat heart / B. Chance // Biochem Zeit. 1965. Vol. 341. P. 357-377.
- 149. Chance, B. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals / B. Chance, N. Oshino, T. Sugano, A. Mayevsky // Oxygen Transport to Tissue: Instrumentation, Methods, and Physiology. 1973. P. 277-292.
- 150. Mayevsky, A. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: From animals to clinical use / A. Mayevsky, B. Chance // Mitochondrion. − 2007. − Vol. 7. − № 5. − P. 330-339.
- 151. Лукина, М.М. Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор) / М.М. Лукина, М.В. Ширманова, Т.Ф. Сергеева, Е.В. Загайнова // Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8. № 4. С. 113-128.
- 152*. Дунаев, А.В. Основы медицинской биофотоники / А.В. Дунаев, Е.В. Потапова, А.К. Королева, Е.О. Брянская, **К.Ю. Кандурова**, Е.В. Жарких, В.В. Дрёмин. Орёл: ОГУ имени И.С. Тургенева, 2022. 195 с.

- 153. Alfano, R. Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues / R. Alfano, G. Tang, A. Pradhan, W. Lam, D. Choy, E. Opher // IEEE Journal of Quantum Electronics. − 1987. − Vol. 23. − № 10. − P. 1806-1811.
- 154. Alfano, R.R. Light sheds light on cancer distinguishing malignant tumors from benign tissues and tumors / R.R. Alfano, B.B. Das, J. Cleary, R. Prudente, E.J. Celmer // Bulletin of the New York Academy of Medicine. 1991. Vol. 67. № 2. P. 143-150.
- 155. Alfano, R. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue / R. Alfano, D. Tata, J. Cordero, P. Tomashefsky, F. Longo, M. Alfano // IEEE Journal of Quantum Electronics. − 1984. − Vol. 20. − № 12. − P. 1507-1511.
- 156. Villringer, A. Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function / A. Villringer, B. Chance // Trends in neurosciences. -1997. Vol. 20. Non 10. P. 435-442.
- 157. Liu, Q. Compact point-detection fluorescence spectroscopy system for quantifying intrinsic fluorescence redox ratio in brain cancer diagnostics / Q. Liu, G. Grant, J. Li, Y. Zhang, F. Hu, S. Li, C. Wilson, K. Chen, D. Bigner, T. Vo-Dinh // Journal of biomedical optics. -2011. Vol. 16. No 3. P. 037004-037004-11.
- 158. Palmer, G.M. Autofluorescence Spectroscopy of Normal and Malignant Human Breast Cell Lines / G.M. Palmer, P.J. Keely, T.M. Breslin, N. Ramanujam // Photochemistry and Photobiology. 2003. Vol. 78. № 5. P. 462-469.
- 159. Mathieu, M.C. Preclinical ex vivo evaluation of the diagnostic performance of a new device for in situ label-free fluorescence spectral analysis of breast masses / M.C. Mathieu, A. Toullec, C. Benoit, R. Berry, P. Validire, P. Beaumel, Y. Vincent, P. Maroun, P. Vielh, L. Alchab // European Radiology. 2018. Vol. 28. P. 2507-2515.
- 160. Gust, L. Pulmonary endogenous fluorescence allows the distinction of primary lung cancer from the perilesional lung parenchyma / L. Gust, A. Toullec, C. Benoit, R. Farcy, S. Garcia, V. Secq, J.Y. Gaubert, D. Trousse, B. Orsini, C. Doddoli // PLoS One. -2015. Vol. 10. No 8. P. e0134559.
- 161. Panjehpour, M. Laser-induced fluorescence spectroscopy for in vivo diagnosis of non-melanoma skin cancers / M. Panjehpour, C.E. Julius, M.N. Phan, T. Vo-

- Dinh, S. Overholt // Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. -2002. Vol. 31. No. 5. P. 367-373.
- 162. Bratchenko, I.A. Optical biopsy of amelanotic melanoma with Raman and autofluorescence spectra stimulated by 785 nm laser excitation / I.A. Bratchenko, Y.A. Khristoforova, L.A. Bratchenko, A.A. Moryatov, S.V. Kozlov, E.G. Borisova, V.P. Zakharov // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. − 2021. − Vol. 7. − № 2. − P. 020308.
- 163. Rusakov, I.G. Fluorescent diagnostic methods and superficial cancer of the urinary bladder: current status / I.G. Rusakov, V.V. Sokolov, N.N. Bulgakova, R.V. Ul'ianov, A.A. Teplov // Urologiia. − 2008. − № 3. − P. 67-72.
- 164. Palmer, S. Optical redox ratio and endogenous porphyrins in the detection of urinary bladder cancer: A patient biopsy analysis / S. Palmer, K. Litvinova, A. Dunaev, J. Yubo, D. McGloin, G. Nabi // Journal of Biophotonics. − 2017. − Vol. 10. − № 8. − P. 1062-1073.
- 165. Georgakoudi, I. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes / I. Georgakoudi, B.C. Jacobson, M.G. Müller, E.E. Sheets, K. Badizadegan, D.L. Carr-Locke, C.P. Crum, C.W. Boone, R.R. Dasari, J.Van Dam, M.S. Feld // Cancer Research. 2002. Vol. 62. № 3. P. 682-687.
- 166. Mayinger, B. Endoscopic light-induced autofluorescence spectroscopy for the diagnosis of colorectal cancer and adenoma / B. Mayinger, M. Jordan, P. Horner, C. Gerlach, S. Muehldorfer, B.R. Bittorf, K.E. Matzel, W. Hohenberger, E.G. Hahn, K. Guenther // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. -2003. Vol. 70. No 1. P. 13-20.
- 167. Tanis, E. In vivo tumor identification of colorectal liver metastases with diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy / E. Tanis, D.J. Evers, J.W. Spliethoff, V. V Pully, K. Kuhlmann, F. van Coevorden, B.H.W. Hendriks, J. Sanders, W. Prevoo, T.J.M. Ruers // Lasers in surgery and medicine. -2016. Vol. 48. No 9. P. 820-827.

