

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

---

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

Корнева Надежда Владимировна

**Оптическая спектроскопия для интраоперационной диагностики  
при лазерных хирургических вмешательствах в урологии**

Специальность:

1.3.6. Оптика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

доктор физико-математических наук, профессор

Фадеев Виктор Владимирович,

доктор физико-математических наук

Ширшин Евгений Александрович

Москва – 2026

## Оглавление

<i>Список сокращений</i> .....	5
<i>Введение</i> .....	6
<b><i>Глава 1. Современное состояние исследований в области оптической спектроскопии для интраоперационной диагностики при лазерных хирургических вмешательствах в урологии</i></b> .....	<b>17</b>
1.1. Задачи интраоперационной диагностики в урологии, актуальные для применения оптической спектроскопии с эндогенным контрастом .....	17
1.2. Оптические свойства биотканей .....	20
1.2.1. Теория переноса излучения .....	20
1.2.2. Основные хромофоры биотканей.....	23
1.2.3. Основные флуорофоры биотканей .....	25
1.3. Навигация во время лазерного дробления почечных камней .....	28
1.3.1. Лазерная литотрипсия как метод лечения мочекаменной болезни .	28
1.3.2. Клинические методы определения типа мочевого камня .....	31
1.3.3. Методы оптической спектроскопии для детектирования типа ткани во время лазерной литотрипсии .....	34
1.4. Интраоперационная диагностика рака мочевого пузыря .....	35
1.4.1. Структура тканей мочевого пузыря.....	35
1.4.2. Патологические процессы в тканях мочевого пузыря.....	37
1.4.3. Клинические методы для интраоперационной диагностики рака мочевого пузыря .....	40
1.4.4. Обзор экспериментальных методов интраоперационного детектирования рака с помощью методов оптической спектроскопии ....	43
1.5. Выводы.....	45
<b><i>Глава 2. Оптическая спектроскопия для интраоперационной диагностики во время лазерного дробления почечных камней</i></b> .....	<b>47</b>
2.1. Объекты и методы исследования .....	48

2.1.1. Экспериментальная установка .....	48
2.1.2. Дизайн исследования.....	51
2.1.3. Измерения <i>ex vivo</i> .....	53
2.1.4. Обработка спектров диффузного отражения.....	53
2.1.5. Классификация.....	55
2.2. Результаты .....	57
2.2.1. Измерения спектров СДО от мягкой ткани и камней <i>ex vivo</i> .....	57
2.2.2. Измерения спектров диффузного отражения во время лазерной литотрипсии.....	58
2.2.3. Оценка эффективности моделей классификации.....	61
2.2.3. Классификация наличия хирургических инструментов.....	66
2.3. Потенциальные области применения разработанной методики и сравнение с существующими аналогами.....	67
2.4. Выводы.....	72

***Глава 3. Флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия диффузного отражения для анализа состава и плотности почечных камней *in situ*. 74***

3.1. Объекты и методы исследования .....	74
3.1.1. Объекты исследования .....	74
3.1.2. Методы исследования .....	75
3.1.3. Построение математических моделей для определения состава и плотности камней.....	79
3.2. Результаты .....	80
3.2.1. Измерения трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции и спектров СДО .....	80
3.2.2. Оценка эффективности разработанных моделей .....	83
3.3. Сравнение полученных результатов с другими исследованиями .....	85
3.4. Гипотезы о природе флуоресценции от почечных конкрементов.....	86
3.5. Выводы.....	88

<b>Глава 4. Детектирование здоровой и опухолевой тканей мочевого пузыря в условиях операции с использованием методов оптической спектроскопии.....</b>	<b>89</b>
4.1. Объекты и методы исследования .....	89
4.1.1. Экспериментальная установка .....	89
4.1.2. Дизайн исследования.....	92
4.1.3. Обработка оптических спектров .....	96
4.1.4. Классификация.....	99
4.2. Результаты .....	99
4.2.1. Спектроскопия диффузного отражения .....	99
4.2.2. Флуоресцентная спектроскопия в видимом диапазоне .....	103
4.2.3. БИК флуоресценция и спектроскопия КР .....	105
4.3. Сравнительный анализ классификаторов, использующих разные комбинации признаков .....	109
4.4. Сравнение разработанного метода с другими исследованиями .....	111
4.5. Использование спектроскопии диффузного отражения для оценки оксигенации и содержания гемоглобина других тканей .....	113
4.6. Выводы.....	117
<b>Заключение.....</b>	<b>119</b>
<b>Благодарности.....</b>	<b>121</b>
<b>Публикации автора по теме диссертации.....</b>	<b>122</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>124</b>

## **Список сокращений**

БИК – ближний инфракрасный диапазон

УФ – ультрафиолетовый

СДО – спектроскопия диффузного отражения

КР – комбинационное рассеяние

МКБ – мочекаменная болезнь

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФДД – фотодинамическая диагностика

ТПИ – теория переноса излучения

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ОЩЖ – околощитовидная железа

ЩЖ – щитовидная железа

## **Введение**

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Оптические методы находят широкое применение в исследовании различных живых систем, в том числе и организма человека. Одним из актуальных направлений в данной области является оптическая интраоперационная диагностика, которая позволяет хирургу повысить эффективность и безопасность проведения операций и получать дополнительную информацию о локализации и свойствах патологических объектов во время хирургического вмешательства. Так, оптические методы спектроскопии уже широко применяются для оптической навигации при удалении опухолевых тканей различных органов, детектирования нервов и других задачах [1].

При этом ряд методов оптической навигации находит применения в задачах урологии. Большинство урологических операций являются эндоскопическими, тем самым существует возможность производить сбор и регистрацию оптического сигнала при помощи оптоволоконного зонда и использовать молекулярные методы спектроскопии, которые обладают высокой молекулярной специфичностью, для диагностики в режиме реального времени.

Одними из самых распространенных и социально значимых урологических заболеваний, для которых показано хирургическое вмешательство в качестве метода лечения, являются мочекаменная болезнь (МКБ) и рак мочевого пузыря. МКБ по различным оценкам в мире страдают от 3 до 10% населения, и она часто встречается у людей трудоспособного возраста. Одним из самых эффективных методов лечения мочекаменной болезни является лазерная литотрипсия, подразумевающая разрушение камней в различных отделах мочевыводящих путей лазерным инфракрасным (ИК) излучением. При лазерном дроблении возможно смещение камня за

пределы области облучения, доступной рабочему волокну, из-за чего возникает вероятность повреждения слизистой оболочки. Таким образом актуальной задачей является разработка методов, классифицирующих конкременты и окружающие мягкие ткани во время процедуры лазерной литотрипсии.

В настоящее время существуют автоматические системы с обратной связью для классификации почечных камней и мягких тканей во время операции, основанных на регистрации спектров флуоресценции [2]. Однако стоит отметить, что для данных систем необходим дополнительный источник излучения и, кроме того, они не получили широкого распространения в клинике. Другим перспективным оптическим методом, который может применяться для определения типа ткани во время лазерной литотрипсии, является спектроскопия диффузного отражения (СДО). Реализация данного метода относительно проста, так как он не требует дополнительных источников света, поскольку может быть использован осветитель самого эндоскопа. Спектры отражения от почечных камней и мягких тканей различаются в видимой области из-за присутствия гемоглобина в слизистой оболочке.

Кроме того, известно, что почечные камни различаются по химическому составу и морфологическим характеристикам, из-за чего хирургам приходится вручную корректировать параметры лазера для эффективной фрагментации. Поэтому актуальной задачей является разработка новых методов, способных определять состав почечных камней интраоперационно. Общеизвестные методы лабораторного анализа состава конкрементов, такие как рентгеноструктурный анализ, ИК Фурье спектроскопия и сканирующая электронная микроскопия не подходят для решения данной задачи. Для этих целей возможно применение методов оптической спектроскопии, реализуемых через оптическое волокно, таких как спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР), флуоресцентная спектроскопия (в том

числе измерение трехмерных матриц возбуждения эмиссии-флуоресценции), спектроскопия диффузного отражения [3,4].

Еще одним серьезным урологическим заболеванием является рак мочевого пузыря. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения в структуре онкологических заболеваний рак мочевого пузыря занимает 6-е место в мире среди мужчин. Определение статуса хирургического края без взятия биопсии позволит снизить риски для пациента, сократить длительность операции и уменьшить вероятность неполного удаления опухоли. Основные методы молекулярной спектроскопии, которые используются для диагностики рака в лабораторных и клинических условиях и совместимая с хирургическими оптическими волокнами – это спектроскопия комбинационного рассеяния в области высоких волновых чисел [5], флуоресцентная спектроскопия [6], спектроскопия диффузного отражения света [7]. Также было показано *ex vivo*, что комбинация нескольких спектроскопических методов способна повысить чувствительность и специфичность обнаружения опухолевой ткани. Однако, насколько известно из литературы, попыток детекции рака мочевого пузыря *in vivo* с использованием нескольких методик оптической спектроскопии в сочетании с хирургическим оптическим волокном до сих пор не предпринималось.

Поставленные задачи легли в основу определения ключевых направлений исследования в представленной работе.

### **Цель и задачи работы**

Цель работы состоит в разработке методов интраоперационной диагностики при лазерных хирургических вмешательствах в урологии с использованием методов оптической спектроскопии с эндогенным контрастом.

Для достижения указанной цели в рамках диссертационной работы были поставлены и решены следующие задачи:

1. Исследовать оптический отклик слизистых тканей и почечных камней в различных отделах мочевыделительной системы с помощью спектроскопии диффузного отражения.
2. На основе данных спектроскопии диффузного отражения построить модель классификации типа ткани (камень или ткань слизистой), находящейся перед оптоволоконном во время процедуры лазерной литотрипсии.
3. С помощью спектроскопии диффузного отражения и флуоресцентной спектроскопии (измерение трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции) в условиях, приближенных к операционным, исследовать оптический отклик почечных камней и разработать модель для определения химического состава конкремента и его плотности по его оптическим свойствам.
4. Исследовать *in vivo* оптический отклик от опухолевой и здоровой тканей мочевого пузыря с использованием мультимодальной оптической спектроскопии: флуоресцентной спектроскопии в видимом и ИК-диапазоне, спектроскопии диффузного отражения света (СДО) и спектроскопию комбинационного рассеяния (КР).
5. Построить классификационную модель на основе измеренных оптических спектров, выявить признаки, которые соответствуют известным онкологическим маркерам, и оценить точность определения раковой и здоровой ткани.

### **Объект и предмет исследования**

Объектом исследования являются ткани и образования мочевыделительной системы человека (слизистая оболочка мочевого пузыря в норме и при раке, почечные конкременты различных типов).

Предметом исследования являются методы классификации здоровых и патологически изменённых тканей мочевыделительной системы (слизистая оболочка/почечный конкремент, здоровая слизистая оболочка/рак мочевого пузыря), а также методы определения типа почечных конкрементов на основе оптической спектроскопии.

### **Методология исследования**

Для решения задач использовались специализированные экспериментальные стенды с различными методами оптической спектроскопии.

При измерениях во время лазерной литотрипсии применялся метод СДО в видимом диапазоне (400-700 нм), а также производилась разметка данных на основе анализа видеопоследовательности с камеры эндоскопа.

Для *ex vivo* исследования почечных камней различного состава применялась установка, совмещающая флуоресцентную спектроскопию (трехмерные матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции, диапазон сканирования 280-480 нм) и СДО (400-700 нм). Состав камней верифицировался методом ИК-Фурье спектроскопии. Референсным методом для определения плотности являлась компьютерная томография.

При измерениях тканей мочевого пузыря *in vivo* использовалась мультимодальная установка с волоконным зондом, объединяющая четыре метода: СДО (400-700 нм), флуоресцентную спектроскопию в видимом и ИК-диапазонах, а также спектроскопию комбинационного рассеяния в области 2800-3600 см<sup>-1</sup>.

Для построения моделей классификации типа ткани и состава почечных камней применялись методы машинного обучения. Обработка данных выполнена на языке программирования Python.

### **Научная новизна работы**

- 1) Впервые на основе СДО предложен способ определения типа ткани (слизистая/почечный камень) перед оптоволоконном, который применим во время лазерной литотрипсии и может быть встроен непосредственно в лазерный аппарат, с помощью которого осуществляется операция.
- 2) Впервые был разработан метод определения состава почечных конкрементов на основе одновременного использования СДО и флуоресцентной спектроскопии (трехмерные матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции), который совместим с волоконным зондом.
- 3) Объяснен механизм формирования флуоресценции почечных камней на основе модели гетерогенной системы флуорофоров.
- 4) Впервые был исследован оптический отклик здоровых и опухолевых тканей мочевого пузыря *in vivo* одновременно при помощи нескольких методов оптической спектроскопии: флуоресцентной спектроскопии в видимом и ИК-диапазонах, СДО и спектроскопии КР.
- 5) Впервые создана модель для зондового определения опухолевой и здоровой тканей мочевого пузыря *in vivo*, которая использует спектры СДО и интенсивность флуоресценции в видимом диапазоне.
- 6) Впервые установлен механизм формирования флуоресцентного отклика в видимом диапазоне от опухолевой ткани мочевого пузыря *in vivo*.

### **Фундаментальная значимость**

Фундаментальная значимость полученных результатов состоит в развитии методов оптической интраоперационной диагностики в области урологии, а именно в интраоперационном обнаружении рака мочевого пузыря, детектировании различных типов тканей *in vivo*.

## **Практическая значимость**

Практическая значимость полученных результатов состоит в том, что разработанные алгоритмы интраоперационного определения типа ткани перед оптоволоконном на основе методов оптической спектроскопии могут быть внедрены в лазерные аппараты, предназначенные для использования в различных областях открытой и эндоскопической хирургии.

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

1. Анализ спектров оптической плотности в диапазоне 400-700 нм позволяет дискриминировать почечный камень и мягкую ткань во время лазерной литотрипсии с быстродействием 10 мс и точностью 93% для камня и мягкой ткани.
2. Комбинация спектроскопии диффузного отражения в диапазоне 450-600 нм и измерения трехмерных спектров возбуждения-эмиссии флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}}=280-480$  нм с шагом 20 нм,  $\lambda_{\text{эм}}=500-800$  нм) позволяет определять один из трех типов почечных конкрементов (урат, оксалат, гидроксиапатит) *ex vivo* со средней точностью определения каждого класса 92% (f1-мера), а также процентное содержание данных веществ с относительной ошибкой 11%, 27% и 24% для урата, оксалата и гидроксиапатита, а также плотность со средней абсолютной ошибкой 290 единиц Хаунсфилда. При этом механизм формирования флуоресценции связан с наличием окисленных органических молекул в минеральной матрице конкремента, образующих гетерогенную систему флуорофоров.
3. Модель на основе логистической регрессии, использующая в качестве входных параметров интенсивность флуоресценции при возбуждении на длине волны 405 нм, а также степень оксигенации, полный гемоглобин и параметры светорассеяния, оцененные из спектров эффективной оптической плотности, позволяет определить здоровую и раковую ткань

мочевого пузыря *in vivo* с точностями 78 и 91% соответственно. При этом пониженный сигнал флуоресценции в области опухоли связан не с поглощением накачки гемоглобином, а с изменением вклада клеток эпителия в детектируемый сигнал.

### **Достоверность результатов**

Достоверность результатов подтверждается их повторяемостью и воспроизводимостью, достигнутыми благодаря применению современного лабораторного оборудования и корректных методов анализа данных. Основные положения диссертационной работы прошли апробацию на всероссийских и международных конференциях и опубликованы в рецензируемых научных журналах.

### **Апробация результатов**

Основные результаты диссертационной работы были представлены соискателем на научных семинарах кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на российских и международных научных конференциях.

Результаты диссертационной работы были представлены в 8 докладах на российских и международных конференциях: Всероссийская научная конференция с международным участием «Невская фотоника» (Санкт-Петербург, Россия, 2023, 2025), Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Флуоресценция для биомедицины» (Нижний Новгород, Россия, 2024), Международный молодежный научный форум «РадМед» (Москва, Россия, 2025), Всероссийская научная конференция МФТИ (Москва, Россия, 2023), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов (Москва, Россия, 2021, 2023, 2024).

## **Публикации**

Основные результаты по теме диссертации изложены в 5 печатных изданиях, в том числе в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова. Список работ автора приведен в конце диссертации перед списком литературы.

## **Личный вклад автора**

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены автором лично либо при его определяющем участии. Основная часть результатов была получена в лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники Физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Публикации по теме диссертационной работы были написаны при определяющем участии автора.

