

# СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВКЛАДА ФЛУОРОФОРОВ В СПЕКТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ

К.Ю. Кандурова<sup>1</sup>, Д.С. Сумин<sup>1,2</sup>, А.В. Мамошин<sup>1,2</sup>, Е.В. Потапова<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Научно-технологический центр биомедицинской фотоники,  
Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева  
(302026, г. Орёл, ул. Комсомольская, 95)*

*<sup>2</sup>Орловская областная клиническая больница  
(302028, г. Орёл, б-р Победы, 10)*

В работе описаны результаты исследования функционального состояния печени методом флуоресцентной спектроскопии у пациентов с различными заболеваниями. Проводится сравнение результатов измерений флуоресценции у пациентов с механической желтухой и пациентов с заболеваниями, не связанных с закупоркой желчевыводящих путей. Для анализа спектров использовался метод деконволюции. При разложении спектров обнаружена разница во вкладе основных флуорофоров (NADH и билирубин), характеризующих функциональные изменения паренхимы печени. Предложенный подход может быть использован для дальнейшей разработки диагностического критерия оценки печеночной дисфункции.

**Ключевые слова:** оптическая биопсия, механическая желтуха, флуоресцентная спектроскопия.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Диагностика и лечение заболеваний органов гепатопанкреатодуоденальной зоны, осложнённых обструкцией желчевыводящих путей, остаётся актуальной проблемой медицины. Синдром механической желтухи развивается при нарушении оттока желчи по желчевыводящим путям в двенадцатиперстную кишку. Непроходимость желчевыводящей системы может быть вызвана различными причинами, в том числе желчнокаменной болезнью, воспалительными процессами, а также доброкачественными и злокачественными новообразованиями органов гепатопанкреатодуоденальной зоны [1].

Блок оттока желчи вызывает значительные нарушения обменных процессов, изменения общей и локальной гемодинамики, приводящие к функциональным и морфологическим нарушениям печени и других жизненно

важных органов [2]. Прогрессирование холестаза при отсутствии своевременного лечения ведет к печеночной недостаточности. Для выбора способа дальнейшей терапии, прогнозирования течения заболевания и достижения лучших результатов лечения, важно иметь представление об изменениях, происходящих в паренхиме печени вследствие печеночной недостаточности [3]. Для оценки тяжести печеночной дисфункции используются клинические и биохимические показатели, а также прогностические шкалы и системы, но они дают приблизительные косвенные результаты, что определяет актуальность поиска дополнительных объективных критериев и разработки технологий для оценки функционального состояния паренхимы печени в режиме реального времени.

Перспективным направлением оценки функционального состояния тканей является метод флуоресцентной спектроскопии (ФС), обладающий высокой чувствительностью к метаболическим изменениям в ткани. Этот метод дает информацию о содержании основных флуорофоров, что позволяет оценить метаболизм печени *in vivo* [4,5]. Кроме того, измерения флуоресценции можно технически осуществить, во время выполнения антеградной декомпрессии желчных протоков, с помощью оптических зондов малого диаметра.

Таким образом, целью работы явилось *in vivo* исследование функционального состояния паренхимы печени при синдроме механической желтухи методом флуоресцентной спектроскопии и оценка вклада основных флуорофоров тканей в состав регистрируемых спектров флуоресценции.

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследования проводились на базе хирургического отделения Орловской областной клинической больницы и были одобрены этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол №14 от 24.01.2019). Все пациенты подписывали информированное согласие на добровольное участие в исследовании.

В работе приняли участие 8 пациентов с синдромом механической желтухи: 5 пациента с холедохолитиазом и 3 пациента со злокачественными новообразованиями. Оптические измерения проводились во время проведения антеградной декомпрессии желчевыводящих путей под ультразвуковым и рентгенотелевизионным контролем. В качестве группы сравнения были использованы результаты флуоресцентной спектроскопии паренхимы печени у больных (8 пациентов) без механической желтухи, полученные во время