- 168. Apolikhina, L.A. Fluorescence detection and photodynamic therapy of human papilloma virus associated diseases of female genital organs / L.A. Apolikhina, E.D. Denisova, N.N. Bulgakova, S.G. Kuzmin, G.N. Vorozhtsov // Proceedings of the 6th International Congress of the World Association of Laser Therapy, WALT 2006. 2006. P. 59-61.
- 169. Bulgakova, N. In vivo local fluorescence spectroscopy in PDD of superficial bladder cancer / N. Bulgakova, R. Ulijanov, K. Vereschagin, V. Sokolov, A. Teplov, I. Rusakov, V. Chissov // Medical Laser Application. − 2009. − Vol. 24. − № 4. − P. 247-255.
- 170. Spliethoff, J.W. Real-time in vivo tissue characterization with diffuse reflectance spectroscopy during transthoracic lung biopsy: a clinical feasibility study / J.W. Spliethoff, W. Prevoo, M.A.J. Meier, J. de Jong, H.M. Klomp, D.J. Evers, H.J.C.M. Sterenborg, G.W. Lucassen, B.H.W. Hendriks, T.J.M. Ruers // Clinical cancer research. − 2016. − Vol. 22. − № 2. − P. 357-365.
- 171. Braun, F. A customized multispectral needle probe combined with a virtual photometric setup for in vivo detection of Lewis lung carcinoma in an animal model / F. Braun, R. Schalk, M. Nachtmann, A. Hien, R. Frank, T. Beuermann, F.J. Methner, B. Kränzlin, M. Rädle, N. Gretz // Measurement Science and Technology. − 2019. − Vol. 30. − № 10. − P. 104001.
- 172. Poulon, F. Real-time Brain Tumor imaging with endogenous fluorophores: a diagnosis proof-of-concept study on fresh human samples / F. Poulon, J. Pallud, P. Varlet, M. Zanello, F. Chretien, E. Dezamis, G. Abi-Lahoud, F. Nataf, B. Turak, B. Devaux, D. Abi Haidar // Scientific reports. − 2018. − Vol. 8. − № 1. − P. 14888.
- 173. Croce, A.C. Autofluorescence-based optical biopsy: An effective diagnostic tool in hepatology / A.C. Croce, A. Ferrigno, G. Bottiroli, M. Vairetti // Liver International. 2018. Vol. 38. № 7. P. 1160-1174.
- 174. Croce, A.C. Human liver autofluorescence: an intrinsic tissue parameter discriminating normal and diseased conditions / A.C. Croce, U. De Simone, I. Freitas, E. Boncompagni, D. Neri, U. Cillo, G. Bottiroli // Lasers in surgery and medicine. -2010. $-\text{Vol.}\ 42.-\text{No}\ 5.-\text{P.}\ 371-378.$

- 175. Richards-Kortum, R. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis / R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca // Annual review of physical chemistry. 1996. Vol. 47. № 1. P. 555-606.
- 176. Potapova, E.V. Evaluation of microcirculatory disturbances in patients with rheumatic diseases by the method of diffuse reflectance spectroscopy / E.V. Potapova, V.V. Dremin, E.A. Zherebtsov, I.N. Makovik, A.I. Zherebtsova, A.V. Dunaev, K.V. Podmasteryev, V.V. Sidorov, A.I. Krupatkin, L.S. Khakhicheva, V.F. Muradyan // Human Physiology. − 2017. − Vol. 43. − № 2. − P. 222-228.
- 177. Bashkatov, A.N. Optical properties of skin, subcutaneous, and muscle tissues: a review / A.N. Bashkatov, E.A. Genina, V.V. Tuchin // Journal of innovative optical health sciences. $-2011.-Vol.\ 4.-No.\ 1.-P.\ 9-38.$
- 178. Lister, T. Optical properties of human skin / T. Lister, P.A. Wright, P.H. Chappell // Journal of biomedical optics. 2012. Vol. 17. № 9. P. 090901.
- 179. Jacques, S.L. Mie scattering from cellular structures [Electronic resourse] / S.L. Jacques, S.A. Prahl. 1998. Режим доступа: https://omlc.org/classroom/ece532/class3/mie_softtissues.html.
- 180. Stratonnikov, A.A. Evaluation of blood oxygen saturation in vivo from diffuse reflectance spectra / A.A. Stratonnikov, V.B. Loschenov // Journal of biomedical optics. -2001. -Vol. 6. -No 4. -P. 457-468.
- 181. Sánchez-Ramos, L.L. Determination of tissue oxygen saturation by diffuse reflectance spectroscopy / L.L. Sánchez-Ramos, B. Morales-Cruzado, F.G. Pérez-Gutiérrez // Journal of Biomedical Optics. 2023. Vol. 28. № 9. P. 095002.
- 182. Surkov, Y.I. Multimodal method for differentiating various clinical forms of basal cell carcinoma and benign neoplasms in vivo / Y.I. Surkov, I.A. Serebryakova, Y.K. Kuzinova, O.M. Konopatskova, D.V. Safronov, S.V. Kapralov, E.A. Genina, V.V. Tuchin // Diagnostics. -2024. Vol. 14. No 2. P. 202.
- 183. Nilsson, J.H. Diffuse reflectance spectroscopy for surface measurement of liver pathology / J.H. Nilsson, N. Reistad, H. Brange, C.F. Öberg, C. Sturesson // European Surgical Research. 2017. Vol. 58. № 1-2. P. 40-50.

- 184. Красников, И.В. Распространение оптического излучения в биологических тканях / И.В. Красников, В.Е. Привалов, А.Ю. Сетейкин, А.Э. Фотиади // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. 2013. № 4. С. 202-217.
- 185. Потапова, Е.В. Оценка микроциркуляторных нарушений у пациентов ревматологического профиля с использованием метода спектроскопии диффузного отражения / Е.В. Потапова, В.В. Дрёмин, Е.А. Жеребцов, И.Н. Маковик, А.И. Жеребцова, А.В. Дунаев, К.В. Подмастерьев, В.В. Сидоров, А.И. Крупаткин, Л.С. Хахичева, В.Ф. Мурадян // Физиология человека. 2017. Т. 43. № 2. С. 116-124.
- 186. Anand, S. Diffuse reflectance spectroscopy for monitoring diabetic foot ulcer A pilot study / S. Anand, N. Sujatha, V.B. Narayanamurthy, V. Seshadri, R. Poddar // Optics and Lasers in Engineering. 2014. Vol. 53. P. 1-5.
- 187. Dremin, V. Monitoring oxidative metabolism while modeling pancreatic ischemia in mice using a multimodal spectroscopy technique / V. Dremin, E. Potapova, A. Mamoshin, A. Dunaev, E. Rafailov // Laser Physics Letters. -2020. Vol. 17. \mathbb{N}° 11. P. 115605.
- 188. Wang, H.W. Diffuse reflectance spectroscopy detects increased hemoglobin concentration and decreased oxygenation during colon carcinogenesis from normal to malignant tumors / H.W. Wang, J.K. Jiang, C.H. Lin, J.K. Lin, G.J. Huang, J.S. Yu // Optics express. 2009. Vol. 17. № 4. P. 2805-2817.
- 189. De Boer, L.L. Towards the use of diffuse reflectance spectroscopy for real-time in vivo detection of breast cancer during surgery / L.L. De Boer, T.M. Bydlon, F. Van Duijnhoven, M.J.T.F.D. Vranken Peeters, C.E. Loo, G.A.O. Winter-Warnars, J. Sanders, H.J.C.M. Sterenborg, B.H.W. Hendriks, T.J.M. Ruers // Journal of translational medicine. -2018. Vol. 16. No 1. P. 367.
- 190. Brouwer de Koning, S.G. Toward complete oral cavity cancer resection using a handheld diffuse reflectance spectroscopy probe / S.G. Brouwer de Koning, E.J.M. Baltussen, M.B. Karakullukcu, B. Dashtbozorg, L.A. Smit, R. Dirven, B.H.W.