## **Структура диссертационной работы**

Диссертационная работа состоит из введения, четырёх глав, заключения и списка цитированной литературы. Работа содержит 133 страницы, 43 иллюстрации, 4 таблицы и 126 библиографических ссылок.

## **Краткое содержание диссертационной работы**

Во Введении описывается актуальность и степень разработанности темы диссертационного исследования, формулируются цели и задачи работы, её научная новизна, теоретическая и практическая значимость, обоснованность и достоверность полученных результатов, формулируются положения, выносимые на защиту, приводятся сведения о публикациях, апробации результатов и структуре диссертации.

В Главе 1 представлен обзор современного состояния исследований в области интраоперационной оптической диагностики в урологии. Рассмотрены ключевые клинические задачи, такие как оптическая навигация при лазерной литотрипсии и интраоперационная диагностика рака мочевого пузыря, для которых перспективно применение методов спектроскопии с эндогенным контрастом. Проанализированы основные оптические свойства биотканей (хромофоры и флуорофоры) и мочевых конкрементов. Показано, что существующие сертифицированные оптические методы имеют ограничения по специфичности, необходимости введения контрастных веществ или невозможности количественной оценки молекулярных параметров тканей. Методы оптической молекулярной спектроскопии (спектроскопия диффузного отражения, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия КР), реализуемые через оптоволоконные зонды, позволяют получать объективную информацию о составе и состоянии тканей в реальном времени и потенциально могут быть интегрированы в стандартное хирургическое оборудование.

В Главе 2 предложен метод на основе спектроскопии диффузного отражения для создания системы оптической обратной связи, способной в режиме реального времени определять тип объекта (почечный конкремент или слизистая ткань) перед хирургическим волокном во время лазерной литотрипсии. На основе спектров, зарегистрированных в ходе 22 операций, разработаны модели машинного обучения на основе логистической регрессии и линейного дискриминантного анализа. Система продемонстрировала высокую точность: 93% для распознавания мягкой ткани и 93% для конкрементов, включая сложные случаи с кровотечением на фоне камня и коагулированной тканью. Разработанный алгоритм интегрирован в коммерческий лазерный аппарат, что позволяет автоматически прекращать подачу излучения при наведении на слизистую, повышая безопасность процедуры.

В Главе 3 изучен потенциал комбинации спектроскопии диффузного отражения и флуоресцентной спектроскопии (измерение трёхмерных матриц возбуждения-эмиссии) для интраоперационного определения химического состава почечных конкрементов (уратных, оксалатных, гидроксипатитовых) в условиях, приближенных к клиническим. На основе *ex vivo* измерений образцов камней разработана многоклассовая модель классификации. Показано, что совместное использование данных СДО и флуоресценции повышает точность определения типа камня (f1-мера 92%) по сравнению с использованием только флуоресцентных данных (87%). Метод совместим с одножильным хирургическим волокном и может быть адаптирован для использования во время эндоскопических операций, предоставляя хирургу информацию для настройки параметров лазера в реальном времени.

В Главе 4 проведена оценка эффективности мультимодального подхода, сочетающего спектроскопию диффузного отражения, флуоресцентную спектроскопию в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах, а также спектроскопию комбинационного рассеяния, для интраоперационного определения раковой и здоровой ткани мочевого пузыря *in vivo*. Показана возможность применения метода СДО для оценки жизнеспособности тканей во время операции по рассчитываемой из спектров оптической плотности степени оксигенации. Были проведены измерения здоровых и опухолевых тканей мочевого пузыря *in vivo* у 21 пациента всеми перечисленными выше методами оптической спектроскопии. Наибольший диагностический вклад внесли СДО (оценка общего гемоглобина, оксигенации и рассеяния) и флуоресцентная спектроскопия в видимом диапазоне при возбуждении на длине волны 405 нм. Комбинация данных методов позволила достичь чувствительности 78% и специфичности 91% для обнаружения раковой ткани.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в данной работе.

## **Глава 1. Современное состояние исследований в области оптической спектроскопии для интраоперационной диагностики при лазерных хирургических вмешательствах в урологии**

*В главе используются материалы, опубликованные в статье [A1].*

### **1.1. Задачи интраоперационной диагностики в урологии, актуальные для применения оптической спектроскопии с эндогенным контрастом**

Методы оптической спектроскопии находят широкое применение в клинической практике, в том числе в области интраоперационной диагностики. Их привлекательность обусловлена рядом принципиальных преимуществ: высоким пространственным разрешением (порядка длины волны излучения), высоким временным разрешением, позволяющим отслеживать структурные изменения, а также молекулярной специфичностью.

Однако данным методам присущи и существенные ограничения. Ключевыми из них являются малая глубина зондирования биологических тканей, обычно не превышающая нескольких миллиметров, и зачастую необходимость применения экзогенных контрастных агентов (флуорофоров, красителей) для достижения достаточной специфичности и интенсивности сигнала. Первое ограничение не является критическим для ряда интраоперационных задач (рисунок 1.1), особенно при использовании эндоскопических или контактных подходов, когда излучение доставляется непосредственно к области интереса посредством оптоволоконных световодов, что позволяет эффективно применять методы молекулярной спектроскопии.

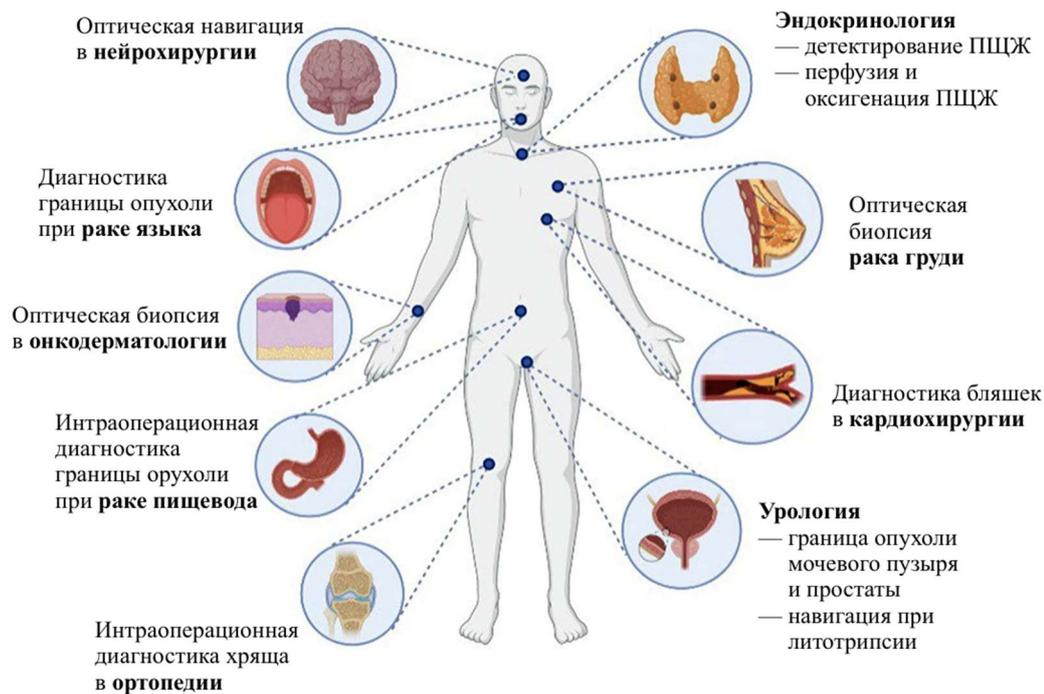


Рисунок 1.1. Основные задачи интраоперационной диагностики, в которых могут быть использованы оптические методы.

Проблема использования экзогенных меток является более существенной. Их применение *in vivo* сопряжено с комплексными процедурами регуляторного одобрения, потенциальными рисками токсичности, аллергенности, влияния на физиологию изучаемой системы, а также необходимостью обеспечения селективного накопления в целевой области. Вследствие этого, значительный научный и практический интерес представляет развитие методов оптической спектроскопии для интраоперационной диагностики, основанных на регистрации эндогенного контраста. Такие методы, детектирующие сигналы от молекулярных структур биологических тканей, позволяют получать диагностически значимую информацию без введения дополнительных контрастирующих веществ, что существенно повышает их потенциал для трансляции в клиническую практику.

Данная работа направлена на развитие методов интраоперационной оптической диагностики, которые используют эндогенный контраст, в

области урологии. Большая часть урологических операций проводится с помощью эндоскопа – оптического прибора, который используется для малоинвазивных операций в полостных органах, коими являются органы мочевыделительной системы (мочевой пузырь, мочеточник и почечная лоханка). Эндоскоп представляет из себя тонкую трубку с камерой, передающей изображение на внешний монитор, осветителем на конце, предназначенным для подсветки хирургического поля и, кроме этого, в него может быть помещено оптоволокно, которое используется для резекции тканей. По этому же волокну возможно подавать диагностическое излучение и собирать оптический отклик от тканей. Таким образом, во время урологических операций возможно применение оптических методов диагностики.

Основными эндоскопическими урологическими операциями являются трансуретральная резекция тканей предстательной железы и мочевого пузыря, а также контактная лазерная литотрипсия (удаление почечных камней) для лечения мочекаменной болезни. Актуальными задачами в процессе проведения данных операций является идентификация типа ткани перед волокном в зоне воздействия (нормальная или патологическая) в режиме реального времени. Решение этой задачи позволило бы обеспечить хирурга оперативной обратной связью. В частности, во время удаления злокачественных образований предстательной железы и мочевого пузыря, актуальной проблемой является интраоперационное определение границ опухоли. Это необходимо для объективной оценки вмешательства, что позволяет максимизировать объем удаляемой патологической ткани при минимизации повреждения окружающей здоровой ткани. Подобный подход обеспечил бы более высокую эффективность и безопасность без необходимости брать биопсию для гистологического исследования.

Другой важной задачей в хирургии в области урологии является повышение безопасности и эффективности операции по дроблению почечных конкрементов. Такие операции часто делаются с помощью лазерного

излучения. Например, часто возникает ситуация во время дробления камня, когда происходит повреждение мягкой ткани вследствие неконтролируемого смещения конкремента, что может привести к послеоперационным осложнениям. Кроме того, для повышения эффективности дробления необходимо корректировать параметры лазерного излучения (мощность, частоту импульсов) в зависимости от физико-химических свойств конкремента (плотность, состав). Данный процесс можно автоматизировать, создав систему обратной связи для хирурга, которая будет определять тип ткани перед волокном.

В рамках данной работы были поставлены задачи разработки метода определения здоровой и опухолевой ткани мочевого пузыря во время операции с помощью методов оптической спектроскопии, а также интраоперационного определения мягкой ткани и конкрементов во время процедуры лазерного дробления конкрементов. Для этого необходимо понять, какие фотофизические процессы происходят в биологических тканях при взаимодействии света с ними и рассмотреть основные оптические свойства, присущие тканям мочевыделительной системы.

## **1.2. Оптические свойства биотканей**

### **1.2.1. Теория переноса излучения**

Оптические свойства биологической ткани определяются ее составом и структурой. При распространении света в биологической ткани могут происходить различные фотофизические процессы: упругое и неупругое рассеяние, поглощение, флуоресценция и другие, такие как различные нелинейные эффекты.

Различные неоднородности, такие как клеточные органеллы, межклеточный материал и т.д., оказывают влияние на распространение света в ткани и, следовательно, на характеристики рассеянного света. Процесс многократного рассеяния света в биологических тканях можно описать с

помощью теории скалярной стационарной теории переноса излучения (ТПИ) [8–10]. Для монохроматического света данное уравнение имеет вид:

$$\frac{\partial I(\mathbf{r}, \hat{s})}{\partial s} = -\mu_t I(\mathbf{r}, \hat{s}) + \mu_s \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \hat{s}') p(\hat{s}, \hat{s}') d\Omega' + S(\mathbf{r}, \hat{s}), \quad (1.1)$$

где  $I(\mathbf{r}, \hat{s})$  – угловая плотность интенсивности (яркость излучения) в точке  $\mathbf{r}$  в направлении  $\hat{s}$ ;  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$  – коэффициент экстинкции (полный коэффициент ослабления);  $\mu_a$  – коэффициент поглощения;  $\mu_s$  – коэффициент рассеяния;  $p(\hat{s}, \hat{s}')$  – угловая функция рассеяния, определяющая угловое распределение интенсивности рассеяния на отдельной частице ансамбля;  $d\Omega'$  – элемент телесного угла в направлении  $\hat{s}'$ ;  $S(\mathbf{r}, \hat{s})$  – яркость источника, находящегося в самой среде, или излучения, приходящего извне. Данное уравнение выражает баланс энергии в бесконечно малом объеме среды: скорость изменения яркости излучения вдоль луча определяется рассеянием в направлении  $\hat{s}$  со всех остальных направлений  $\hat{s}'$  (за это отвечает интегральный член), а также ослаблением из-за рассеяния и поглощения (линейный член  $-\mu_t I(\mathbf{r}, \hat{s})$ ).

Уравнение переноса излучения не имеет аналитического решения, поэтому для его решения существует множество различных приближений. Для биологических тканей, которые являются рассеивающей средой, одним из основных является диффузионное приближение, при котором переходят к системе  $(N+1)^2$  связанных дифференциальных уравнений в частных производных для коэффициентов разложения яркости излучения  $I(\mathbf{r}, \hat{s})$  в ряд по сферическим гармоникам [11]:

$$I(\mathbf{r}, \hat{s}) \approx \sum_{n=0}^1 \sum_{m=-n}^n I_{n,m}(\mathbf{r}) Y_{n,m}(\hat{s}). \quad (1.2)$$

Для  $N=1$  система будет состоять из 4 связанных уравнений, которые могут быть сведены к одному уравнению диффузного типа. Для изотропной среды оно имеет следующий вид:

$$(\nabla^2 - \mu_{eff}^2)U(\mathbf{r}) = -3\mu_t S(\mathbf{r}), \quad (1.3)$$

где  $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}$  – эффективный коэффициент ослабления;  $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$  – приведенный коэффициент рассеяния;  $g$  – параметр анизотропии рассеяния (средний косинус угла рассеяния);  $U(\mathbf{r}) = \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \hat{s}) d\Omega$  – интенсивность света.

С точки зрения физического смысла диффузионное приближение означает, что эффекты рассеяния преобладают над эффектами поглощения ( $\mu_a \ll \mu'_s$ ) [10]. Также оно может быть применено только на некоторой глубине, где рассеянное излучение «забывает» направление первоначального распространения волны и становится изотропным. Известно, что в тканях слизистых оболочек доля однократного рассеянного света мала по сравнению с той частью падающего света, которая претерпевает многократное рассеяние, к тому же рассеяние в тканях преобладает над поглощением. Таким образом, в данном случае диффузионное приближение можно успешно применять для расчета интенсивности распространяющегося по биоткани света.

Из уравнения (1.3) можно оценить глубину проникновения излучения в биоткань:

$$\delta = \frac{1}{\mu_{eff}} = \frac{1}{\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}}. \quad (1.4)$$

Данная характеристика света является одной из важнейших для определения применимости различных методов неинвазивной оптической диагностики.

В работе [12] были оценены коэффициенты  $\mu_a$  и  $\mu'_s$  в широком спектральном диапазоне для слизистой оболочки ткани человека. С помощью них была рассчитана средняя глубина проникновения излучения в ткань для разных длин волн (рисунок 1.2).

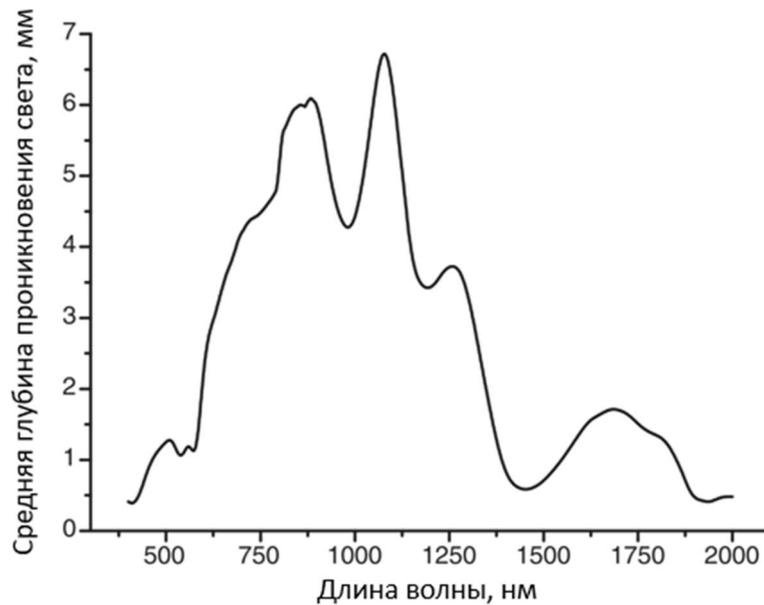


Рисунок 1.2. Средняя глубина проникновения света в слизистые оболочки человека. Адаптировано из работы [12].