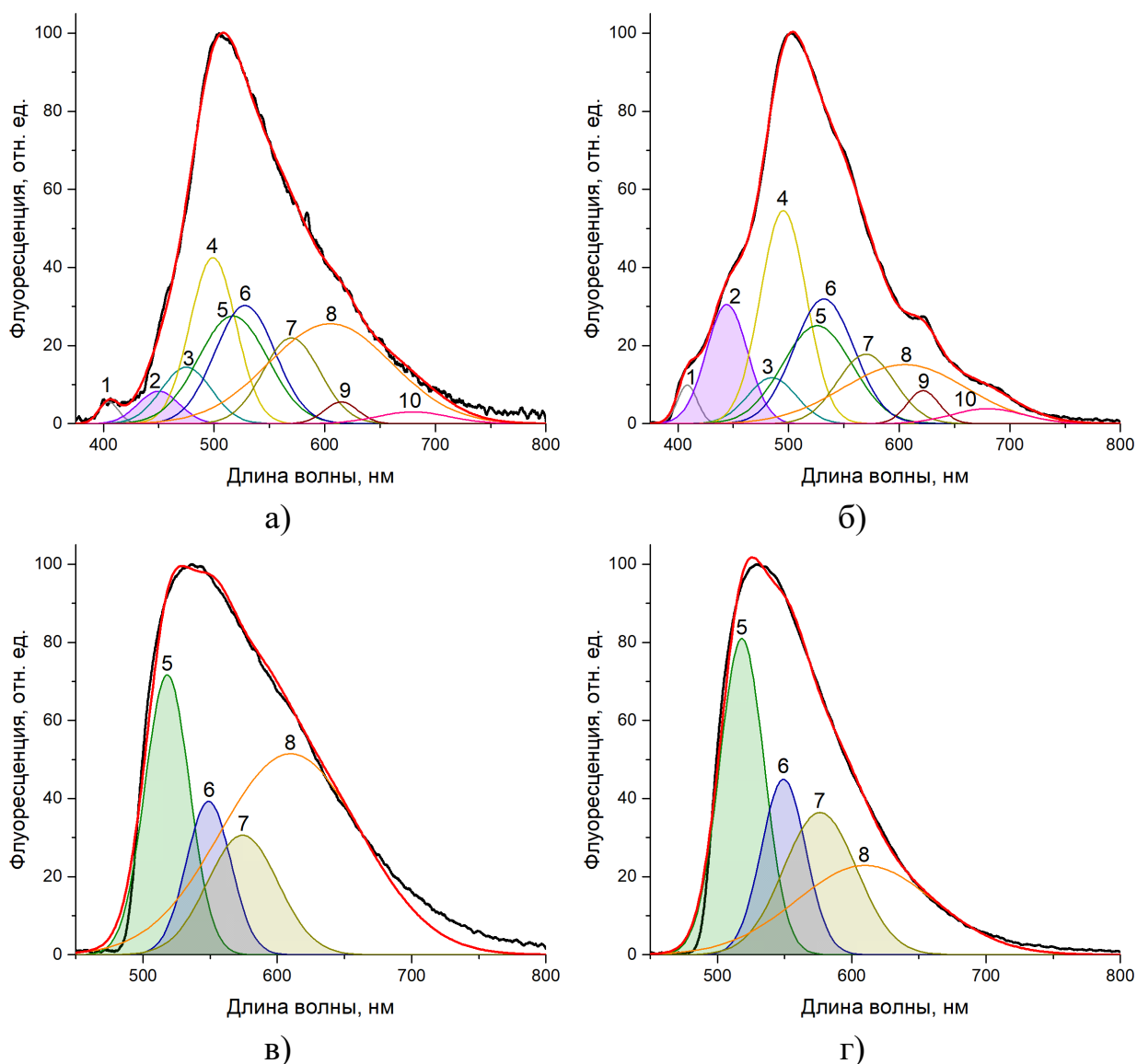
проведения пункционной биопсии очаговых образований печени. Данные спектры флуоресценции зарегистрированы в интактных тканях печени по ходу движения тонкоигольного зонда к очагу [5].