- Hendriks, H.J.C.M. Sterenborg, T.J.M. Ruers // Journal of biomedical optics. 2018. Vol. 23. № 12. P. 121611.
- 191. Nachabé, R. Diagnosis of breast cancer using diffuse optical spectroscopy from 500 to 1600 nm: comparison of classification methods / R. Nachabé, D.J. Evers, B.H.W. Hendriks, G.W. Lucassen, M. van der Voort, E.J. Rutgers, M.J.V. Peeters, J.A. Van der Hage, H.S. Oldenburg, J. Wesseling // Journal of biomedical optics. − 2011. − Vol. 16. − № 8. − P. 087010.
- 192. Baltussen, E.J.M. Diffuse reflectance spectroscopy as a tool for real-time tissue assessment during colorectal cancer surgery / E.J.M. Baltussen, P. Snæbjörnsson, S.G.B. De Koning, H.J.C.M. Sterenborg, A.G.J. Aalbers, N. Kok, G.L. Beets, B.H.W. Hendriks, K.F.D. Kuhlmann, T.J.M. Ruers // Journal of biomedical optics. -2017. Vol. 22. N 10. P. 106014.
- 193. Chang, V.T.C. Quantitative physiology of the precancerous cervix in vivo through optical spectroscopy / V.T.C. Chang, P.S. Cartwright, S.M. Bean, G.M. Palmer, R.C. Bentley, N. Ramanujam // Neoplasia. 2009. Vol. 11. № 4. P. 325-332.
- 194. Zhang, Y. Physiological model using diffuse reflectance spectroscopy for nonmelanoma skin cancer diagnosis / Y. Zhang, A.J. Moy, X. Feng, H.T. Nguyen, J.S. Reichenberg, M.K. Markey, J.W. Tunnell // Journal of Biophotonics. -2019. Vol. 12. No 12. P. e201900154.
- 195. Evers, D.J. Optical sensing for tumor detection in the liver / D.J. Evers, R. Nachabé, D. Hompes, F. van Coevorden, G.W. Lucassen, B.H.W. Hendriks, M.L.F. van Velthuysen, J. Wesseling, T.J.M. Ruers // European Journal of Surgical Oncology (EJSO). -2013. Vol. 39. No 1. P. 68-75.
- 196. Westerkamp, A.C. Diffuse reflectance spectroscopy accurately quantifies various degrees of liver steatosis in murine models of fatty liver disease / A.C. Westerkamp, V.V. Pully, G. Karimian, F. Bomfati, Z.J. Veldhuis, J. Wiersema-Buist, B.H. Hendriks, T. Lisman, R.J. Porte // Journal of translational medicine. 2015. Vol. 13. P. 1-11.
- 197. Arista Romeu, E.J. Diffuse reflectance spectroscopy accurately discriminates early and advanced grades of fatty liver in mice / E.J. Arista Romeu, G.

- Escobedo, A. Campos-Espinosa, I.I. Romero-Bello, J. Moreno-González, D.A. Fabila-Bustos, A.V. Reed, S.S. Isakina, J.M. de la R. Vázquez, C. Guzmán // Journal of Biomedical Optics. 2018. Vol. 23. № 11. P. 115005.
- 198. Takihata, Y. In vivo diffuse reflectance spectroscopic analysis of fatty liver with inflammation in mice / Y. Takihata, S. Kawauchi, S. Ogata, I. Nishidate, S. Sato, J. Yamamoto, Y. Kishi // Surgery Open Science. 2021. Vol. 6. P. 21-28.
- 199. Surazynski, L. A method to detect thermal damage in bovine liver utilising diffuse reflectance spectroscopy / L. Surazynski, H.J. Nieminen, M.J. Mäkinen, M.T. Nieminen, T. Myllylä // Biomedical Spectroscopy and Imaging. − 2023. − Vol. 10. − № 3-4. − P. 99-112.
- 200. Гальперин, Э.И. Механическая желтуха: состояние «мнимой стабильности», последствия «второго удара», принципы лечения / Э.И. Гальперин // Анналы хирургической гепатологии. 2011. Т. 16. № 3. С. 16-25.
- 201. Гальперин, Э.И. Представление об энергетическом дефиците в ткани печени и дополнительной энергии в цифровом выражении (гипотеза) / Э.И. Гальперин // Анналы хирургической гепатологии. 2022. Т. 27. № 3. С. 114-125.
- 202. Imamura, H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators / H. Imamura, K.P.H. Nhat, H. Togawa, K. Saito, R. Iino, Y. Kato-Yamada, T. Nagai, H. Noji // Proceedings of the National Academy of Sciences. − 2009. − Vol. 106. − №. 37. − P. 15651-15656.
- 203. Jacques, S.L. Optical properties of biological tissues: a review / S.L. Jacques // Physics in Medicine & Biology. 2013. Vol. 58. № 11. P. R37-61.
- 204. Oliveira, L.M.C. Tissue Optics / L.M.C. Oliveira, V.V. Tuchin // The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering. Cham, Switzerland: Springer, 2019. P.1-15.
- 205. Kim, A. Measurement of ex vivo and in vivo tissue optical properties: methods and theories / A. Kim, B.C. Wilson // Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue. Springer, 2010. P. 267–319.

- 206. Sandell, J.L. A review of in-vivo optical properties of human tissues and its impact on PDT / J.L. Sandell, T.C. Zhu // Journal of biophotonics. -2011. Vol. 4. N o 11-12. P. 773-787.
- 207. Mesradi, M. Experimental and analytical comparative study of optical coefficient of fresh and frozen rat tissues / M. Mesradi, A. Genoux, V. Cuplov, D. Abi Haidar, S. Jan, I. Buvat, F. Pain // Journal of biomedical optics. -2013. Vol. 18. № 11. P. 117010.
- 208. Fribel, M. Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions / M. Fribel // Journal of Biomedical Optics. -2006. $-\text{Vol.}\ 11.-\text{No}\ 3.-\text{P.}\ 34921$.
- 209. Bosschaart, N. A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood / N. Bosschaart, G.J. Edelman, M.C.G. Aalders, T.G. van Leeuwen, D.J. Faber // Lasers in Medical Science. − 2014. − Vol. 29. − № 2. − P. 453-479.
- 210. Filatova, S.A. Optical properties of animal tissues in the wavelength range from 350 to 2600 nm / S.A. Filatova, I.A. Shcherbakov, V.B. Tsvetkov // Journal of Biomedical Optics. -2017. Vol. 22. No 20. 2019.
- 211. Cooksey, C.C. Reference data set of human skin reflectance / C.C. Cooksey, D.W. Allen, B.K. Tsai // Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology. 2017. Vol. 122. P. 26.
- 212. Genina, E.A. Optical clearing of cranial bone / E.A. Genina, A.N. Bashkatov, V.V. Tuchin // Advances in Optical Technologies. − 2008. − Vol. 2008. − № 1. − P. 267867.
- 213. Golovynskyi, S. Optical windows for head tissues in near-infrared and shortwave infrared regions: approaching transcranial light applications / S. Golovynskyi, I. Golovynska, L.I. Stepanova, O.I. Datsenko, L. Liu, J. Qu, T.Y. Ohulchanskyy // Journal of biophotonics. -2018. Vol. 11. No 12. P. e201800141.