На рисунке 1.2 видно, что в видимом диапазоне (400-700 нм) глубина проникновения света составляет около 1 мм. В органах мочевыделительной системы сосуды и капилляры находятся на глубине не более 200 мкм [13], тем самым будет наблюдаться оптический сигнал от основного хромофора ткани, содержащегося в сосудах – гемоглобина.

### 1.2.2. Основные хромофоры биотканей

Спектральный анализ диффузно рассеянного тканью света может давать информацию как о рассеивающих, так и о поглощающих частицах ткани. Основными поглотителями в биологической ткани являются оксигемоглобин ( $\text{HbO}_2$ ), дезоксигемоглобин (Hb), липиды, билирубин, меланин, вода [8]. В слизистых оболочках билирубин и меланин отсутствуют, поэтому мы будем рассматривать только поглощение оксигемоглобина и дезоксигемоглобина в видимом диапазоне (рисунок 1.3).

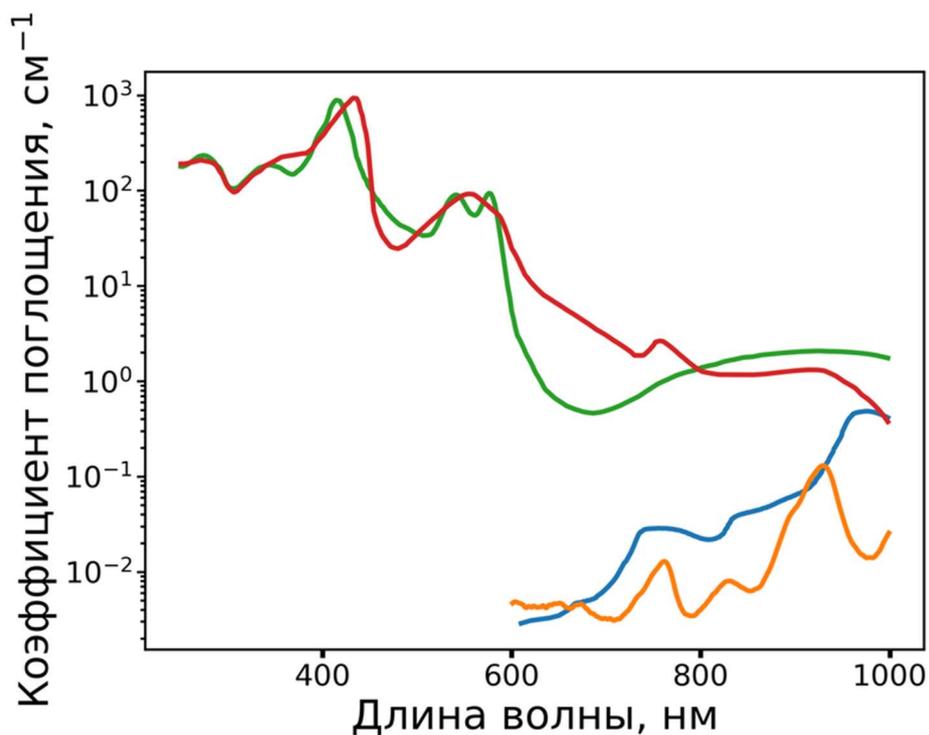


Рисунок 1.3. Спектры поглощения основных хромофоров слизистой оболочки. Для оксигемоглобина, дезоксигемоглобина и воды были использованы концентрации, характерные для почки [14].

В видимом диапазоне характерные пики поглощения оксигемоглобина приходятся на длины волн  $\lambda_1=415$  нм,  $\lambda_2=542$  нм,  $\lambda_3=577$  нм, дезоксигемоглобина – на длины волн  $\lambda_1=431$  нм,  $\lambda_2=555$  нм. У липидов и воды поглощение в видимом диапазоне мало, однако оно выше в инфракрасном диапазоне. Для воды локальные максимумы поглощения приходятся на длины волн  $\lambda_1=980$  нм,  $\lambda_2=1196$  нм,  $\lambda_3=1453$  нм.

Поглощение, а следовательно, концентрацию данных веществ в биологической ткани можно оценить по величине провалов в спектрах диффузного отражения света. Данный метод широко используется для определения содержания воды, полного содержания гемоглобина, степени насыщенности кислородом (оксигенации) ткани, которая рассчитывается как отношение концентрации оксигемоглобина к сумме концентраций окси- и дезоксигемоглобина [12].

В отличие от мягкой ткани конкременты, образующиеся в почках, не содержат вышеперечисленных хромофоров. Пример спектра отражения от почечного камня в видимом диапазоне представлен на рисунке 1.4.

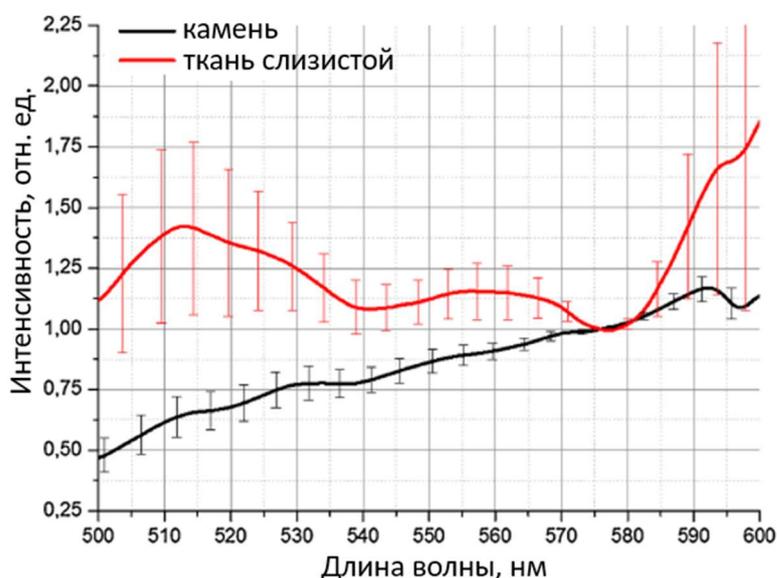


Рисунок 1.4. Спектры отражения от почечного камня и ткани слизистой, нормированные на значения интенсивности на длине волны 576 нм. Адаптировано из работы [15].

### 1.2.3. Основные флуорофоры биотканей

Кроме перечисленных выше процессов рассеяния и поглощения в биологических тканях наблюдается также флуоресценция различных веществ [16]. Спектры флуоресценции для каждой молекулы уникальны и по ним возможно опознать присутствие и измерить концентрацию исследуемых флуорофоров в образце.

В биоткани сигнал флуоресценции обусловлен наличием ряда молекул-флуорофоров (кофакторов НАДН и ФАД, коллагена, эластина, продуктов окисления белков и липидов и др. [17]). Флуоресценция клеток преимущественно обусловлена присутствием таких веществ как НАДН и ФАД [16]. Данные кофакторы играют роль соответственно донора и акцептора электронов в процессе окислительного фосфорилирования. НАДН и ФАД способны к флуоресценции, в то время как окисленная форма НАД<sup>+</sup> и

восстановленная форма ФАДН<sub>2</sub> не флуоресцируют. НАДН в восстановленной форме имеет полосу поглощения в диапазоне от 300 до 380 нм и флуоресцирует в диапазоне от 420 до 480 нм (рисунок 1.5). Так как окисленная форма НАД<sup>+</sup> не поглощает свет в данном диапазоне, становится возможным оценить метаболическое состояние клетки (баланс между окислителями и антиоксидантами) по величине синей флуоресценции НАДН [18].

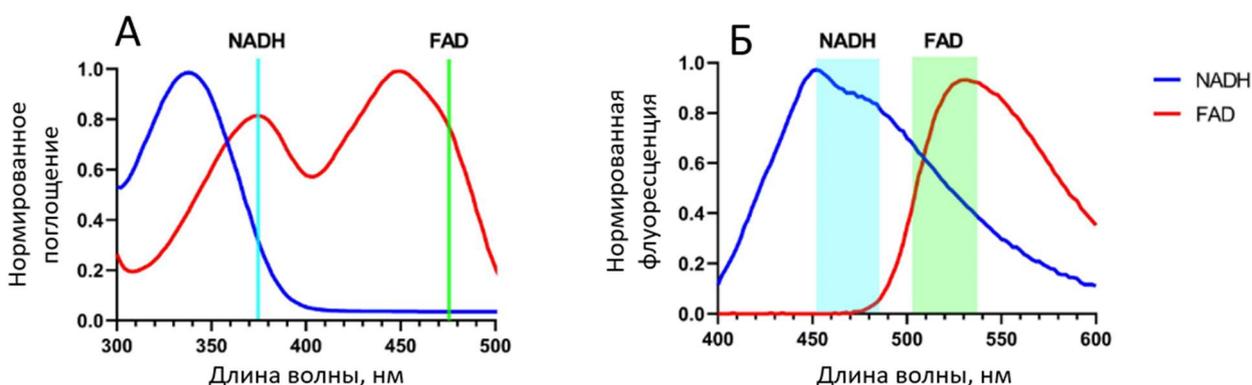


Рисунок 1.5. Нормированные спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) НАДН и ФАД. Адаптировано из работы [19].

В свою очередь ФАД поглощает свет в диапазоне 360-465 нм, а полоса флуоресценции находится в диапазоне от 500 до 570 нм. Поскольку поглощение НАДН уменьшается по мере увеличения длины волны возбуждения с 360 до 390 нм, флуоресценцию ФАД можно отделить от НАДН, выбрав большую длину волны возбуждения.

Так как НАДН и ФАД - единственные переносчики электронов, которые способны к флуоресценции, соотношение интенсивностей их флуоресценции может служить параметром для оценки метаболического статуса ткани. Отношение окисленных электронных переносчиков к восстановленным называется редокс-отношением (redox ratio). Во многих работах было показано, что оно различно для опухолевой и здоровой тканей и может являться маркером патологического процесса [20]. В *in vivo* исследованиях для регистрации флуоресценции НАДН и ФАД в основном используют метод флуоресцентного имиджинга с двухфотонным возбуждением, что позволяет

возбуждать данные кофакторы в ближней ИК-области, где рассеяние и поглощение биологических тканей практически отсутствует [21,22].

На данный момент известно ограниченное число флуорофоров, излучающих в ближнем ИК диапазоне [23]. Автофлуоресценция ткани в красной и ближней инфракрасной областях спектра была зарегистрирована в большом количестве биологических тканей, в том числе и в мочевом пузыре. Более того, ИК-флуоресценция широко используется для диагностических целей, например, для разделения здоровых и раковых тканей. Однако несмотря на то, что ИК-флуоресценция уже применяется в клинике, происхождение флуорофоров, ответственных за излучение в красной и ближней инфракрасной областях спектра, до сих пор остается спорным.

По одной из гипотез природы ИК-флуоресценции в биотканях предполагается, что она может быть вызвана продуктами окисления различных органических веществ (липидов, белков, аминокислот и т.д.) [24]. В ней утверждается, что при наличии процессов окисления формируются системы хромофоров, которые взаимодействуют между собой, вследствие этого между ними возникает перенос энергии, который приводит к появлению длинноволнового хвоста поглощения. Данный хвост тянется до красной области спектра и, таким образом, через него возможно возбудить ИК-флуоресценцию. В работе [24] показано, что при индуцировании окисления с помощью УФ излучения в модельных клетках они начинают излучать в красной и ИК области (рисунок 1.6).

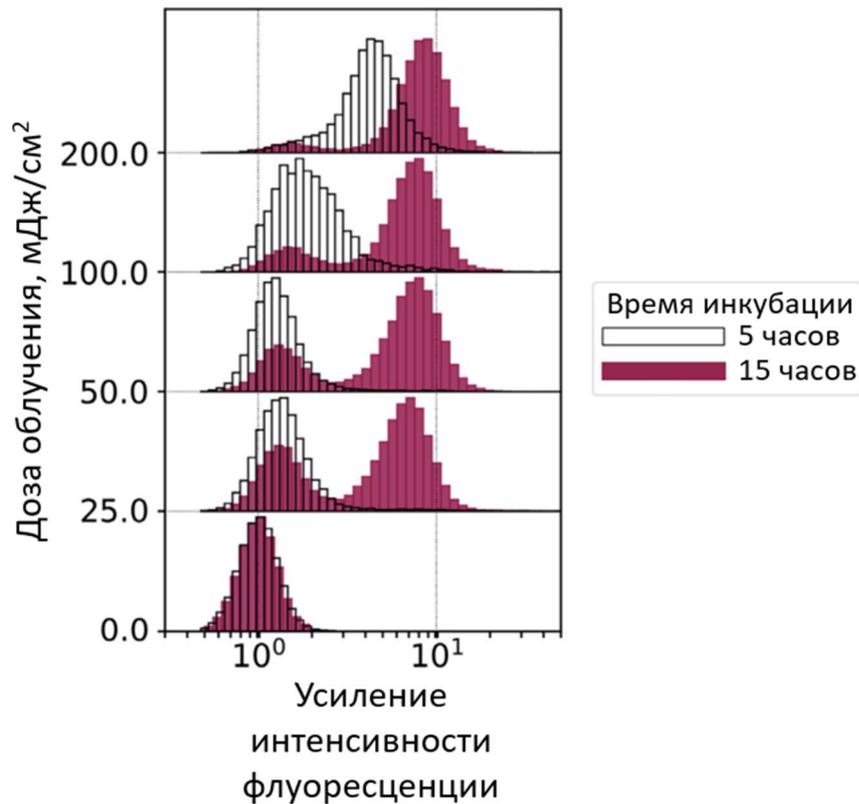


Рисунок 1.6. Распределение модельных клеток, облученных УФ излучением ( $\lambda = 254$  нм,  $10$  мВт/см<sup>2</sup>), по степени усиления флуоресценции в красном канале ( $\lambda_{\text{ex}} = 638$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 660$  нм). Адаптировано из работы [24].

### 1.3. Навигация во время лазерного дробления почечных камней

#### 1.3.1. Лазерная литотрипсия как метод лечения мочекаменной болезни

Заболеваемость мочекаменной болезнью за последние 30 лет выросла почти на 50% во всем мире [25]. К эффективным методам лечения камней в почках относится литотрипсия, которая может выполняться неинвазивно (экстракорпоральная ударно-волновая литотрипсия, ЭУВЛ) или трансуретрально с использованием эндоскопа (уретероскопия). Последние исследования показали, что уретероскопия — малоинвазивная процедура — обеспечивает более высокий процент полного удаления камней по сравнению с ЭУВЛ [26,27]. Согласно эпидемиологическим данным, распространенность

эндоскопических методов лечения мочекаменной болезни за последние 10 лет увеличилась более чем в два раза, постепенно вытесняя ЭУВЛ [28,29].

Основным методом, применяемым при трансуретральной литотрипсии, является лазерная хирургия [30,31]. Лазерная литотрипсия — эффективная процедура для удаления камней различного состава, которая может выполняться с помощью гибких уретероскопов, обеспечивающих доступ в почечную лоханку [32,33].

Для разрушения камней мочевых путей применяются импульсные лазеры, длина волны излучения которых приходится на одну из полос поглощения воды, поскольку большинство почечных камней имеют в кристаллической решетке включения в виде молекул воды. В процессе лазерной литотрипсии реализуется несколько механизмов разрушения конкрементов [30,34]. Первый механизм — термомеханический — который происходит при поглощении лазерного излучения непосредственно камнем. При достижении определенной температуры (порядка 100-300 °С в зависимости от состава камня) происходит химическое разложение конкремента, что приводит к его разрушению. Вторым механизмом является кавитационный, который действует при работе в жидкой среде и связан с микровзрывами из-за поглощения излучения водой в порах камня, при котором образуются пузырьки пара, схлопывание которых вызывает кавитацию — образование больших перепадов давления, разрушающих камень.