Измерения проводились с помощью специально разработанной установки для оптической биопсии. В качестве источников монохроматического излучения использовались светодиод на длине волны 365 нм и лазерный диод на длине волны 450 нм. Для регистрации спектров флуоресценции использовался ПЗС-спектрометр FLAME T-VIS-NIR-ES (Ocean Optics, США), регистрирующий спектры в диапазоне 350-1000 нм. Для ослабления обратного рассеянного излучения от монохроматических источников перед спектрометром были установлены отсекающие фильтры 400 нм и 495 нм (Thorlabs Inc., США). Для доставки излучения от источников к тканям и сбора вторичного оптического излучения от тканей использовался специально разработанный оптический зонд малого диаметра.

Спектры флуоресценции анализировались в программной среде OriginPro. Обработка данных включала нормирование спектров в масштабе 0-100, сглаживание фильтром Савицкого-Голая и процедуру деконволюции путем итерационного нелинейного подбора на основе алгоритма Левенберга-Марквардта комбинаций гауссовых кривых, отражающих вклад характерных флуорофоров ткани печени в общий сигнал [6, 7]. Качество сходимости кривых проверялось по значению коэффициента детерминации.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

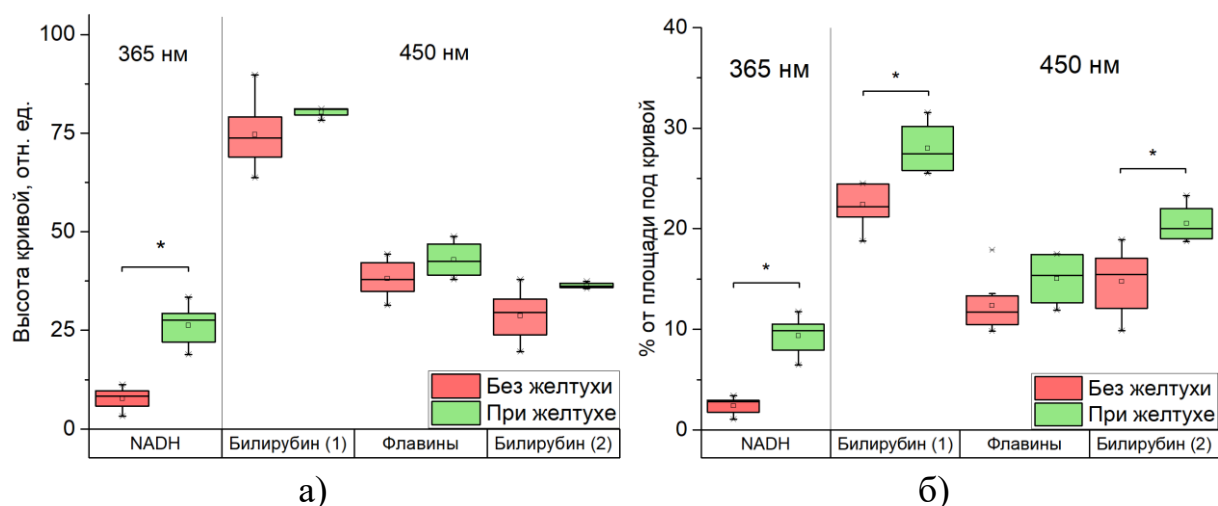
На рисунке 1 показаны примеры результатов разложения спектров флуоресценции. Анализируемыми параметрами являлись высоты гауссовых кривых, площади под гауссовыми кривыми и их относительный вклад в общую площадь под кривой спектра. На графиках цветом под кривыми отмечены следующие флуорофоры: NADH (445 нм), флавины (530-550 нм) и билирубин (517-521 и 565-575 нм). Выбор данных кривых и, следовательно, целевых флуорофоров, был обоснован целью изучения метаболического состояния ткани печени при механической желтухе.



1 – коллаген; 2 – NADH; 3 – жирные кислоты; 4 – витамин А;  
 5, 7 – билирубин; 6 – флавины; 8 – липофусцины; 9 – протопорфирин IX;  
 10 – производные порфирина

Рис. 1. Примеры деконволюции спектров флуоресценции тканей печени для возбуждающего излучения на длине волны 365 нм: а) группа сравнения без механической желтухи, б) пациенты с механической желтухой; и 450 нм: в) группа сравнения, г) пациенты с механической желтухой

Анализ параметров кривых (рисунок 2) показал статистически значимое преобладание NADH для обоих параметров (высота и площадь) в спектрах, возбужденных излучением на длине волны 365 нм. Анализ кривых, полученных для спектров, возбужденных излучением на длине волны 450 нм, показал характерное увеличение процента площади обеих кривых билирубина в группе пациентов с механической желтухой.