- 214. Shanshool, A.S. Optical properties and fluence distribution in rabbit head tissues at selected laser wavelengths / A.S. Shanshool, E.N. Lazareva, O. Hamdy, V.V. Tuchin // Materials. -2022. Vol. 15. No 16. P. 5696.
- 215. Lanka, P. Estimation of porcine pancreas optical properties in the 600–1100 nm wavelength range for light-based therapies / P. Lanka, L. Bianchi, A. Farina, M. De Landro, A. Pifferi, P. Saccomandi // Scientific Reports. − 2022. − Vol. 12. − № 1. − P. 14300.
- 216. Martins, I.S. Fast estimation of the spectral optical properties of rabbit pancreas and pigment content analysis / I.S. Martins, H.F. Silva, V.V. Tuchin, L.M. Oliveira // Photonics. -2022. Vol. 9. No 2. P. 122.
- 217. Башкатов, А.Н. Оптические свойства тканей толстой кишки человека в спектральном диапазоне 350–2500 нм / А.Н. Башкатов, Э.А. Генина, В.И. Кочубей, В.С. Рубцов, Е.А. Колесникова, В.В. Тучин // Квантовая электроника. 2014. Т. 44. N = 8. С. 779-784.
- 218. Salomatina, E. Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range / E. Salomatina, B. Jiang, J. Novak, A.N. Yaroslavsky // Journal of biomedical optics. -2006. Vol. 11. № 6. P. 064026-064026-9.
- 219. Bargo, P.R. In vivo determination of optical properties of normal and tumor tissue with white light reflectance and an empirical light transport model during endoscopy / P.R. Bargo, S.A. Prahl, T.T. Goodell, R.A. Sleven, G. Koval, G. Blair, S.L. Jacques // Journal of biomedical optics. − 2005. − Vol. 10. − № 3. − P. 034018-034018-15.
- 220. Genina, E.A. Optical properties of brain tissues at the different stages of glioma development in rats: pilot study / E.A. Genina, A.N. Bashkatov, D.K. Tuchina, P.A. Dyachenko Timoshina, N. Navolokin, A. Shirokov, A. Khorovodov, A. Terskov, M. Klimova, A. Mamedova, I. Blokhina, I. Agranovich, E. Zinchenko, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya, V.V. Tuchin // Biomedical optics express. − 2019. − Vol. 10. − № 10. − P. 5182-5197.

- 221. Ritz, J.P. Optical properties of native and coagulated porcine liver tissue between 400 and 2400 nm / J.P. Ritz, A. Roggan, C. Isbert, G. Müller, H.J. Buhr, C.T. Germer // Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery. − 2001. − Vol. 29. − № 3. − P. 205-212.
- 222. Carneiro, I. Measuring optical properties of human liver between 400 and 1000 nm / I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, V.V. Tuchin // Quantum Electronics. -2019. -Vol. 49. -No. 1-P. 13-19.
- 223. Giannios, P. Visible to near-infrared refractive properties of freshly-excised human-liver tissues: marking hepatic malignancies / P. Giannios, K.G. Toutouzas, M. Matiatou, K. Stasinos, M.M. Konstadoulakis, G.C. Zografos, K. Moutzouris // Scientific reports. -2016. -Vol. 6. -No 1. -P. 1-10.
- 224. Maitland, D.J. Optical properties of human gallbladder tissue and bile / D.J. Maitland, J.T. Walsh, J.B. Prystowsky // Applied optics. − 1993. − Vol. 32. − № 4. − P. 586-591.
- 225. Baldini, F. Analysis of the optical properties of bile / F. Baldini, P. Bechi, F. Cianchi, A. Falai, C. Fiorillo, P. Nassi // Journal of Biomedical Optics. 2000. Vol. 5. № 3. P. 321-329.
- 226. Parsa, P. Optical properties of rat liver between 350 and 2200 nm / P. Parsa, S.L. Jacques, N.S. Nishioka // Applied optics. − 1989. − Vol. 28. − № 12. − P. 2325-2330.
- 227. Carneiro, I. Measurement of optical properties of normal and pathological human liver tissue from deep-UV to NIR / I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, L. Oliveira, V.V. Tuchin // Proceedings of SPIE. 2020. Vol. 11363. P. 43-56.
- 228. Hwang, J. Feasibility of infrared spectroscopy for discrimination between gallbladder polyp and gallbladder stone using bile juices / J. Hwang, H. Chung, K.G. Lee, H.J. Kim, D. Choi // Microchemical Journal. 2015. Vol. 123. P. 118-124.
- 229. Germer, C. Optical properties of native and coagulated human liver tissue and liver metastases in the near infrared range / C.T. Germer, A. Roggan, J.P. Ritz, C. Isbert, D. Albrecht, G. Müller, H.J. Buhr // Lasers in Surgery and Medicine. 1998. Vol. 23. N = 4. P. 194-203.

- 230. Giraev, K.M. Study on the Effect of Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet on the Morphofunctional Properties of Living Tissues (in vivo) / K.M. Giraev, N.A. Ashurbekov, E.Kh. Israpov, G.Sh. Shakhsinov, V.R. Abdulaev, K.M. Rabadanov, Z.M. Isaeva // Optics and Spectroscopy. − 2023. − Vol. 131. − № 8. − P. 659-670.
- 231. Roggan, A. Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500 nm / A. Roggan, M. Friebel, K. Dörschel, A. Hahn, G.J. Mueller // Journal of biomedical optics. − 1999. − Vol. 4. − № 1. − P. 36-46.
- 232*. **Kandurova**, **K**. Optical Properties of Perfused Rat Liver Tissues / **K**. **Kandurova**, A. Palalov, E. Seryogina, V. Dremin, A. Dunaev, E. Potapova // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2023. Vol. 9. № 1. P. 10301.
- 233*. **Кандурова, К.Ю.** Спектрофотометрические исследования оптических характеристик печени и желчи в диапазоне 350-1300 нм / **К.Ю. Кандурова** // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. − 2023. − Vol. 5. № 361. P. 117-126.
- 234. Council of the Organisation for Economic cooperation and Development.

 OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring //

 OECD Environmental Health and Safety Publications. 1998. 41 p.
- 235. Bessems, M. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model / M. Bessems, N.A. 't Hart, R. Tolba, B.M. Doorschodt, H.G. Leuvenink, R.J. Ploeg, T. Minor, T.M. van Gulik // Laboratory animals. − 2006. − Vol. 40. − № 3. − P. 236-246.
- 236. Aiken, J. Studies in rat liver perfusion for optimal harvest of hepatocytes / J. Aiken, L. Cima, B. Schloo, D. Mooney, L. Johnson, R. Langer, J.P. Vacanti //Journal of pediatric surgery. − 1990. − Vol. 25. − № 1. − P. 140-145.
- 237. Freshney, R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. / R.I. Freshney John Wiley & Sons, 2015 804 p.
- 238. Pan, M.X. An efficient method for decellularization of the rat liver / Pan M.X., Hu P.Y., Y. Cheng, L.Q. Cai, X.H. Rao, Y. Wang, Y. Gao // Journal of the Formosan Medical Association. 2014. Vol. 113. № 10. P. 680-687.