Для дробления камней применяются лазеры разных типов: гольмиевый, тулиевый волоконный, эрбиевый и т.д. [35]. На данный момент наиболее широко распространено применение гольмиевого лазера, с длиной волны излучения 2.1 мкм, которая находится вблизи максимума поглощения воды 1.94 мкм, соответствующего комбинации валентных и деформационных колебаний. Более интенсивный максимум спектра поглощения конкрементов приходится на длину волны 2.94 мкм, поэтому можно предположить, что дробление камней с помощью эрбиевых лазеров (длина волны излучения 2.90–

2.94 мкм) эффективнее, чем с помощью гольмиевых. Однако излучение эрбиевых лазеров сильно поглощается стандартными хирургическими кварцевыми оптоволоконными, что может привести к их термической деградации или повреждению лазера, поэтому эрбиевые лазеры не нашли широкого применения в урологии. Относительно недавно в клиниках начали использовать тулиевые волоконные лазеры с длиной волны излучения 1.94 мкм, точно приходящейся на максимум поглощения воды. Это приводит к увеличению эффективности дробления, что является их преимуществом по сравнению с гольмиевыми лазерами. Кроме того, данный вид лазеров совместим со стандартными хирургическими оптоволоконными. В данной работе исследования проводились с помощью тулиевого волоконного лазера. Характерные параметры лазерного излучения при его использовании во время лазерной литотрипсии представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1. Характерные параметры тулиевого лазера для лазерной литотрипсии.

Длина волны излучения	1.94 мкм
Длительность импульса	1 мс
Частота следования импульсов	До 100 Гц
Энергия излучения	0.1 – 10 Дж
Средняя мощность	До 20 Вт

Во время процедуры лазерной литотрипсии помимо хирургического лазера используется цистоскоп, представляющий из себя узкую трубку, которая вводится через уретру в мочевой пузырь, мочеточник или почечную лоханку (рисунок 1.7). Цистоскоп оснащен камерой, передающей изображение тканей на внешний монитор, осветителем, предназначенным для подсветки хирургического поля, а также каналом для хирургического инструмента. Одним из вариантов такого инструмента может быть оптоволоконно, по которому в область проведения операции доставляется

лазерное излучение, например, для дробления конкрементов. По этому же оптоволокну возможно заводить диагностическое излучение и собирать оптический отклик тканей.

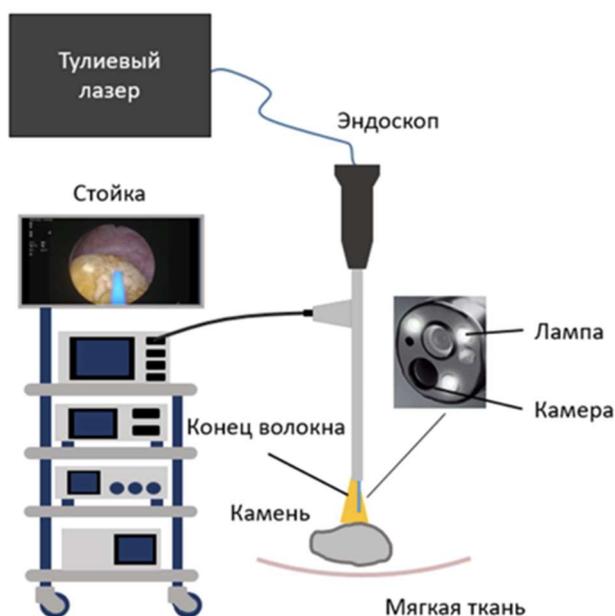


Рисунок 1.7. Схема, реализующая процедуру лазерной литотрипсии.

### 1.3.2. Клинические методы определения типа мочевого камня

Как известно, почечные конкременты могут иметь различный химический состав и морфологические особенности. В работе [36] выделяют следующие основные группы конкрементов, дифференцируемых по составу и морфологии:

1. Тип I – камни из оксалата кальция моногидрата (вевеллита), ассоциированные с гипероксалурией.
2. Тип II – камни из оксалата кальция дигидрата (веделлита), связанные с гиперкальциурией.
3. Тип III – уратные камни (мочевая кислота и ее соли), формирующиеся при низком pH мочи или гиперурикозурии.

4. Тип IV – фосфатные камни (гидроксиапатит, струвит, брушит), возникающие при щелочной моче и инфекциях.

5. Тип V – цистиновые камни, обусловленные наследственными нарушениями обмена.

6. Тип VI – белковые камни, встречающиеся при хронических воспалениях или почечной недостаточности.

7. Тип VII – редкие камни (ксантиновые, лекарственные и др.).

Данная систематизация позволяет связать специфику камнеобразования с метаболическими нарушениями, инфекционными процессами или генетическими патологиями и таким образом назначить соответствующее лечение. Наиболее распространенными мочевыми камнями являются оксалатные (тип I и II), уратные (тип III) и гидроксиапатитовые (подвид типа IV). Оксалат кальция входит в состав 60% всех камней; смешанный оксалат кальция и гидроксиапатит – 20%, а уратные камни встречаются в 7% случаях [37].

К стандартным методам анализа состава камней относятся рентгеноструктурный анализ, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием [38–43]. Однако все эти методики применимы только в лабораторных условиях после хирургического удаления конкремента. Существуют и другие методы определения типа камней, такие как влажный химический анализ, термогравиметрия, лазерно-искровая эмиссионная спектроскопия [44–48], но они требуют разрушения образца для проведения анализа. Таким образом, ни один из этих методов не может быть использован интраоперационно.

В настоящее время для определения химического состава и плотности конкрементов в клинике применяется метод двух энергетической компьютерной томографии (ДЭКТ). Данный анализ проводят перед операцией для определения точного расположения камня, а также для расчета его плотности и типа. Принцип ДЭКТ заключается в получении двух наборов

данных с разными пиковыми напряжениями [49]. Ослабление рентгеновского излучения материалами в диагностическом диапазоне энергий основано на фотоэлектрическом поглощении и комптоновском рассеянии и варьируется в зависимости от состава конкретного органа и энергии рентгеновского пучка. На рисунке 1.8 представлен пример изображения, получаемого в ходе пост-обработки ДЭКТ. Однако данный метод позволяет дифференцировать только уратные камни от других типов [50,51]. Чувствительность и специфичность ДЭКТ для выявления уратных конкрементов составляют 98% и 89% соответственно.



Рисунок 1.8 – Пример изображения почки, получаемый в ходе пост-обработки ДЭКТ. Адаптировано из работы [51].

Существует также метод определения химического состава конкремента по изображениям с эндоскопической стойки непосредственно во время операции на основе машинного обучения. Обучение классификатора, распознающего тип камня, основывается на камнях с чистым составом, поэтому точность определения камней со смешанным составом низкая [52].

Современные тенденции в хирургическом лечении мочекаменной болезни, в частности повсеместное применение лазерной литотрипсии, обуславливают необходимость создания алгоритмов интраоперационной диагностики состава конкрементов для применения комплекса мер для

предотвращения рецидивов мочекаменной болезни после удаления камней. Кроме того, знание состава камня во время операции поможет автоматически настраивать параметры дробления камней, такие как частоту следования и мощность лазерных импульсов, тем самым увеличив эффективность дробления конкрементов.

### **1.3.3. Методы оптической спектроскопии для детектирования типа ткани во время лазерной литотрипсии**

Во время лазерной литотрипсии существует риск миграции камня из зоны облучения инструмента с волокном, что может привести к повреждению слизистой оболочки [53,54]. Подобные случаи способны вызвать осложнения, включая массивную гематурию и стриктуру мочеточника [55,56]. Точность хирургического вмешательства и сохранность мягких тканей при фрагментации камня зависят исключительно от оценки хирургом операционного поля и его реакции.

Известно, что почечные камни флуоресцируют при возбуждении зеленым светом [57–59]. Это позволяет легко проводить измерения в клинических условиях с использованием установки, в которой возбуждение и детектирование происходят через хирургическое волокно. Этот факт был использован для создания системы определения типа ткани с обратной связью [60], успешно протестированной на животных моделях [2]. Кроме того, известна работа, где была разработана система визуализации флуоресценции, причем источником света являлся осветитель эндоскопа [61].

Еще один оптический метод, который может быть использован для создания системы распознавания типа ткани во время лазерной литотрипсии – спектроскопия диффузного отражения света. Данный метод уже используется в интраоперационной диагностике для дифференцирования типов ткани в различных органах, например, раковой и здоровой [62–64]. Он не требует дополнительных источников света, так как в качестве него может использоваться осветитель уретроскопа. Как было сказано в разделе 1.2.2,

спектры отражения камня и мягкой ткани различаются в видимом диапазоне из-за наличия гемоглобина в слизистой, который имеет характерную двугорбую полосу поглощения в диапазоне 500-620 нм. Работа данного метода в распознавании мягкой ткани и камней была продемонстрирована *in vitro u in vivo* на 8 операциях, где вероятность распознавания мягкой ткани составила 91%, а камня - 77% [15]. В данном исследовании, однако, не регистрировались спектры непосредственно во время включения лазера.

Многочисленные исследования посвящены определению состава конкрементов на основе спектров комбинационного рассеяния [3,65–67]. Показано, что спектроскопия КР потенциально может быть использована в сочетании с хирургическим волоконно-оптическим зондом для диагностики во время лазерной литотрипсии [68].

Флуоресцентная спектроскопия представляет собой еще один метод многокомпонентного анализа веществ, включая биологические ткани [69,70]. Примечательно, что уратные камни демонстрируют значительно более высокую интенсивность флуоресценции при воздействии зеленого света по сравнению с другими типами конкрементов [59]. Современные исследования также подтвердили возможность высокоточного различения кальций-содержащих и бескальциевых камней с помощью флуоресцентной спектроскопии [4].

## **1.4. Интраоперационная диагностика рака мочевого пузыря**

### **1.4.1. Структура тканей мочевого пузыря**

Мочевой пузырь – это полый орган в тазовой области, который служит в качестве резервуара для мочи. Стенки мочевого пузыря состоят из четырех слоев (Рисунок 1.9А): слизистой оболочки (уротелия), подслизистого слоя, мышечного слоя (детрузора) и внешней оболочки [71]. Слизистая оболочка - первый внутренний слой, который выстлан многослойным переходным эпителием и имеет толщину 150-200 мкм [72]. Данный слой имеет три зоны: базальную, промежуточную и зону с зонтичными клетками, которые

препятствуют попаданию мочи в глубже расположенные слои и форма которых меняется от растяжения стенок – от куполообразной до плоской. Когда слизистая оболочка пузыря не растянута, она имеет множество складок, которые, однако, отсутствуют в области мочепузырного треугольника (нижняя часть, рисунок 1.9А).

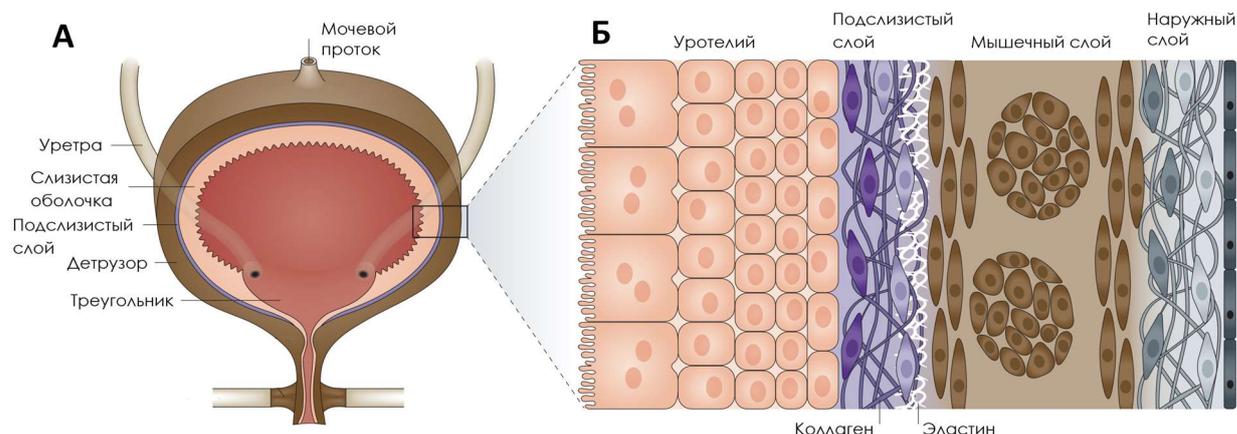


Рисунок 1.9. А – Строение мочевого пузыря. Б – Слои стенок мочевого пузыря. Рисунок адаптирован из работы [71].

Подслизистый слой состоит из соединительной ткани и обладает обширной сетью кровеносных сосудов, которые обеспечивают питание слизистой оболочки. Межклеточный компонент данного слоя содержит фибриллярные коллагены I и III типов, а также сеть волокон эластина.

Мышечный слой составляет 60–70% толщины здоровой стенки мочевого пузыря и состоит из внутреннего, среднего и внешнего слоев. Мышечные клетки, принадлежащие к внутреннему и внешнему слоям, в основном ориентированы продольно, тогда как клетки среднего слоя ориентированы по кругу. Пучки мышечных клеток составляют большую часть мышечного слоя, их окружает соединительная ткань, богатая коллагеном (Рисунок 1.9Б). Эти длинные веретенообразные клетки отвечают за наполнение и опорожнение мочевого пузыря.

В работе [73] было установлено, что в заполненном состоянии суммарная толщина слизистой оболочки и подслизистого слоя мочевого пузыря составляет  $0.5 \pm 0.2$  мм как для мужчин, так и для женщин. Таким

образом, кровеносные сосуды, в которых находится гемоглобин, а также коллаген и эластин в мочевом пузыре находятся на глубине не более 1 мм. В разделе 1.2.2 было отмечено, что глубина проникновения света в слизистых в видимом диапазоне составляет более 1 мм, таким образом можно исследовать оптический отклик от основных хромофоров и флуорофоров стенок мочевого пузыря методами оптической спектроскопии.

#### **1.4.2. Патологические процессы в тканях мочевого пузыря**

Неконтролируемый рост и размножение аномальных клеток в мочевом пузыре – рак мочевого пузыря – в более чем 85% случаев начинается со слизистой оболочки (уротелия), покрывающей внутреннюю поверхность мочевого пузыря, такие виды рака называются карциномами [74]. Внешний вид опухоли может быть различен. Наиболее часто встречается папиллярный рак, который имеет вид «кустарника», выступающего в полость пузыря. Также распространена плоская опухоль, или карцинома *in situ*, характеризующаяся едва заметным утолщением стенки мочевого пузыря. В обоих случаях, если опухоль поражает только слизистую, то такая опухоль называется неинвазивной, или же если она распространяется на другие слои мочевого пузыря, то это инвазивная опухоль.

По системе TNM (tumour, node, metastasis) различают несколько стадий развития рака мочевого пузыря (рисунок 1.10). Папиллярные опухоли, которые ограничены слизистой оболочкой или проникли в подслизистый слой, классифицируются соответственно, как T<sub>0</sub> и T<sub>1</sub>. Карцинома *in situ*, ограниченная слизистой оболочкой, присвоено обозначение T<sub>is</sub>. Опухоли второй стадии прорастают в мышечную оболочку (T<sub>2a</sub>, T<sub>2b</sub>). Опухоли T<sub>3</sub> проникают за пределы мышечной ткани в жировой слой (инвазия T<sub>3a</sub> микроскопическая, T<sub>3b</sub> макроскопическая). Опухоли T<sub>4</sub> распространяются за пределы мочевого пузыря.

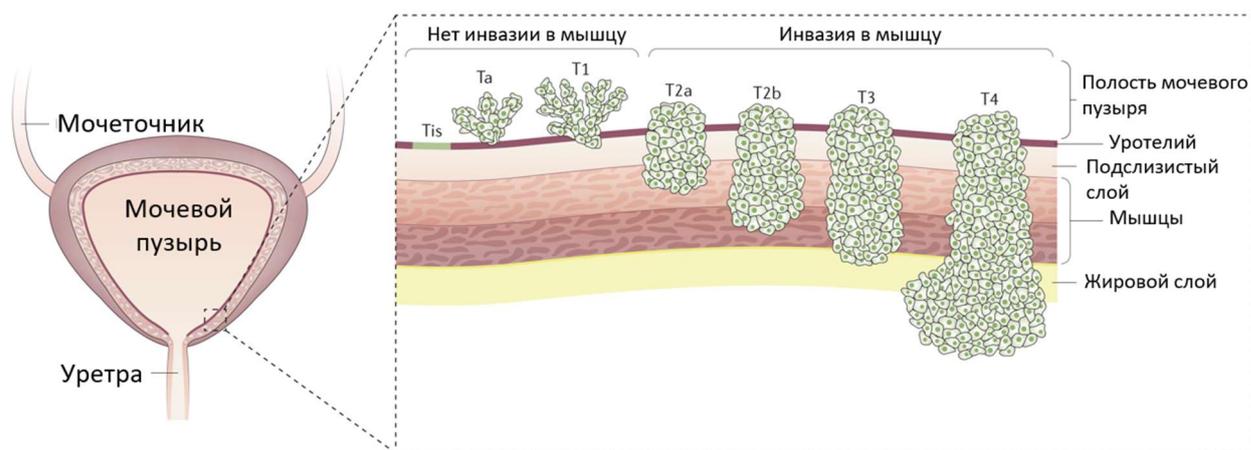


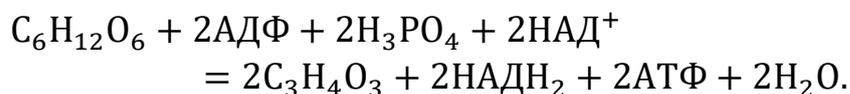
Рисунок 1.10. Стадии рака мочевого пузыря. Адаптировано из работы [74].