\* Статистические значимые различия для  $p < 0,05$

Рис. 2. Сравнение параметров кривых основных флуорофоров: а) высота гауссовых кривых, б) процент площади под гауссовыми кривыми флуорофоров в общей площади под кривой спектра флуоресценции

Полученные результаты отражают метаболические изменения, связанные со сдвигами в содержании основных флуорофоров тканей печени. Преобладание NADH может указывать на нарушения утилизации кислорода и, следовательно, гипоксию, возникающую в тканях из-за тяжелой дисфункции гепатоцитов, которая в свою очередь приводит к печеночной недостаточности. Также у больных с синдромом механической желтухи наблюдается значительное накопление билирубина из-за препятствия для оттока желчи из печеночных ацинусов и её накопления в тканях печени.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, описанные представленные свидетельствуют о возможности применения метода ФС для получения данных о функциональном состоянии паренхимы печени. Уровни NADH и билирубина могут быть использованы для дальнейшего изучения как возможные диагностические и прогностические маркеры течения печеночной недостаточности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта №21-15-00325.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В.И. Подолужный, Механическая желтуха: принципы диагностики и современного хирургического лечения // *Фундаментальная и клиническая медицина*, 2018, т. 3, № 2, с. 82-92.
2. T.C. See, Acute biliary interventions // *Clinical Radiology*, 2020, v. 75, №. 5, p. 398.e9-398.e18.
3. S. Lukmonov, Minimally invasive biliary decompression methods in management of obstructive jaundice of malignant etiology // *HPB*, 2018, v. 20 (S2), p. S730.
4. K. Kandurova, V. Dremin, E. Zherebtsov et al. Fiber-optic system for intraoperative study of abdominal organs during minimally invasive surgical interventions // *Applied Sciences*, 2019, v. 9, № 2, 217.
5. V. Dremin, E. Potapova, E. Zherebtsov et al., Optical percutaneous needle biopsy of the liver: a pilot animal and clinical study // *Scientific Reports*, 2020, v. 10, 14200.
6. A.C. Croce, A. Ferrigno, G. Santin et al. Autofluorescence of liver tissue and bile: organ functionality monitoring during ischemia and reoxygenation // *Lasers in surgery and medicine*, 2014, v. 45, № 5, p. 412-421.
7. A.C. Croce, A. Ferrigno, G. Bottiroli et al. Autofluorescence-based optical biopsy: An effective diagnostic tool in hepatology // *Liver International*, 2018, v. 38, № 7, p. 1160-1174.

# COMPARATIVE ANALYSIS OF FLUOROPHORE CONTRIBUTION TO FLUORESCENCE SPECTRA IN PATIENTS WITH VARIOUS LIVER DISEASES

**K.Y. Kandurova<sup>1</sup>, D.S. Sumin<sup>1,2</sup>, A.V. Mamoshin<sup>1,2</sup>, E.V. Potapova<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Research and Development Center of Biomedical Photonics,*

*Orel State University named after I.S. Turgenev*

*(Komsomolskaya st., 95, Orel, Russia, 302026)*

*<sup>2</sup>Orel Regional Clinical Hospital*

*(Pobedy blvd., 10, Orel, Russia, 302028)*

The article describes the results of liver functional state study by fluorescence spectroscopy in patients with various diseases. We compare results of fluorescence measurements in patients with obstructive jaundice and patients with diseases not related to biliary tract obstruction. To analyze spectra we used deconvolution method. The difference in contribution of main fluorophores (NADH and bilirubin) characterizing functional changes of liver tissues was revealed. The proposed approach can be used for further development of diagnostic criteria for assessment of hepatic dysfunction.

**Keywords:** optical biopsy, obstructive jaundice, fluorescence spectroscopy.