- 239. Prahl, S.A. Determining the optical properties of turbid media by using the adding–doubling method / S.A. Prahl, M.J.C. van Gemert, A.J. Welch // Applied optics. $-1993 \text{Vol.}\ 32. \cancel{N}24. \text{P.}\ 559-568.$
- 240. Prahl, S. Everything I think you should know about Inverse Adding-Doubling / S. Prahl // Oregon Medical Laser Center, St. Vincent Hospital. 2011. Vol 1344 P. 1-74.
- 241. Naulaers, G. Measurement of the liver tissue oxygenation by near-infrared spectroscopy / G. Naulaers, B. Meyns, M. Miserez, V. Leunens, S. Van Huffel, P. Casaer, H. Devlieger // Intensive care medicine. − 2005. − Vol. 31. − № 1. − P. 138-141.
- 242. Anderson, R.R. Selective photothermolysis of lipid-rich tissues: A free electron laser study / R.R. Anderson, W. Farinelli, H. Laubach, D. Manstein, A.N. Yaroslavsky, J. Gubeli 3rd, K. Jordan, G.R. Neil, M. Shinn, W. Chandler, G.P. Williams, S.V. Benson, D.R. Douglas, H.F. Dylla // Lasers in surgery and medicine. -2006. Vol. 38. No 10. P. 913-919.
- 243. Hale, G.M. Optical constants of water in the 200-nm to 200-μm wavelength region / G.M. Hale, M.R. Querry // Applied optics. 1973. Vol. 12. № 3. P. 555-563.
- 244. Lee, K. Measuring water contents in animal organ tissues using terahertz spectroscopic imaging / K. Lee, K. Jeoung, S.H. Kim, Y.B. Ji, H. Son, Y. Choi, Y.M. Huh, J.S. Suh, S.J. Oh // Biomedical optics express. − 2018. − Vol. 9. − № 4. − P. 1582-1589.
- 245. Michael Peters, A. The precise physiological definition of tissue perfusion and clearance measured from imaging / A. Michael Peters // European journal of nuclear medicine and molecular imaging. -2018. Vol. 45. No. 7. P. 1139-1141.
- 246. Zhou, W. Comparison of ablation zones among different tissues using 2450-MHz cooled-shaft microwave antenna: results in ex vivo porcine models / W. Zhou, M. Liang, H. Pan, X. Liu, Y. Jiang, Y. Wang, L. Ling, Q. Ding, S. Wang // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 8. P. e71873.
- 247. Ishimaru, A. Wave propagation and scattering in random media / A. Ishimaru New York: Academic press, 1978. 272 p.

- 248. Zonios, G. Modeling diffuse reflectance from semi-infinite turbid media: application to the study of skin optical properties / G. Zonios, A. Dimou // Optics express. $-2006. \text{Vol}.\ 14. \text{N}\underline{\circ}\ 19. \text{P}.\ 8661-8674.$
- 249. Perelman, L.T. Photon migration in turbid media using path integrals / L.T. Perelman, J. Wu, I. Itzkan, M.S. Feld // Physical review letters. − 1994. − Vol. 72. − № 9. − P. 1341.
- 250. Farrell, T.J. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties in vivo / T.J. Farrell, M.S. Patterson, B. Wilson // Medical physics. -1992. Vol. 19. № 4. P. 879-888.
- 251. Bachmann, L. Fluorescence spectroscopy of biological tissues a review / L. Bachmann, D.M. Zezell, A. da C. Ribeiro, L. Gomes, A.S. Ito // Applied Spectroscopy Reviews. 2006. Vol. 41. P. 575-590.
- 252. Schaefer, P.M. NADH autofluorescence a marker on its way to boost bioenergetic research / P.M. Schaefer, S. Kalinina, A. Rueck, C.A.F. von Arnim, B. von Einem // Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology. 2019. Vol. 95. \mathbb{N} 1. P. 34-46.
- 253. Croce, A.C. Fluorescing fatty acids in rat fatty liver models / A.C. Croce, A. Ferrigno, L.G. Di Pasqua, C. Berardo, B. Mannucci, G. Bottiroli, M. Vairetti // Journal of biophotonics. -2017. Vol. $10 N_{\odot}$ 6-7. P. 905-910.
- 254. Saeed, A. The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis / A. Saeed, M. Hoekstra, M.O. Hoeke, J. Heegsma, K.N. Faber // Biochimica et biophysica acta. − 2017. − Vol. 1862. − № 5. − P. 496-512.
- 255. Katz, M.L. What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies / M.L. Katz, W.G. Robison Jr // Archives of gerontology and geriatrics. -2002. Vol. 34. № 3. Р. 169-184.
- 256. Sohal, R.S. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging / R.S. Sohal, U.T. Brunk // Advances in experimental medicine and biology. 1989. Vol. 266. P. 17-26.

- 257. Kim, Y.J. Fluorescence quenching studies on the characterization of energy generated at the NADH: quinone oxidoreductase and quinol oxidase segments of marine bacteria / Y.J. Kim, S. Mizushima, H. Tokuda // Journal of biochemistry. -1991. Vol. $109. \text{N} \cdot 4. \text{P}$. 616-621.
- 258. Takahashi, E. Effect of myoglobin inactivation on intracellular gradients of NADH fluorescence at critical mitochondrial oxygen supply / E. Takahashi, H. Endoh, M. Ishikawa, M. Kishi, K. Doi // Advances in experimental medicine and biology. 2003. Vol. 530. P.565-567.
- 259. Drozdowicz-Tomsia, K. Multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy reveals free-to-bound NADH ratio changes associated with metabolic inhibition / K. Drozdowicz-Tomsia, A.G. Anwer, M.A. Cahill, K.N. Madlum, A.M. Maki, M.S. Baker, E.M. Goldys // Journal of biomedical optics. − 2014. − Vol. 19. − № 8. − P. 86016.
- 260. Weissig, V. Mitochondrial Medicine, Volume I, Probing Mitochondrial Function / V. Weissig, M. Edeas. Springer, 2015. 485 p.
- 261. Mayevsky, A. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies / A. Mayevsky, G.G. Rogatsky // American Journal of Physiology Cell Physiology. 2007. Vol. 292. № 2. P. C615-C640.
- 262. Mottin, S. Inhibition of NADH oxidation by chloramphenicol in the freely moving rat measured by picosecond time-resolved emission spectroscopy / S. Mottin, P. Laporte, R. Cespuglio // Journal of neurochemistry. − 2003. − Vol. 84. − № 4. − P. 633-642.
- 263. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии: учебник / В. К. Плакунов, Ю. Л. Николаев. Москва: Логос, 2020. 216 с.
- 264. Vargas, G. Use of osmotically active agents to alter optical properties of tissue: effects on the detected fluorescence signal measured through skin / G. Vargas, K.F. Chan, S.L. Thomsen, A.J. Welch // Lasers in surgery and medicine. -2001. Vol. 29. No 3. P. 213-220.