Изменения клеточного метаболизма являются важным признаком образования и появления злокачественной опухоли. Важнейшим процессом, протекающим в клетке, является образование АТФ (аденозинтрифосфата), молекула которого является универсальным энергоносителем внутри клетки [20]. Одним из главных способов синтеза АТФ является расщепление глюкозы. Как и остальные процессы получения энергии живыми организмами, данный процесс происходит в результате окислительно-восстановительных реакций, при которых происходит перенос электрона с одной молекулы (восстановитель, донор электронов) на другую (окислитель, акцептор электронов). При этом роль акцептора или донора электронов могут играть определенные органические молекулы, а также роль акцептора может принимать кислород. В процессе расщепления глюкозы одними из таких органических молекул являются коферменты никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), которые существуют в двух формах – окисленной (НАД<sup>+</sup> и ФАД) и восстановленной (НАДН и ФАДН<sub>2</sub>), поэтому по содержанию данных веществ в клетке можно судить о ее метаболическом состоянии. Восстановленная форма обоих веществ является более энергонасыщенным состоянием, поэтому при ее образовании тратится энергия.

В здоровых клетках существует два основных пути образования АТФ из глюкозы: с участием кислорода и без участия кислорода [75]. В присутствии

кислорода в клетках сначала происходит расщепление глюкозы до пирувата посредством гликолиза, а затем осуществляется окисление большей части пирувата в митохондриях до углекислого газа в процессе окислительного фосфорилирования. Во время данного процесса на каждую молекулу глюкозы образуется 10 молекул НАД<sup>+</sup> из НАДН и 2 молекулы ФАД из ФАДН<sub>2</sub>, при этом выделяется энергия, необходимая для образования АТФ. В результате образуется от 30 до 36 молекул АТФ из одной молекулы глюкозы.

При недостатке кислорода в здоровых клетках происходит процесс гликолиза, в результате которого образуется 2 пирувата, 2 молекулы АТФ, 2 молекулы воды и восстанавливается 2 молекулы НАД<sup>+</sup> до НАДН:



В отличие от здоровых клеток большинство раковых клеток имеют склонность производить энергию с помощью анаэробного гликолиза с образованием лактата, а не посредством окислительного фосфорилирования с использованием кислорода. В клетках быстро растущей злокачественной опухоли уровень гликолиза почти в 200 раз выше, чем в нормальных тканях. При этом анаэробный гликолиз остается предпочтительным даже в условиях, когда кислород в избытке. Данный эффект называется эффектом Варбурга.

Из вышесказанного можно сделать вывод, что основная масса НАДН образуется при гликолизе, а ФАД — при окислительном фосфорилировании, таким образом по соотношению их концентраций можно судить о метаболическом состоянии клетки, а следовательно, о том, здоровая это ткань или пораженная раком. Как было сказано в пункте 1.2.3 данные коферменты обладают свойством флуоресценции, поэтому их концентрацию можно оценить по интенсивности флуоресценции [76].

Также отличить раковую опухоль от здоровой ткани возможно по содержанию воды, так как в процессе гликолиза и некоторых других химических реакций, которые преобладают в опухолевых тканях, образуется

большое ее количество [77]. Более высокое содержание воды в пораженной опухолью ткани по сравнению со здоровой было обнаружено с помощью методов комбинационного рассеяния света, терагерцовой спектроскопии, спектроскопии ядерно-магнитного резонанса [78–80].

Еще одним процессом, протекающим в раковых опухолях преимущественно на ранних стадиях ее развития, является процесс васкуляризации - формирования новых кровеносных сосудов внутри ткани, которые питают патологическое новообразование [81]. Поскольку содержащийся в красных кровяных тельцах гемоглобин является одним из доминирующих поглотителей в большинстве тканей слизистых оболочек, в том числе и в ткани мочевого пузыря, увеличение его концентрации можно зарегистрировать с помощью, например, спектроскопии диффузного отражения света.

Кроме того, известно, что раковые клетки и их ядра демонстрируют значительные вариации формы и размера, ядра таких клеток аномально увеличены [72]. На более высоком уровне организации можно видеть архитектурные изменения, такие как полная дезорганизация ткани, тесно связанные с утратой нормального созревания клеток. Все это приводит к увеличению рассеяния света тканью, пораженной раковой опухолью, по сравнению со здоровой тканью.

#### **1.4.3. Клинические методы для интраоперационной диагностики рака мочевого пузыря**

Для интраоперационной диагностики рака мочевого пузыря распространены оптические методы навигации, поскольку их можно достаточно успешно применять во время операции, а также они уже реализованы в коммерческих системах.

Одним из классических методов обследования при выявлении злокачественных опухолей мочевого пузыря является цистоскопия (эндоскопический осмотр) в белом свете. Перед исследованием мочевого

пузырь наполняют водой для поддержания расправленной формы. Чувствительность и специфичность цистоскопии в белом свете составляет в среднем 70%. К сожалению, цистоскопия в белом цвете обладает плохой способностью к распознаванию папиллярных опухолей малого размера и плоских уротериальных поражений, в том числе карциномы *in situ* – ранней стадии злокачественного рака, когда группа аномальных клеток находится там, где она возникла, и не распространяется на другие участки [82].

В клинической практике для диагностики рака мочевого пузыря используется также автофлуоресцентный имиджинг, как в видимом, так и в ИК-диапазоне, который обычно применяется вместе с классической цистоскопией в белом свете [83].

Всевозможные методы контрастирования изображения в белом свете с помощью компьютерных программ также уже применяются в медицине для диагностики раковой опухоли. Одним из таких методов является технология спектрального цветового выделения (FICE, flexible spectral imaging color enhancement) [84]. FICE конвертирует изображения на спектральные составляющие с определенной длиной волны, которые затем реконструирует в четкие высококонтрастные изображения, позволяя на основе спектральных и морфологических отличий здоровой и пораженной опухолью тканей, произвести их разделение.

Как показали исследования, большой чувствительностью к раковой опухоли обладает метод фотодинамической диагностики (ФДД) [82,85]. Он основан на введении в организм пациента избирательно накапливающихся в пораженных злокачественной опухолью участках ткани фотосенсибилизаторов, например, 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). Сами вещества не способны к флуоресценции, но они являются исходным продуктом внутриклеточного биосинтеза гема. В этой цепи образуются вещества, предшествующие порфиринам, которые флуоресцируют в красном диапазоне при возбуждении синим светом. Таким образом, опухолевые клетки

будут заметно выделяться за счет красноватой окраски на фоне здоровой ткани, окрашенной в синий свет (рисунок 1.11).

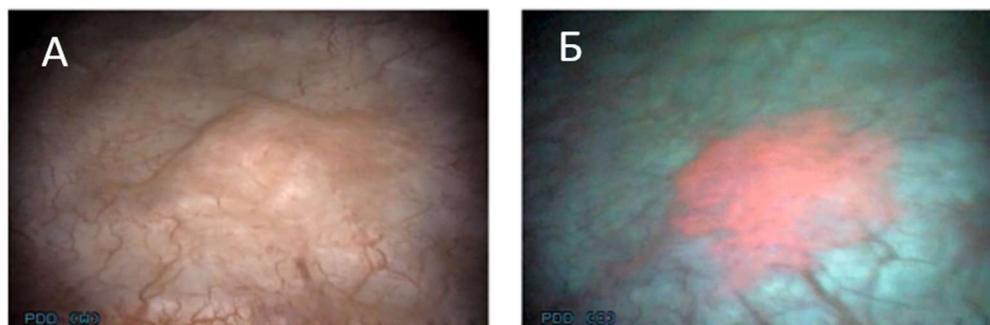


Рисунок 1.11. А) Изображение раковой опухоли в мочевом пузыре в белом свете. Б) Изображение той же опухоли, полученное с помощью метода ФДД [85].

Главным недостатком ФДД является его низкая специфичность (57%) из-за накопления фотосенсибилизаторов не только в раковой, но и в воспаленной ткани [82]. Еще одним недостатком метода является предварительный ввод меток, которые у некоторых пациентов могут вызвать аллергические реакции.

Еще одним методом диагностики злокачественных опухолей на ранних стадиях в мочевом пузыре является методика узкополосной визуализации (NBI, narrow band imaging) [86]. Его суть заключается в следующем. Белый свет от лампы проходит через фильтры, которые пропускают только две полосы: 400-430 нм с серединой в 415 нм (синий свет) и 525-555 нм с серединой в 540 нм (зеленый свет). Излучение на обеих длинах волн приходится на максимумы поглощения гемоглобина. Так как глубина проникновения излучения в ткани зависит от длины волны света, то синий свет проникает сравнительно неглубоко и поглощается поверхностной капиллярной сетью, тем самым капилляры при визуализации приобретают коричневый цвет. Зеленый свет поглощается более глубоко расположенными кровяными сосудами (венами), и они приобретают голубой цвет на изображении (рисунок 1.12). Таким образом, с помощью NBI возможно увеличить контраст между поверхностью слизистой оболочки и кровяными

сосудами без использования внешних красителей. Так как раковые опухоли часто сопровождаются процессом васкуляризации, как было описано в пункте 1.4.2 данной работы, то с помощью метода NBI возможно диагностировать злокачественную опухоль.

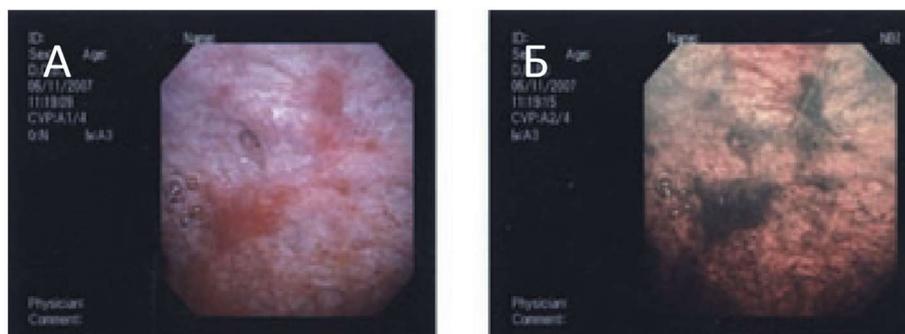


Рисунок 1.12. А) Изображение раковой опухоли в мочевом пузыре в белом свете. Б) Изображение того же участка ткани, полученное с помощью метода NBI [86].

Систематические обзоры и мета-анализы показывают, что применение методик ФДД и NBI может повышать вероятность выявления опухоли во время цистоскопии [82,87]. При этом принципиальным вопросом для оценки полезности метода является не только повышение вероятности выявления опухоли при осмотре, но и повышение благоприятности прогноза терапии при использовании вспомогательного метода при удалении опухоли. Применение методов NBI и ФДД в процессе удаления опухоли позволяет понизить вероятность ее повторного появления (отношение шансов:  $\sim 0.5$ ) [88], однако частота прогрессии заболевания, когда при повторной цистоскопии обнаруживается мышечно-инвазивная форма рака, существенно не меняется при использовании этих методов.

#### **1.4.4. Обзор экспериментальных подходов интраоперационного детектирования рака с помощью методов оптической спектроскопии**

Помимо методов, позволяющих локализовать раковую опухоль в мочевом пузыре, перечисленных выше, которые уже широко используются для диагностики пациентов в больницах, приобретают популярность методы,

которые работают без введения контраста, обладают большей чувствительностью и специфичностью, а также детектируют определенные молекулы. К таким методам относятся различные методы оптической молекулярной спектроскопии. Данные методы основаны на анализе спектров, содержащих спектральные линии, характерные для электронных и колебательных переходов в молекулах, образующих клетки и их окружение – белки, нуклеиновые кислоты, коллаген, воду и т.д. К таким методам относятся спектроскопия комбинационного рассеяния света (КР), флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия диффузного отражения света, большой перечень методов нелинейно-оптической спектроскопии, которые, как правило, более информативны и чувствительны по сравнению с методами линейной молекулярной спектроскопии, но более дорогостоящи и сложны для применения в клинических условиях.

В литературе описаны многочисленные подходы к оценке состояния и типа тканей с использованием методов на основе волоконно-оптических зондов. В частности, зачастую используются специальные волоконные зонды, сочетающие приемное и передающее волокно [89–91]. Поскольку операции по удалению опухолей часто выполняются с использованием волокна, доставляющего лазерное излучение для резекции ткани, большой практический интерес представляют методы оптической спектроскопии, которые можно реализовать с использованием одножильного оптоволокна. Например, наблюдение спектров диффузного отражения тканей в такой схеме возможно благодаря использованию источника света, встроенного в эндоскоп. Эффективность спектроскопии диффузного отражения в обнаружении рака *in vivo* уже доказана для различных органов [64,92], включая мочевой пузырь [6,93]. Еще одной оптической методикой, дающей многообещающие результаты в выявлении рака мочевого пузыря во время операции, является автофлуоресцентная спектроскопия [94,95]. Наконец, спектроскопия КР в области высоких волновых чисел может быть совмещена с одножильными волокнами и таким образом ее можно использовать для обнаружения рака *in*

*vivo* [5,96]. Комбинация нескольких спектроскопических методов может повысить чувствительность и специфичность при обнаружении опухолевых тканей. Например, было проведено несколько исследований с использованием мультимодальных волоконно-оптических установок для выявления опухолей мочевого пузыря *ex vivo* [94,97,98]. Однако, не было предпринято попыток обнаружения рака мочевого пузыря *in vivo* с использованием нескольких спектроскопических методик в сочетании с одножильным оптическим волокном.

Еще одним перспективным методом диагностики рака является метод визуализации времени жизни флуоресценции (FLIM - Fluorescence lifetime imaging microscopy), с помощью которого возможно картировать времена жизни флуорофоров по образцу биоткани. Они отличаются для опухоли и здоровой ткани, поскольку время жизни кофактора НАДН зависит от того, в связанном он состоянии находится или в свободном. Соотношение связанной и свободной форм НАДН напрямую зависит от метаболического состояния клетки, которое для опухоли и здоровой ткани различно. Успешные измерения *in vivo* методом FLIM уже были проведены над раком молочной железы, мозга и полости рта [99], однако для диагностики рака мочевого пузыря данный метод не использовался.

В Главе 4 данной работы для измерений раковой и здоровой тканей мочевого пузыря используются три метода из вышеперечисленных: спектроскопия КР, флуоресцентная спектроскопия (в видимом и ИК-диапазоне), а также спектроскопия диффузного отражения света.

## **1.5. Выводы**

В данной главе диссертационной работы выполнен анализ современного состояния исследований в области интраоперационной диагностики в урологии. Рассмотрены ключевые клинические задачи, для которых применение оптических методов с эндогенным контрастом является наиболее перспективным, включая навигацию при лазерной литотрипсии и

интраоперационную диагностику рака мочевого пузыря. Были также рассмотрены основные хромофоры и флуорофоры биотканей.

На основе обзора клинических и экспериментальных работ показано, что существующие методы интраоперационной диагностики обладают рядом ограничений, таких как недостаточная специфичность, необходимость введения экзогенных контрастных агентов или невозможность количественной оценки молекулярных параметров ткани. В то же время методы оптической молекулярной спектроскопии позволяют получать объективную информацию о составе и функциональном состоянии тканей в режиме реального времени и потенциально могут быть реализованы с использованием стандартных хирургических оптоволоконных инструментов.

## Глава 2. Оптическая спектроскопия для интраоперационной диагностики во время лазерного дробления почечных камней

В главе используются материалы публикаций [А5, А6] и патента<sup>1</sup>.

Лазерная литотрипсия, являясь основным методом дробления конкрементов, демонстрирует высокую эффективность при работе с камнями различного состава благодаря возможности использования гибких уретероскопов, обеспечивающих доступ в труднодоступные отделы почечной лоханки. Однако в ходе процедуры существует риск миграции конкремента из зоны облучения, что может привести к повреждению слизистой оболочки с последующим развитием осложнений. Точность выполнения хирургического вмешательства и сохранность слизистой при фрагментации камней в настоящее время полностью зависят от визуальной оценки операционного поля и скорости реакции хирурга (Рис. 2.1).



Рисунок 2.1. Использование системы распознавания типа ткани (слизистая/конкремент) перед оптоволоком во время лазерной литотрипсии.

В данной главе была разработана система распознавания типа ткани (мягкая ткань/почечный камень) перед хирургическим оптоволоком на основе метода СДО с перспективой интеграции в коммерческие хирургические лазерные системы. Для этого были проведены эксперименты *in*

<sup>1</sup> Андреева В.А., Армаганов А.Г., Баранов А.И., Будылин Г.С., Евтихийев Н.Н., Злобина Н.В. (Корнева Н.В.), Камалов А.А., Камалов Д.М., Коваленко А.А., Никитин Д.Г., Сорокин Н.И., Церегородцева П.С., Ширшин Е.А. Способ распознавания объекта при лазерной литотрипсии с использованием алгоритма цифровой обработки отраженного от него света // Патент № RU 2824800 C1 (Российская Федерация), заявка № 2023117658, заявл. 03.07.2023, опубл. 13.08.2024.

*in vivo*, в ходе которых был собран оптический отклик от мягких тканей и почечных камней во время лазерной литотрипсии, а затем были разработаны классификационные модели, способные определять на основе спектров СДО тип ткани перед оптоволоком в режиме реального времени.

## 2.1. Объекты и методы исследования

### 2.1.1. Экспериментальная установка

Для регистрации спектров отражения от различных тканей *in vivo* использовалась следующая конфигурация измерений (рис. 2.2). Оптическая часть тулиевого лазерного лазера (ТВЛ) Urolase MAX («VPG Laserone»,  $\lambda_{\text{exc}}=1940$  нм) была модифицирована: с помощью светоделителя часть спектра и небольшая доля отраженного ИК-излучения направлялись на внешний порт системы. Данный порт использовался для подключения собранной оптической схемы с помощью оптоволоконна (NA=0.22, диаметр 365 мкм). Для сбора отраженного отклика применялось хирургическое оптическое волокно (NA=0.22, «VPG Laserone») с диаметром сердцевины 150, 200, 365, 550 или 940 мкм, подключенное к ТВЛ и одновременно используемое для доставки дробящего ИК-излучения.

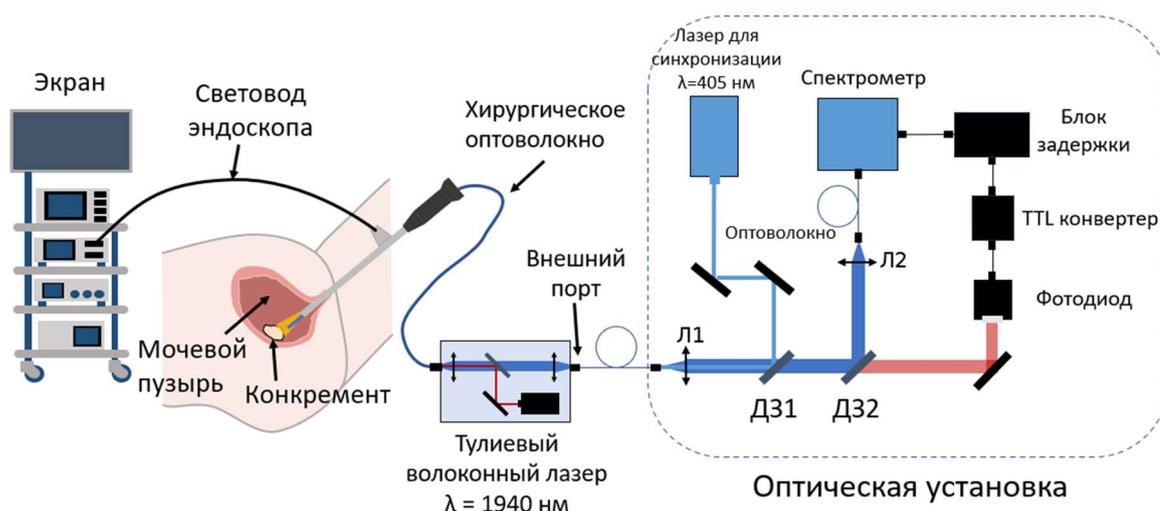


Рисунок 2.2. Схема экспериментальной установки для измерений спектров диффузного отражения во время лазерной литотрипсии *in vivo* (показана для измерений в мочевом пузыре). Л – линза, ДЗ – дихроичное зеркало.

Пространственный размер области детектирования зависит как от рабочего расстояния между оптоволоконном и объектом, так и от диаметра волокна. Эффективно дробление производится на расстояниях не более чем 2 мм, при этом учитывая числовую апертуру хирургического волокна максимальный диаметр пятна будет равен сумме диаметра волокна и 0.7 мм. При расстояниях между оптоволоконном и тканью больше, чем 2 мм, основную роль начинает играть рабочее расстояние и, следовательно, увеличивается область детектирования. Например, для мочевого пузыря диаметр пятна детектирования может достигать 30 мм при условии, что используется волокно диаметром 940 мкм и рабочее расстояние составляет 10 мм. В мочеточнике максимально возможное рабочее расстояние составляет примерно 5 мм, а диаметр волокна 365 мкм, поэтому диаметр пятна будет составлять 2 мм. Глубина детектирования видимого излучения в мягкой ткани оценивается в несколько десятых миллиметра, как было показано в работе [100].

В качестве источника освещения для реализации метода СДО использовался осветитель уретроскопа. Спектры диффузного отражения регистрировались с помощью спектрометра Maya 2000 Pro (Ocean Optics, США) в спектральном диапазоне от 450 до 650 нм. Время накопления составляло 8 мс, за исключением случаев, когда использовалась эндоскопическая стойка Olympus, в этом случае время накопления составляло 20 мс. Для увеличения интенсивности регистрируемого сигнала входная щель спектрометра была убрана, разрешение спектров при этом составляло 13 нм. Для разделения видимого и ИК спектральных каналов применялись длинноволновые дихроичные зеркала. Для синхронизации видеопоследовательности с камеры эндоскопа с записываемыми спектрами отражения использовался лазер (KLM-405-200, Sintrec Optronics Technology) с длиной волны возбуждения 405 нм.

Для регистрации спектров между импульсами ИК-лазера была реализована система внешней синхронизации спектрометра. Для этого использовался фотодиод (детектор PbSe, 1.5-4.8 мкм, PDA20H-EC, Thorlabs) для регистрации ИК-излучения, поступающего в оптическую схему. Данный диапазон выделялся с помощью длинноволнового дихроичного зеркала ДЗ2. Во время лазерных импульсов излучение, отраженное от волокна, регистрировалось фотодиодом, который был подключен к TTL-преобразователю (Time to live – время жизни пакета), отправляющему синхроимпульс TTL на контроллер.

Данный контроллер при получении сигнала от фотодиода отправляет сигнал с регулируемой задержкой на синхровход спектрометра таким образом, что измерения проводятся между ИК-импульсами лазера, а окончание измерения совпадает с передним фронтом следующего импульса. Таким образом, задержка может быть рассчитана исходя из частоты повторения лазерных импульсов. В программе регистрации данных частота повторения импульсов определялась автоматически путем вычисления среднего времени между последними 10 импульсами.

Когда контроллер не обнаруживал TTL-синхроимпульсы в течение времени, соответствующего 5 периодам лазерных импульсов, он переключался в режим внутренней синхронизации. В этом режиме он генерировал импульсы с регулируемой частотой, что позволяло измерять спектры при выключенном лазере в отсутствие внешнего запуска.

Оптическая установка была размещена на мобильной тележке (рис. 2.3А), что позволяло проводить измерения в операционной (рис. 2.3Б). Для записи спектров использовалась специальная программа, разработанная на Python. Для считывания данных со спектрометров использовался пакет seabreeze. Программное обеспечение позволяло пользователям наблюдать изменения основных спектральных параметров в режиме онлайн и сохранять спектральные данные для последующей обработки.



Рисунок 2.3. А - Фотография эндоскопической стойки, тулиевого волоконного лазера (ТВЛ) и экспериментальной оптической установки. Б – Общий вид установки в операционной.

### 2.1.2. Дизайн исследования

Измерения *in vivo* выполнялись в ходе лазерной литотрипсии у 22 пациентов с диагностированной мочекаменной болезнью на базе Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного института МГУ. От всех участников исследования было получено информированное согласие. В зависимости от типа оперативного вмешательства использовался либо ригидный эндоскоп Olympus, подключенный к эндоскопической платформе Visera Elite II (с тремя светодиодами в качестве источника света), либо гибкий уретроскоп LithoVue™ производства Boston Scientific (источник освещения содержит два светодиода, диапазон 375-800 нм). Соответствующие спектры осветителей использовавшихся эндоскопов представлены на рисунке 2.4. Следует отметить, что в установке использовалось длинноволновое дихроичное зеркало ДЗ2 с длиной волны отсечки 660 нм (FF660-Di02, Semrock, Rochester, NY, USA). Следовательно, отражённый сигнал при измерениях *in vivo* регистрировался на длинах волн до 660 нм.

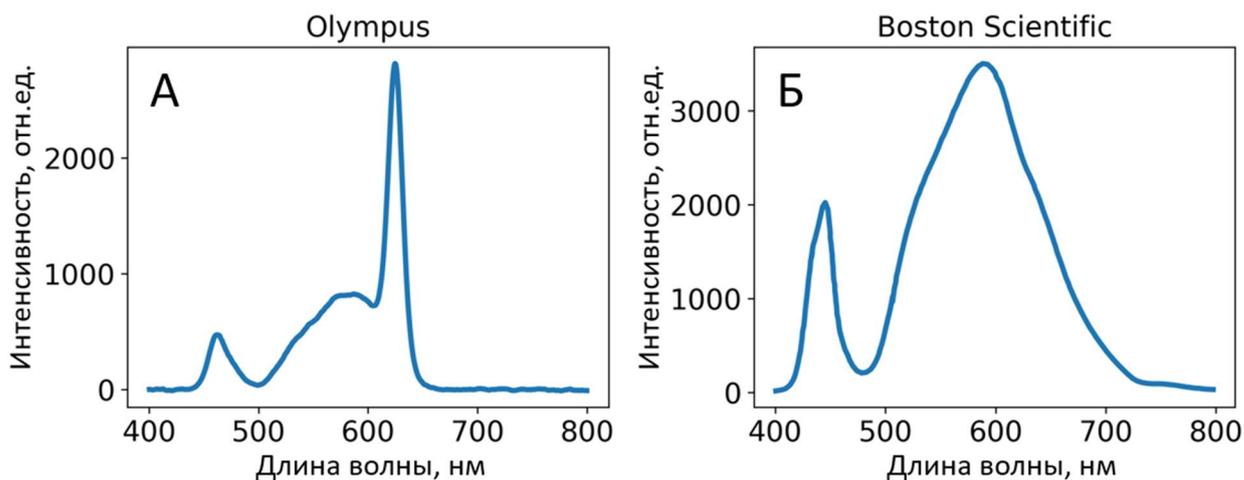


Рисунок 2.4. Спектры осветителей эндоскопов, использовавшихся для измерений во время операций. А – Olympus Visera Elite II с 3 светодиодами; Б – гибкий уретероскоп LithoVue™ (Boston Scientific) с 2 светодиодами.

Перед началом литотрипсии в течение 5-7 минут осуществлялась непрерывная регистрация отраженных сигналов от мягких тканей и конкрементов. В ходе измерений хирург изменял расстояние между торцом оптического волокна и различными участками мягких тканей и камней (от 0 мм до 1 см или максимально возможного расстояния). После этих манипуляций проводилась лазерная литотрипсия, в процессе которой также непрерывно записывались спектры отражения (в отсутствие лазерного излучения – с частотой от 10 до 50 Гц и во время лазерного воздействия – в промежутках между импульсами).

Наблюдение операционного поля во время спектроскопических измерений и хирургического вмешательства осуществлялось с помощью камеры уретероскопа. Для синхронизации записанных спектров с видеозаписью в конце процедуры литотрипсии подавалась последовательность импульсов диодного лазера с длиной волны 405 нм известной длительности.

После каждого оперативного вмешательства выполнялись два калибровочных измерения: регистрация фонового спектра и референсного спектра источника освещения. Референсный спектр  $I_{ref}(\lambda)$  измерялся с

использованием специально разработанного эталона с отражающей поверхностью из политетрафторэтилена (ПТФЭ), откалиброванного по стандарту LabSphere (99% коэффициент отражения).

### 2.1.3. Измерения *ex vivo*

Для измерений *ex vivo* в качестве источника использовалась лампа накаливания вместе с хирургическим оптическим волокном с диаметром жилы 150 мкм (NA=0.22, «VPG Laserone»). Волокно было напрямую подключено к спектрометру Maya 2000 Pro (Ocean Optics, США). Спектры регистрировались в диапазоне 400–1050 нм. Эксперимент проводился в емкости, заполненной дистиллированной водой.

Спектры отражения регистрировались от ткани говяжьей почечной лоханки и четырех типов конкрементов: моногидрата оксалата кальция, гидроксиапатита, цистинового и уратного камней. Все конкременты имели чистый состав, подтвержденный методом инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием. Мочевые камни были предоставлены МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова. Измерения проводились на расстоянии 1 мм между торцом волокна и поверхностью образца.

### 2.1.4. Обработка спектров диффузного отражения

Зарегистрированные спектры отражения обрабатывались с использованием языка программирования Python и ряда научных библиотек (numpy, scipy, sklearn). Сначала проводилась фильтрация спектров отражения, по нескольким критериям: превышение пределов чувствительности спектрометра (насыщение сигнала), критерий генерации плазмы, критерий низкой интенсивности сигнала, а также критерий измерения спектра во время действия лазерного импульса. Подробное описание указанных критериев (рисунок 2.5):

1. **Критерий генерации плазмы:** Средняя интенсивность в диапазоне длин волн 670–690 нм,  $I(670 \text{ нм}–690 \text{ нм}) > 3000$  (Рисунок 2.5А).

2. **Критерий измерения спектра во время импульса ИК-лазера:**  $I(1040 \text{ нм}) - I(1005 \text{ нм}) > 100$  (Рисунок 2.5Б). Спектры, измеренные во время лазерных импульсов, наблюдались при быстром переключении режима фрагментации хирургом, например, при нажатии соседней лазерной педали.
3. **Критерий превышения предельного значения интенсивности (насыщение сигнала):** Интенсивность  $I(\lambda) > C = 63500$  (Рисунок 2.5В).
4. **Критерий спектра с низкой интенсивностью:**  $I(\lambda) - I_{\text{dark}}(\lambda) < 110$ , где  $\lambda$  соответствует длинам волн в диапазоне 550–600 нм (Рисунок 2.5Г).