- 265. Bui, A.K. Revisiting optical clearing with dimethyl sulfoxide (DMSO) / A.K. Bui, R.A. McClure, J. Chang, C. Stoianovici, J. Hirshburg, A.T. Yeh, B. Choi // Lasers in surgery and medicine. − 2009. − Vol. 41. − № 2. − P. 142-148.
- 266. Capriotti, K. Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology / K. Capriotti, J.A. Capriotti // Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology. -2012.-Vol. 5.-No 9.-P. 24.
- 267. Marren, K. Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs / K. Marren // The Physician and sportsmedicine. -2011. Vol. 39. N 2. P. 75-82.
- 268. Sivandzade, F. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe / F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo // Bio-protocol. − 2019. − Vol. 9. − № 1. − P. e3128.
- 269. The International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines on Limits of Exposure to Ultraviolet Radiation of Wavelengths Between 180 nm and 400 nm (Incoherent Optical Radiation) // Health physics. -2004. Vol. 87. № 2. P. 171-186.
- 270. The International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. ICNIRP guidelines on limits of exposure to laser radiation of wavelengths between 180 nm and 1,000 μ m // Health physicsics. 2013. Vol. 105. № 3. P. 271-295.
- 271. Pelzel, H.R. Silencing of Fem1cR3 gene expression in the DBA/2J mouse precedes retinal ganglion cell death and is associated with histone deacetylase activity / H.R. Pelzel, C.L. Schlamp, M. Waclawski, M.K. Shaw, R.W. Nickells // Investigative ophthalmology & visual science. − 2012. − Vol. 53. − № 3. − P. 1428-1435.
- 272. Rojas, J.C. Neuroprotective effects of memantine in a mouse model of retinal degeneration induced by rotenone / J.C. Rojas, J.A. Saavedra, F. Gonzalez-Lima // Brain research. 2008. № 1215. P. 208-217.
- 273. Hanslick, J.L. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system / J.L. Hanslick, K. Lau, K.K. Noguchi, J.W. Olney, C.F. Zorumski, S. Mennerick, N.B. Farber // Neurobiology of disease. -2009. Vol. 34. N 1. P. 1-10.

- 274. Yu, Z.W. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology / Z.W. Yu, P.J. Quinn // Bioscience Reports. 1994. Vol. 14. № 6. P. 259-281.
- 275. Galvao, J. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO / J. Galvao, B. Davis, M. Tilley, E. Normando, M.R. Duchen, M.F. Cordeiro // Federation of american societies for experimental biology journal. − 2014. − Vol. 28. − № 3. − P. 1317-1330.
- 276. Kirkpatrick, N.D. Endogenous Fluorescence Spectroscopy of Cell Suspensions for Chemopreventive Drug Monitoring / N.D. Kirkpatrick, C. Zou, M.A. Brewer, W.R. Brands, R.A. Drezek, U. Utzinger // Photochemistry and photobiology. − 2005. − Vol. 81. − № 1. − P. 125-134.
- 277*. **Кандурова, К.Ю.** Апробация тонкоигольного оптического зонда для регистрации изменений флуоресценции коферментов клеточного дыхания / **К.Ю. Кандурова**, Е.В. Потапова, Е.А. Жеребцов, В.В. Дрёмин, Е.С. Серёгина, А.Ю. Винокуров, А.В. Мамошин, А.В. Борсуков, Ю.В. Иванов, А.В. Дунаев //Оптика и спектроскопия. 2020. Т. 128. № 6. С. 736-745.
- 278. Meglinski, I.V. Quantitative assessment of skin layers absorption and skin reflectance spectra simulation in the visible and near-infrared spectral regions / I.V. Meglinski, S.J. Matcher // Physiological measurement. − 2002. − Vol. 23. − № 4. − P. 741.
- 279. Thueler, P. In vivo endoscopic tissue diagnostics based on spectroscopic absorption, scattering, and phase function properties / P. Thueler, I. Charvet, F. Bevilacqua, M. St Ghislain, G. Ory, P. Marquet, P. Meda, B. Vermeulen, C. Depeursinge // Journal of biomedical optics. -2003. Vol. 8. No 2. P. 495-504.
- 280. Ciobanu, D.M. Fluorophores advanced glycation end products (AGEs)-to-NADH ratio is predictor for diabetic chronic kidney and cardiovascular disease / D.M. Ciobanu, L.E. Olar, R. Stefan, I.A. Veresiu, C.G. Bala, P.A. Mircea, G. Roman // Journal of diabetes and its complications. − 2015. − Vol. 29. − № 7. − P. 893-897.
- 281. Wang, M. Autofluorescence imaging and spectroscopy of human lung cancer / M. Wang, F. Long, F. Tang, Y. Jing, X. Wang, L. Yao, J. Ma, Y. Fei, L. Chen, G. Wang, L. Mi // Applied Sciences. − 2016. − Vol. 7. − № 1. − P. 32.

- 282. Savitzky, A. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures / A. Savitzky, M.J.E. Golay // Analytical Chemistry. -1964. Vol. 36. N8. -P. 1627-1639.
- 283. Datta, R. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications / R. Datta, T.M. Heaster, J.T. Sharick, A.A. Gillette, M.C. Skala // Journal of biomedical optics. -2020. Vol. 25. N \sim 7. P. 71203.
- 284. Spott, T. Application of optical diffusion theory to transcutaneous bilirubinometry / T. Spott, L.O. Svaasand, R.E. Anderson, P.F. Schmedling // Laser-Tissue Interaction, Tissue Optics, and Laser Welding III. SPIE, 1998. Vol. 3195. P. 234-245.
- 285. Ramanujam, N. Low temperature fluorescence imaging of freeze-trapped human cervical tissues / N. Ramanujam, R. Richards-Kortum, S. Thomsen, A. Mahadevan-Jansen, M. Follen, B. Chance // Optics express. − 2001. − Vol. 8. − № 6. − P. 335-343.
- 286. Alhallak, K. Optical redox ratio identifies metastatic potential-dependent changes in breast cancer cell metabolism / K. Alhallak, L.G. Rebello, T.J. Muldoon, K.P. Quinn, N. Rajaram // Biomedical optics express. − 2016. − Vol. 7. − № 11. − P. 4364-4374.
- 287*. **Кандурова, К.Ю.** Сравнительный анализ вклада флуорофоров в спектры флуоресценции у пациентов с различными заболеваниями печени / **К.Ю. Кандурова**, Д.С. Сумин, А.В. Мамошин, Е.В. Потапова // ХХ Всероссийский Молодежный Самарский Конкурс-Конференция Научных Работ По Оптике и Лазерной Физике, Посвященный 100-Летию Со Дня Рождения Н.Г. Басова. Сборник Трудов Конференции. 2022. Р. 93-99.