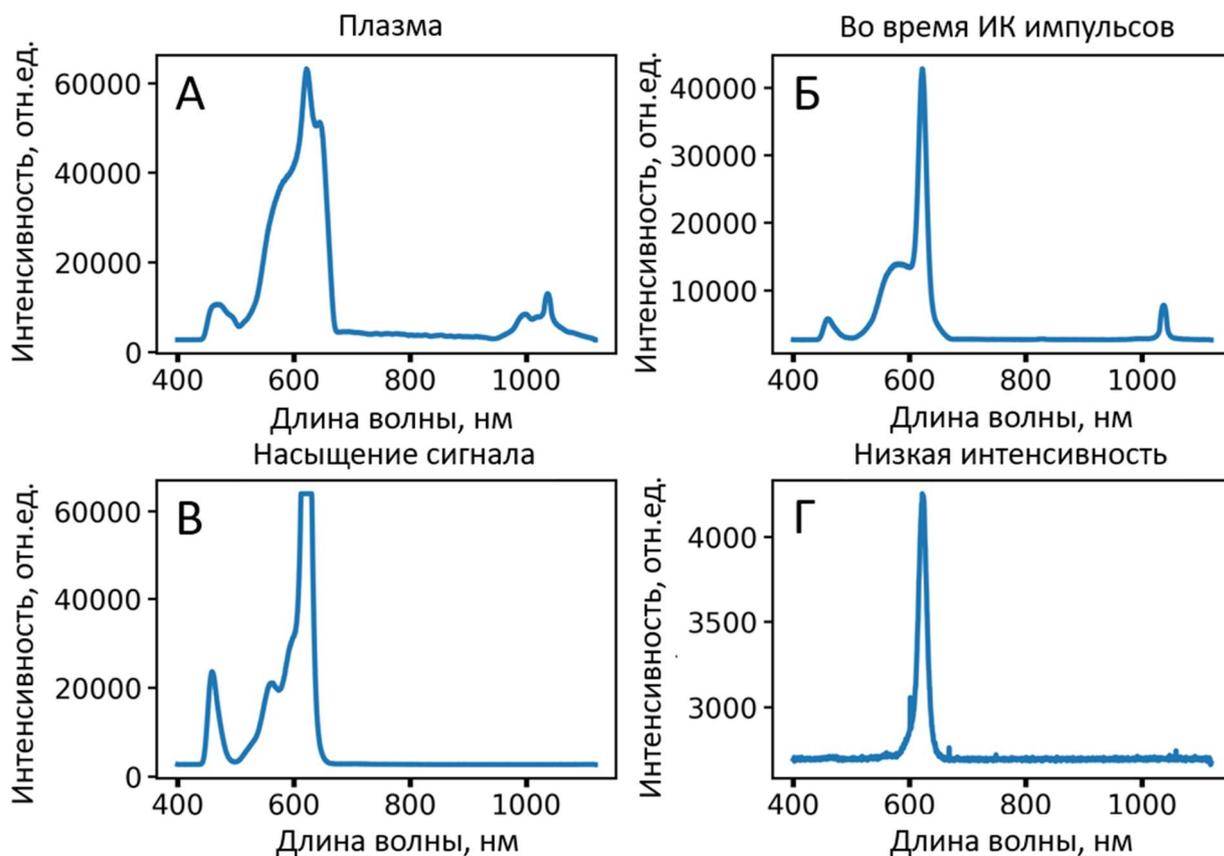


Рисунок 2.5. А – Спектр отражения, соответствующий критерию генерации плазмы. Б – Спектр отражения, измеренный во время импульса ИК-лазера. В – Спектр отражения, соответствующий превышению предельного значения интенсивности (насыщению сигнала). Г – Спектр отражения с низкой интенсивностью.

На следующем этапе выполнялась коррекция уровней темного, референсного спектров отражения и спектров отражения от ткани путем вычитания среднего значения интенсивности в диапазоне длин волн 300-310 нм. Данный подход основан на том, что реальная интенсивность в данной спектральной области равна нулю, а любые ненулевые значения обусловлены паразитной засветкой внутри спектрометра, которая при отсутствии насыщения детектора равномерно распределена по всем пикселям.

После этого проводилось сглаживание спектров отражения от ткани, источника освещения и фонового сигнала методом скользящего среднего с окном 5 нм. По завершении всех указанных процедур вычислялась оценка эффективной оптической плотности:

$$OD(\lambda) = -\log_{10} \frac{I(\lambda) - I_{dark}(\lambda)}{I_{ref}(\lambda) - I_{dark}(\lambda)}, \quad (2.1)$$

где  $OD(\lambda)$  — эффективный спектр оптической плотности,  $I(\lambda)$  — спектральный сигнал, отраженный от ткани,  $I_{ref}(\lambda)$  — референсный спектр,  $I_{dark}(\lambda)$  — фоновый спектр.

Для измерений *ex vivo* оценка эффективной оптической плотности также выполнялась по формуле (2.1), но без процедур предварительной обработки. После этого спектры ослабления были сглажены методом скользящего среднего с окном в 10 нм.

### 2.1.5. Классификация

Классификация производилась для спектров ослабления, полученных на *in vivo* измерениях.

Перед обучением классификатора необходимо сопоставить спектр и тип ткани, которому он соответствует. Каждому видеокадру присваивалась информация о типе ткани с помощью ручной разметки видеоряда с эндоскопической стойки. Видеофрагменты, в которых невозможно было определить направление волокна, исключались из анализа. К таким ситуациям

относятся случаи, когда волокно не видно из-за пузырьков воздуха, взвеси фрагментов камня во время литотрипсии, интенсивного кровотечения или в других ситуациях.

На точность классификации существенно влияют два фактора: наличие интенсивного кровотечения перед камнем и присутствие участков коагулированной ткани. Кровотечение усложняет классификацию, поскольку соответствующие спектры отражения схожи со спектрами от мягких тканей. Коагулированная ткань визуально отличается более светлым оттенком по сравнению со здоровой тканью из-за сниженной васкуляризации. В связи с этим была произведена разметка четырех типов ткани: конкремент, неповрежденная мягкая ткань, коагулированная мягкая ткань и кровотечение перед камнем.

Перед классификацией выполнялась стандартизация признаков для каждого спектра. Были использованы два подхода с различными моделями классификации. В первом подходе снижение размерности осуществлялось методом главных компонент (PCA – Principal component analysis) с последующей стандартизацией признаков, после чего применялась логистическая регрессия. Во втором подходе в качестве модели использовался линейный дискриминантный анализ (LDA – Linear discriminant analysis).

Для обучения классификаторов использовались случайно отобранные спектры из 12 операций, по 200 спектров каждого из четырех подклассов (неповрежденная мягкая ткань, камень без кровотечений, а также кровотечения на фоне камня и коагулированная ткань, если они присутствовали на операции) с каждой операции (с одной операции в тренировочную выборку могло быть отобрано максимум 800 спектров). Таким образом, для обучения использовался всего 6031 спектр: 2259 для неповрежденной слизистой, 2358 для камня без кровотечения, 400 для кровотечений на фоне камня и 1044 для коагулированной ткани. При этом подклассы «коагулированная ткань» и «неповрежденная мягкая ткань» для

задачи бинарной классификации приравнивалась к классу «мягкая ткань», а измерения, отмеченные как «кровотечения на фоне камня» и «камень без кровотечений» приравнивались к классу «камень». Подбор оптимальных гиперпараметров осуществлялся при помощи погрупповой кросс-валидации, где в качестве группы выступали спектры с одной операции. Качество классификации рассчитывалось на спектрах с остальных 10 операций (78321 спектр, из них 11694 спектра от неповрежденной мягкой ткани, 64964 – от камня без кровотечения, 262 – кровотечение на фоне камня, 1401 – от коагулированной ткани).

Также проводилась оценка чувствительности и специфичности, где чувствительность определялась как точность определения мягких тканей, а специфичность - как точность обнаружения конкрементов перед волокном:

$$Sensitivity = \frac{TP}{TP + FN}, \quad (2.2)$$

$$Specificity = \frac{TN}{TN + FP}, \quad (2.3)$$

где TP — правильно идентифицированная мягкая ткань, TN — правильно идентифицированный конкремент, FP — неправильно идентифицированный камень, FN — неправильно идентифицированная ткань. Данная оценка точности проводилась как для более общих классов «мягкая ткань» и «камень», так и для модели с четырьмя подклассами (неповрежденная слизистая/камень/кровотечение/коагулированная ткань).

## 2.2. Результаты

### 2.2.1. Измерения спектров СДО от мягкой ткани и камней *ex vivo*

Результаты измерений *ex vivo* в водной среде представлены на рисунке 2.6. Из существенных отличий в спектрах эффективной оптической плотности можно выделить различный наклон спектра, который для уратного и цистинового камня наибольший (рисунок 2.6В-Г) и наименьший для гидроксиапатита и оксалатного камня (рисунок 2.6А-Б), что связано с

окраской камня (см. изображения камней на рисунке 2.6Е-И). Однако несмотря на вариабельность спектров ослабления между различными конкрементами они существенно отличаются от спектров почечной лоханки: в спектре ослабления мягкой ткани присутствуют пики поглощения оксигемоглобина и дезоксигемоглобина (рисунок 2Д), спектр ослабления от конкрементов таких особенностей не имеет. Таким образом по спектрам диффузного отражения становится возможным отличить конкремент от мягкой ткани.

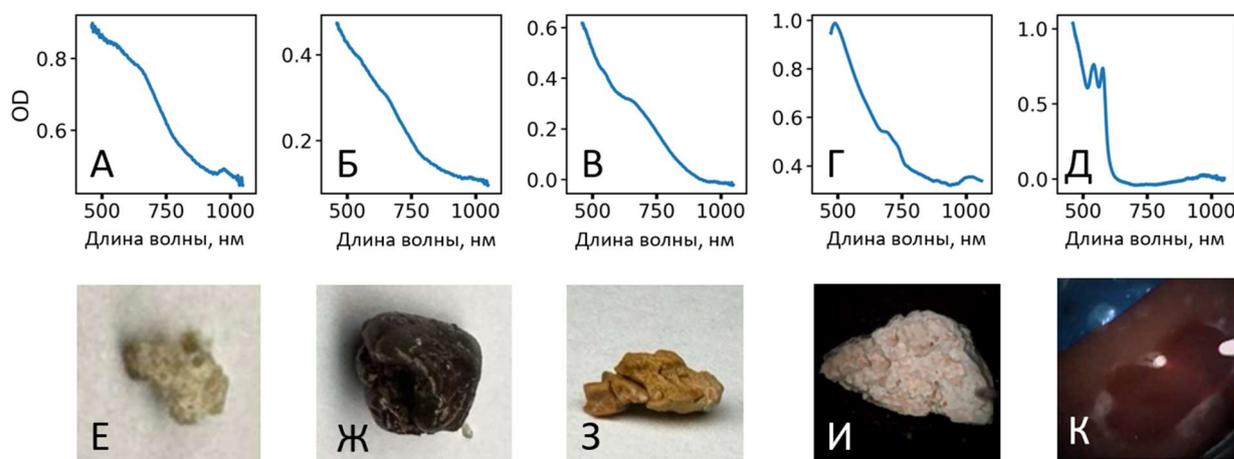


Рисунок 2.6. (А–Д). Спектры эффективной оптической плотности различных типов конкрементов и ткани говяжьей почечной лоханки в водной среде: (А) Гидроксиапатитовый камень, (Б) Оксалатный камень, (В) Уратный камень, (Г) Цистиновый камень, (Д) Говяжья почечная лоханка. (Е–К). Изображения различных типов конкрементов и ткани почечной лоханки. (Е) Гидроксиапатитовый камень, (Ж) Оксалатный камень, (З) Уратный камень, (И) Цистиновый камень, (К) Ткань почечной лоханки.

### 2.2.2. Измерения спектров диффузного отражения во время лазерной литотрипсии

При проведении *in vivo* измерений методом спектроскопии диффузного отражения во время лазерной литотрипсии анализировались оптические сигналы от мягких тканей и конкрементов у 22 пациентов. Из них 3 операции были выполнены в мочевом пузыре, 7 – в мочеточнике, 12 – в почечной

лоханке. При проведении процедур использовались как импульсы прямоугольной формы (с энергией от 0.2 до 8 Дж), так и специальный режим модуляции лазерного импульса (Advanced Fragmentation Pulse - AFP) для повышения эффективности фрагментации [101]. Режим AFP представляет собой последовательность суб-импульсов. При использовании режима AFP для повышения эффективности фрагментации суммарная энергия серии импульсов достигала 40 Дж. Коагулированная ткань присутствовала и была измерена на 10 из 22 операций, тогда как интраоперационное кровотечение наблюдалось в 4 случаях.

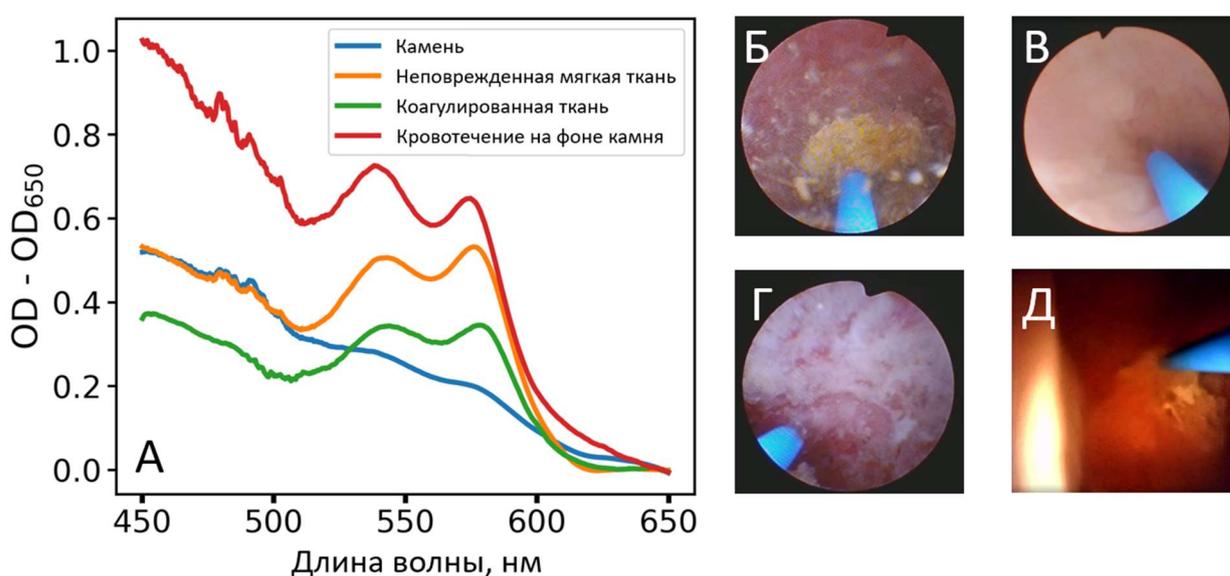


Рисунок 2.7. А) Усредненные спектры ослабления по всем операциям в моменты, когда волокно направлено на камень, неповрежденную мягкую ткань, коагулированную мягкую ткань и на кровотечение на фоне камня. Б)-Д) Кадры видеопоследовательности с камеры уретроскопа, где волокно направлено на: камень (Б), неповрежденную мягкую ткань (В), коагулированную мягкую ткань (Г), кровотечение на фоне камня (Д).

На рисунке 2.7А представлены усредненные спектры ослабления по всем операциям в моменты, когда волокно направлено на камень (рисунок 2.7Б), неповрежденную мягкую ткань (рисунок 2.7В), коагулированную мягкую ткань (рисунок 2.7Г) и на кровотечение на фоне

камня (рисунок 2.7Д). У коагулированной ткани характерный двойной пик гемоглобина меньше выражен по сравнению с неповрежденной тканью. При наличии кровотечения на фоне камня особенность, связанная с гемоглобином, появляется, однако все равно в меньшей степени, чем у коагулированной ткани – правая часть пика около длины волны 575 нм заметно ниже, чем у мягкой ткани. Таким образом, становится возможным отличить коагулированную мягкую ткань от камня и кровотечения на фоне камня от мягкой ткани.

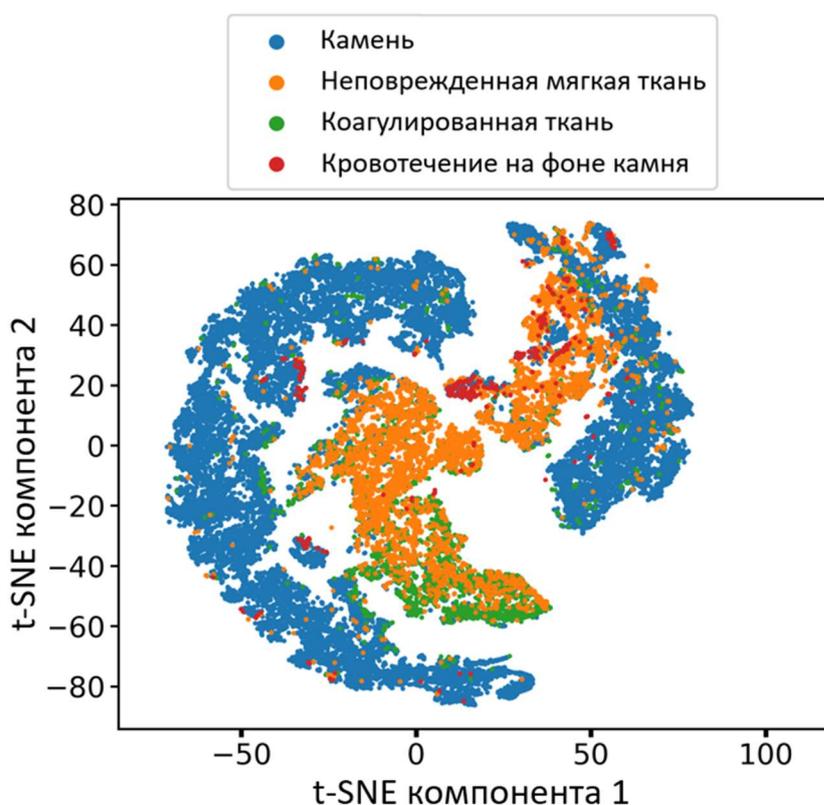


Рисунок 2.8. Результаты применения метода главных компонент (PCA) в сочетании с подходом t-SNE для спектров ослабления, измеренных в ходе 22 операций, когда волокно направлено на камень, неповрежденную мягкую ткань, коагулированную мягкую ткань и кровотечение на фоне камня. Значение параметра perplexity = 100.