- 289. Croce, A.C. Spectrofluorometric analysis of autofluorescing components of crude serum from a rat liver model of ischemia and reperfusion / A.C. Croce, A. Ferrigno, C. Berardo, G. Bottiroli, M. Vairetti, L.G. Di Pasqua // Molecules. − 2020. –Vol. 25. № 6. P. 1327.
- 290. Ercin, C.N. Oxidative stress in extrahepatic cholestasis / C.N. Ercin, S. Bagci, Z. Yesilova, A. Aydin, A. Sayal, G. Erdem // Anatolian Journal of Clinical Investigation. 2008. Vol. 2. P. 150-154.
- 291. Tiao, M.M. The role of mitochondria in cholestatic liver injury / M.M. Tiao, T.K. Lin, P.W. Wang, J.B. Chen, C.W. Liou //Chang Gung medical journal. 2009. Vol. 32. № 4. P. 346-353.
- 292. Okaya, T. Obstructive jaundice impedes hepatic microcirculation in mice / T. Okaya, K. Nakagawa, F. Kimura, H. Shimizu, H. Yoshidome, M. Ohtsuka, Y. Morita, M. Miyazaki // Hepato-gastroenterology. − 2008. − Vol. 55. − № 88. − P. 2146-2150.
- 293. Blacker, T.S. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence / T.S. Blacker, M.R. Duchen // Free Radical Biology and Medicine. 2016. Vol. 100. P. 53-65.
- 294. Grintzalis, K. Time-related alterations of superoxide radical levels in diverse organs of bile duct-ligated rats / K. Grintzalis, I. Papapostolou, S.F. Assimakopoulos, A. Mavrakis, K. Faropoulos, N. Karageorgos, C. Georgiou, E. Chroni, D. Konstantinou // Free radical research. -2009. Vol. 43. No 9. P. 803-808.
- 295. Беляев, А.Н. Эндогенная интоксикация при механической желтухе и возможности ее патогенетической коррекции / А.Н. Беляев, С.А. Беляев, С.В. Костин, Н.А. Тюрина, Е.В. Бояркин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018. Т. 157. № 9. С. 101-106.
- 296. Long, Y. Metabolomics changes in a rat model of obstructive jaundice: mapping to metabolism of amino acids, carbohydrates and lipids as well as oxidative stress / Long, X. Dong, Y. Yuan, J. Huang, J. Song, Y. Sun, Z. Lu, L. Yang, W. Yu // Journal of clinical biochemistry and nutrition. − 2015. − Vol. 57. − № 1. − P. 50-59.

- 297. Copple, B.L. Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis / B.L. Copple, H. Jaeschke, C.D. Klaassen // Seminars in Liver Disease. − 2010. − Vol. 30. − № 2. − P. 195-204.
- 298. Cichoż-Lach, H. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases / H. Cichoż-Lach, A. Michalak // World journal of gastroenterology. 2014. Vol. 20. № 25. P. 8082.
- 299. Chance, B. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals / B. Chance, B. Schoener, R. Oshino, F. Itshak, Y. Nakase // Journal of Biological Chemistry. − 1979. − Vol. 254. − № 11. − P. 4764-4771.
- 300. Quinn, K.P. Quantitative metabolic imaging using endogenous fluorescence to detect stem cell differentiation / K.P. Quinn, G.V. Sridharan, R.S. Hayden, D.L. Kaplan, K. Lee, I. Georgakoudi // Scientific reports. − 2013. − Vol. 3. − № 1. − P. 1-10.
- 301. Burkhardt, M. In vivo analysis of hepatic NADH fluorescence. In: Oxygen Transport to Tissue XX / M. Burkhardt, B. Vollmar, M.D. Menger // Springer − 1998. − № 454. − P. 83-89.
- 302. Senoo, H. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system) / H. Senoo, Y. Mezaki, M. Fujiwara // Anatomical science international. − 2017. − Vol. 92. − № 4. − P. 387-455.
- 303. Nyberg, A. Impaired release of vitamin A from liver in primary biliary cirrhosis / A. Nyberg, B. Berne, H. Nordlinder, C. Busch, U. Eriksson, L. Lööf, A. Vahlquist // Hepatology. 1988. Vol. 8. № 1. P. 136-141.
- 304. Saeed, A. Impaired hepatic vitamin A metabolism in NAFLD mice leading to vitamin A accumulation in hepatocytes / A. Saeed, P. Bartuzi, J. Heegsma, D. Dekker, N. Kloosterhuis, A.d. Bruin, J. W Jonker, B.v.d. Sluis, K.N. Faber // Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. -2021. Vol. 11 N 1. P. 309-325.
- 305. Geraghty, J.M. Liver changes associated with cholecystitis / J.M. Geraghty, R.D. Goldin // Journal of clinical pathology. − 1994. Vol. 47. − № 5. − P. 457-460.
- 306. Schreiber, R. Retinyl ester hydrolases and their roles in vitamin A homeostasis / R. Schreiber, U. Taschler, K. Preiss-Landl, N. Wongsiriroj, R.

- Zimmermann, A. Lass // Biochimica et biophysica acta. 2012. Vol. 1821 \mathbb{N} 1. P. 113-123.
- 307. Vollmar, B. An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular derangements in developing cirrhosis in rats / B. Vollmar, S. Siegmund, M.D. Menger // Hepatology. − 1998. − Vol. 27. − № 6. − P. 1544-1553.
- 308. Hou, W. Role of metabolism in hepatic stellate cell activation and fibrogenesis / W. Hou, W-K. Syn // Frontiers in Cell and Developmental Biology. -2018. $N_{\odot} 6 P$. 150.
- 309. MacMahon, H.E. A variant of obstructive biliary cirrhosis / H.E. MacMahon // The American journal of pathology. 1970. Vol. 60 № 3. P. 371.
- 310. Aronson, D.C. Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: fact or fantasy? / D.C. Aronson, R.A. Chamuleau, W.M. Frederiks, H.G. Gooszen, H.S. Heijmans, J. James // Journal of Hepatology. 1993. Vol. 18. N 1. P. 85-95.
- 311. Tag, C.G. Induction of experimental obstructive cholestasis in mice / C.G. Tag, S. Weiskirchen, K. Hittatiya, F. Tacke, R.H. Tolba, R. Weiskirchen // Laboratory animals. $-2015 \text{Vol.} 49. \cancel{N}21 \text{ suppl} \text{P.} 70-80.$
- 312. Kubo, K. Liver elasticity measurement before and after biliary drainage in patients with obstructive jaundice: a prospective cohort studya prospective cohort study / K. Kubo, H. Kawakami, M. Kuwatani, M. Nishida, K. Kawakubo, S. Kawahata, Y. Taya, Y. Kubota, T. Amano, H. Shirato. N. Sakamoto // BMC gastroenterology. −2016. − № 16. − P. 1-9.
- 313. Nakane, M. Biological effects of the oxygen molecule in critically ill patients / M.Nakane // Journal of intensive care. $-2020. \text{Vol. } 8. \cancel{N} 2. \text{P. } 95.$
- 314. Чеснокова, Н.П. Гипоксии: виды, этиология, патогенез / Н.П. Чеснокова, Г.Е. Брилль, Н.В. Полутова, М.Н. Бизенкова // Научное обозрение Медицинские науки. -2017. -№ 2. -C. 53-55.
- 315*. **Кандурова**, **К.Ю.** Возможности флуоресцентно-отражательной спектроскопии для классификации функционального состояния печени пациентов с механической желтухой / **К.Ю. Кандурова**, А.В. Мамошин, Е.В. Потапова //

- Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. -2024. Т. 5. № 367. С. 164-173.
- 316. Кореневский, Н.А. Биотехнические системы медицинского назначения: Учебник / Н.А. Кореневский, Е.П. Попечителев Старый Оскол: ТНТ, 2013.-688 с.
- 317. Кореневский, Н.А. Методология Синтеза Гибридных Нечётких Решающих Правил Для Медицинских Интеллектуальных Систем Поддержки Принятия Решений: Монография. / Н.А. Кореневский, С.Н. Родионова, И.И. Хрипина Старый Оскол: ТНТ, 2020. 472 с.
- 318. Кореневский, Н.А. Математические методы обработки медикобиологической информации. Математическая статистика: Учебник. / Н.А. Кореневский, З.М. Юлдашев – Старый Оскол: ТНТ, 2023. – 304 с.
- 319. Эфрон, Б. Нетрадиционные методы многомерного статистического анализа: Сб. статей: Пер с англ. / Предисловие Ю.П. Адлера, Ю.А. Кошевника. М.: Финансы и статистика, 1988. 263 с.
- 320. Воронцов, К.В. Комбинаторный подход к оценке качества обучаемых алгоритмов / К.В. Воронцов // Математические вопросы кибернетики. -2004. -№ 4. C. 5-36.
- 321. Гуськов, С.Ю. Интервальные доверительные оценки для показателей качества бинарных классификаторов-ROC-кривых / С.Ю. Гуськов, В.В. Лёвин // Инженерный журнал наука и инновации. 2015. Т. 3. № 39. С. 1-15.
- 322*. **Кандурова, К.Ю.** Исследование оптических свойств печени крыс и желчи человека в диапазоне длин волн 350–1300 нм / **К.Ю. Кандурова**, Д.С. Сумин, А.А. Палалов, Е.С. Серёгина, А.В. Мамошин, Е.В. Потапова // Медицинская физика. -2023. № 2. С. 53-54.
- 323*. **Кандурова, К.Ю.** Метод и устройство мультимодальной диагностики функционального состояния печени на основе флуоресцентно-отражательной спектроскопии / **К.Ю. Кандурова**, А.В. Мамошин, Е.В. Потапова // Фундаментальные и прикладные проблемы техники и технологии. − 2024. − Т. 6. − № 368. − С. 108-117.

Приложение А

Акт об использовании результатов научно-исследовательской работы в БУЗ Орловской области «ООКБ»

Департамент здравоохранения Орловской области

Бюджетное учреждение здравоохранения Орловской области «Орловская областная клиническая больница» (БУЗ Орловской области «ООКБ») Бульвар Победы, 10, г. Орел, 302028 тел./факс (4862) 45-37-79

УТВЕРЖДАЮ:

Главный врач БУЗ Орловской области «ООКБ»

В.Ф. Мурадян

М.П. клиническая объемия в объемия

AKT

об использовании результатов научно-исследовательской работы Кандуровой К.Ю. «Метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи на основе флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии»

Комиссия в составе представителей БУЗ Орловской области «ООКБ»: председатель — Мурадян В.Ф., главный врач; члены комиссии:

Мамошин А.В. – врач-хирург отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения, хирургического отделения №1, д.м.н., доцент;

Сумин Д.С. – врач-хирург хирургического отделения №2, отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения;

Адаменков Н.А. – врач-хирург хирургического отделения №1, отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения;

а также представителей $\Phi\Gamma$ БОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»: члены комиссии:

Дунаев А.В. – ведущий научный сотрудник научно-технологического центра биомедицинской фотоники, профессор кафедры приборостроения, метрологии и сертификации, д.т.н., доцент;

Потапова Е.В. – старший научный сотрудник научно-технологического центра биомедицинской фотоники, доцент кафедры приборостроения, метрологии и сертификации, к.т.н., доцент;

Кандурова К.Ю. – аспирант кафедры приборостроения, метрологии и сертификации, стажёр-исследователь научно-технологического центра биомедицинской фотоники;

составили настоящий акт о том, что в период с 1 сентября 2020 г по 31 мая 2024 г. на базе отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения БУЗ Орловской области «ООКБ» в рамках диссертационного исследования Кандуровой К.Ю. проводилась апробация научно-

исследовательской работы «Метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи на основе флуоресцентной и диффузно-отражательной спектроскопии».

Разработанный метод дифференциального анализа функционального состояния печени, основанный на регистрации спектральных характеристик паренхимы с использованием мультимодального устройства флуоресцентно-отражательной спектроскопии, нашёл применение при диагностике больных с синдромом механической желтухи и результативно использовался на базе отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения БУЗ Орловской области «ООКБ».

Разработанный метод апробацию прошёл при диагностике функционального состояния печени 40 пациентов отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения с патологиями гепатопанкреатодуоденальной зоны, вызвавшими механическую желтуху. Полученная дополнительная диагностическая информация регистрировалась интраоперационно и использовалась для прогнозирования тяжести и динамики послеоперационного состояния пациентов после билиарной декомпрессии. Применение разработанного метода позволило существенно повысить достоверность диагностики послеоперационного состояния синдромом механической желтухи (чувствительность - не менее 0,85, специфичность - не менее 0,89).

Председатель комиссии:

Члены комиссии:

В.Ф. Мурадян

А.В. Мамошин

Д.С. Сумин

Н.А. Адаменков

А.В. Дунаев

Е.В. Потапова

К.Ю. Кандурова

Приложение Б

Акт о внедрении результатов НИР в ООО НПП «ЛАЗМА»



Общество с ограниченной ответственностью Научно-производственное предприятие

«ЛАЗМА»

Юридический адрес: 125252, г. Москва ул. Куусинена, д. 11 корп. 1, кв. 33 Фактический и почтовый адрес: 123458, г. Москва, ул. Твардовского, д. 8, стр. 1 офис 104 E-mail: lazma@plusnet.ru Тел.: (495) 780-92-30, 780-92-31, 8-901-535-06-15

AKT

о внедрении результатов НИР

В период с 01.09.2020 по 01.03.2024 сотрудниками ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» – аспирантом кафедры приборостроения, метрологии сертификации (ПМиС), стажером-исследователем технологического центра (НТЦ) биомедицинской фотоники Кандуровой под руководством старшего научного сотрудника биомедицинской фотоники, доцента кафедры ПМиС, к.т.н. Потаповой Е.В. проведена научно-исследовательская работа по апробации и внедрению результатов исследований по теме диссертационной работы Кандуровой К.Ю. «Метод дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи на основе флуоресцентной диффузно-отражательной спектроскопии» производственной базе ООО НПП «ЛАЗМА».

В ходе выполнения работы отмечено, что разработанные коллективом представителей кафедры ПМиС и НТЦ биомедицинской фотоники ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» метод и устройство дифференциального анализа функционального состояния печени пациентов с синдромом механической желтухи, основанные на применении методов флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии диффузного и специально разработанного волоконно-оптического зонда с последующей математической обработкой данных, позволяет повысить достоверность и информативность оценки динамики состояния пациентов послеоперационном (чувствительность 0,85, специфичность -0,89обосновать специализированные медико-технические требования составу

",1A3MA"

электронного блока устройства, геометрии волоконно-оптического зонда и виду регистрируемых спектральных данных, тем самым возможности применения медицинских диагностических выпускаемых ООО НПП «ЛАЗМА».

Все виды работ по апробации и внедрению указанных метода и устройства выполнены ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» и ООО НПП «ЛАЗМА» на безвозмездной основе и без финансовых расчётов.

УТВЕРЖДАЮ: Генеральный директор OOO HIII «JA3MA» K.T.H.AZMA" Ltu

Руководитель работ от ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» с.н.с., к.т.н., доцент кафедры ПМиС

Е.В. Потапова

Исполнитель:

стажер-исследователь

НТЦ биомедицинской фотоники

К.Ю. Кандурова

Заместитель генерального директора

С.А. Равчеев

ведущий инженер

От ООО НПП «ЛАЗМА»:

H. Сесин