На рисунке 2.8 представлены все измеренные данные. Эти данные были получены путем понижения размерности спектров эффективной оптической плотности до двух компонент. Сначала размерность была уменьшена до 10

компонент с помощью метода главных компонент (PCA), а затем — до двух компонент с использованием стохастического вложения соседей с  $t$ -распределением (t-SNE). Этот подход широко применяется для визуализации биомедицинских данных благодаря его наглядности и вычислительной производительности [102].

На рисунке 2.8 видны два отчетливых и хорошо разделенных кластера: один из них представляет точки, соответствующие камню, а другой — точки, соответствующие неповрежденной и коагулированной ткани. Точки, связанные с кровотечением, распределены примерно равномерно между этими двумя кластерами. В целом, результаты демонстрируют четкое разделение между камнями и мягкой тканью (включая коагулированную).

### **2.2.3. Оценка эффективности моделей классификации**

Для предсказания типа объекта перед волокном (конкремент или мягкая ткань) использовались две модели: логистическая регрессия с анализом главных компонент для снижения размерности (PCA+LogReg) и линейный дискриминантный анализ (LDA). В Таблице 1 показаны значения точности определения объектов перед волокном, полученные с помощью данных моделей. Первоначально обучение и тестирование проводились на наборе данных без случаев кровотечения на фоне конкремента и участков коагулированной ткани. Качество классификации оценивалось с помощью ROC-кривой (Receiver operating characteristic curve), которая показывает зависимость чувствительности алгоритма от частоты ложноположительных результатов (равной 1 - специфичность). Площадь под кривой (AUC – area under curve) на тестовых данных для таких моделей составила 0.99, что свидетельствует о высоком качестве классификации (Таблица 2.1). Значения чувствительности на тестовых данных при пороге классификации 0.5 составили 90.1% для модели PCA+LogReg и 83.4% для модели LDA, тогда как специфичность достигла 97.6% и 98.3% соответственно.

Таблица 2.1. Качество классификации на всех операциях для моделей, определяющих мягкую ткань и конкременты.

<b>Модель</b>	<b>Точность определения мягкой ткани</b>	<b>Точность определения конкрементов</b>	<b>Точность определения коагулированной ткани</b>	<b>Точность определения кровотечения на фоне камня</b>	<b>AUC</b>
PCA + LogReg	94±8%	96±4%	-	-	0.99
LDA	90±12%	97±3%	-	-	0.99
PCA + LogReg с кровотечениями и коагулированными тканями	94±8%	88±12%	72±27%	71±30%	0.96
LDA с кровотечениями и коагулированными тканями	93±9%	93±9%	67±30%	80±29%	0.97

На следующем этапе обучение и предсказание проводились на данных, включающих все типы мягких тканей и конкрементов вместе с кровотечением на фоне камня и коагулированной тканью (Рисунок 2.9А-Б). Эта оценка позволила проанализировать работу моделей в условиях наличия осложняющих факторов. Значения AUC на тестовых данных для моделей PCA+LogReg и LDA составили 0.96 и 0.97 соответственно (Рисунок 2.9В), что несколько ниже показателей, полученных при обучении на данных без учета кровотечения и поврежденной ткани.

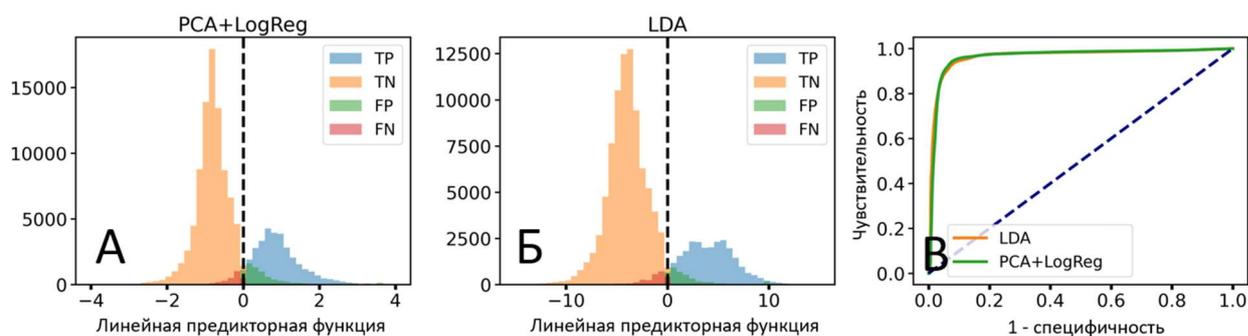


Рисунок 2.9. (А,Б) – Гистограммы значений линейной предикторной функции для измерений мягких тканей и камней для двух моделей классификации: А – Анализ главных компонент (PCA) + Логистическая регрессия (LogReg), Б – Линейный дискриминантный анализ (LDA). В – Расчетная ROC-кривая. AUC, значение площади под кривой.

В Таблице 1 представлены соответствующие значения чувствительности и специфичности для всех операций при пороге классификации 0.5 для различных объектов перед волокном, оцененные с использованием разных моделей. Окончательные значения метрик чувствительности и специфичности были получены следующим образом: для каждой из 22 операций чувствительность и специфичность рассчитывались отдельно, после чего вычислялись среднее арифметическое и стандартное отклонение каждой метрики. Эти расчеты проводились как для общих категорий "мягкая ткань" и "конкремент", так и для подклассов "коагулированная мягкая ткань" ( $Sensitivity^{(coag)}$ ) и "кровотечение на фоне конкремента" ( $Specificity^{(bleeding)}$ ).

Точность распознавания коагулированной ткани у моделей, обученных на всех типах мягких тканей и конкрементов, оказалась ниже, чем для неповрежденной мягкой ткани. Это объясняется тем, что в большинстве случаев длительное воздействие лазерного излучения вызывает значительную коагуляцию, что приводит к снижению концентрации гемоглобина, и характерные признаки, присущие спектрам поглощения окси- и дезоксигемоглобина, пропадают на спектрах эффективной оптической

плотности. Высокая вариабельность точности идентификации коагулированной ткани и кровотечения на фоне конкремента связана с низким качеством классификации на отдельных операциях, тогда как в других случаях точность распознавания коагулированной ткани была сопоставима с неповрежденной тканью. В 4 из 10 операций с наличием коагулированной ткани точность ее распознавания не превышала 50%. Что касается кровотечения на фоне конкремента, в 3 из 4 операций точность идентификации была сравнима с точностью определения конкремента без кровотечения. На рисунке 2.10 представлены примеры случаев, когда наша система идентифицировала кровотечение на фоне камня как камень (рисунок 2.10А-Б) и как мягкую ткань (рисунок 2.10В-Г).

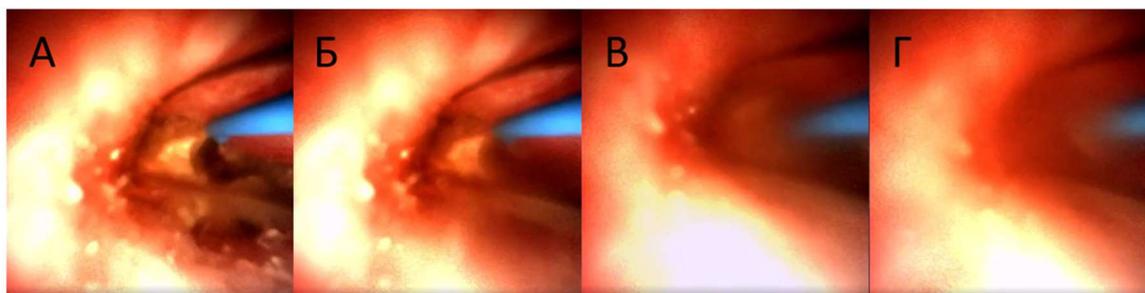


Рисунок 2.10. Кадры с операции, на которой наблюдалось кровотечение на фоне камня. А,Б – моменты, в которые алгоритм правильно определил кровотечение на фоне камня как камень. В,Г – моменты, в которые алгоритм неправильно определил кровотечение на фоне камня как камень. Такие моменты назывались «сильным кровотечением».

На рисунке 2.11 показана работа алгоритма PCA+LogReg, обученного на спектрах диффузного отражения от мягких тканей и конкрементов, включая коагулированную ткань и кровотечение на фоне камня. В представленном временном интервале волокно первоначально направлено на конкремент (момент В), затем соскальзывает на мягкую ткань (момент С), после чего возвращается к конкременту (момент D). Кинетика значений линейной предикторной функции демонстрирует мгновенную реакцию алгоритма на изменение объекта перед оптическим волокном.

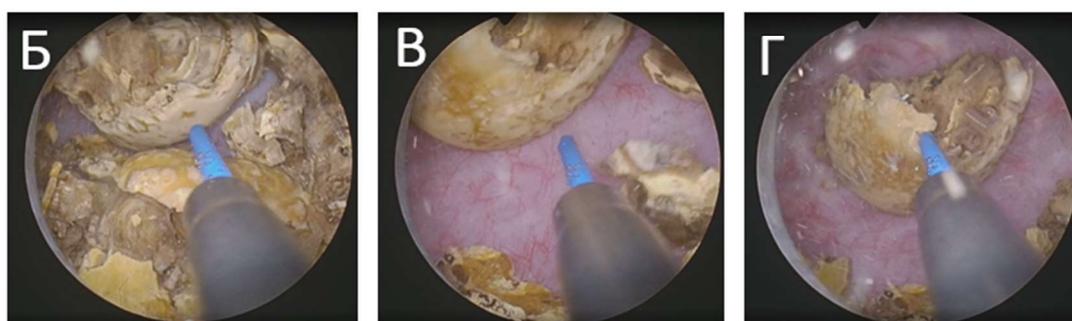
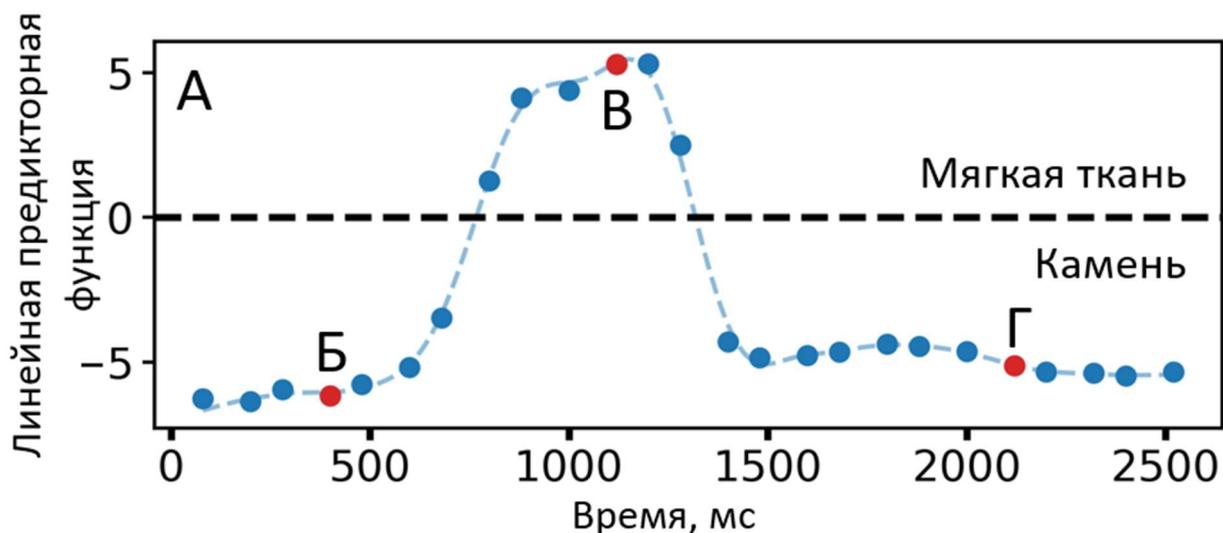


Рисунок 2.11. Пример работы алгоритма PCA+LogReg во время дробления камня в мочевом пузыре. А – зависимость линейной предикторной функции от времени. Б-Г – эндоскопические изображения, соответствующие моментам на панели А (отмечены красными точками и соответствующими буквами).

Во время процедуры лазерной литотрипсии также часто возникает ситуация, когда ухудшается видимость из-за частичек пыли от камня при его дроблении. Однако было показано, что данный эффект не влияет на точность определения камня разработанным алгоритмом. На рисунке 2.12 показан один из таких эпизодов, произошедший во время процедуры дробления камня в почке гибким уретероскопом.

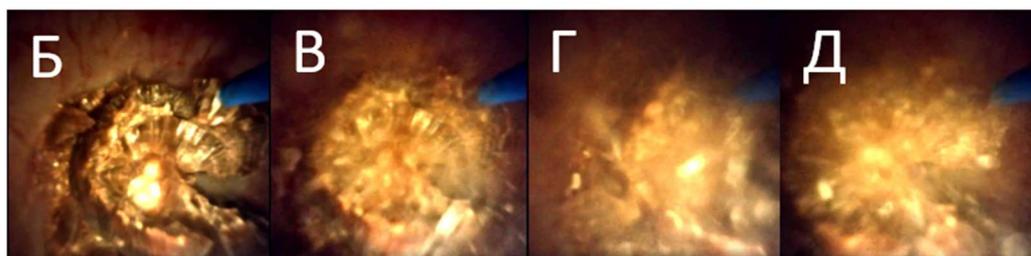
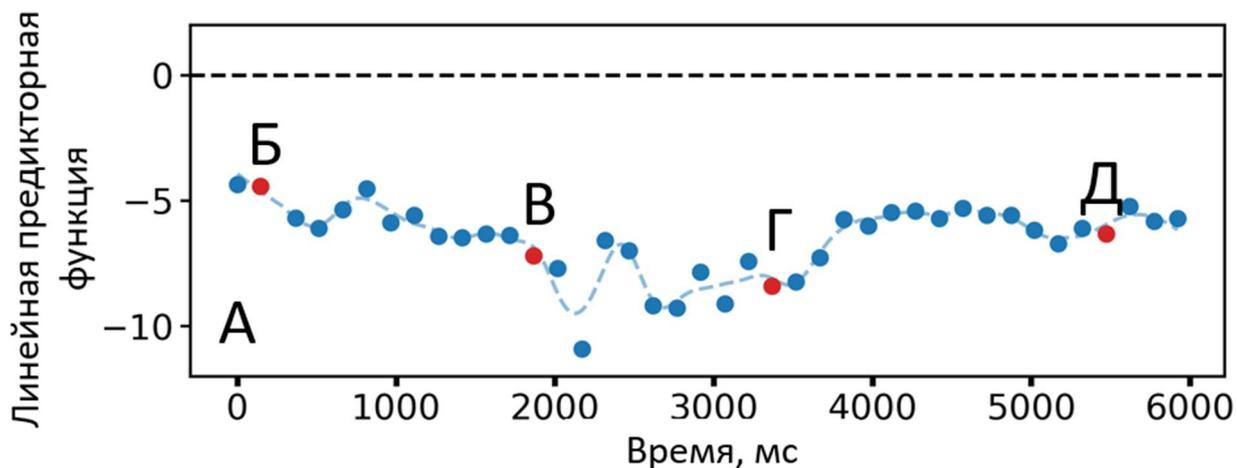


Рисунок 2.12. Пример работы алгоритма PCA+LogReg во время фрагментации камня в почке при плохой эндоскопической видимости из-за частиц каменной пыли. А – зависимость значений линейной предикторной функции от времени. Б-Д – изображения с эндоскопа, соответствующие моментам, отмеченным на панели А (красными точками и соответствующими буквами).

### 2.2.3. Классификация наличия хирургических инструментов

Дополнительно была разработана модель, предсказывающая наличие вспомогательного хирургического инструмента перед волокном, например, корзинок для извлечения камней или струны-проводника, используемого для создания направляющего канала в мочевыводящих путях. Поскольку лазерное воздействие на инструменты нежелательно, предпочтительным вариантом была бы их классификация как "мягкая ткань". Такие инструменты присутствовали на шести операциях, а именно использовались два белых проводника, два зеленых проводника, один желтый проводник и одна металлическая корзинка (Рисунок 2.13А-Е).

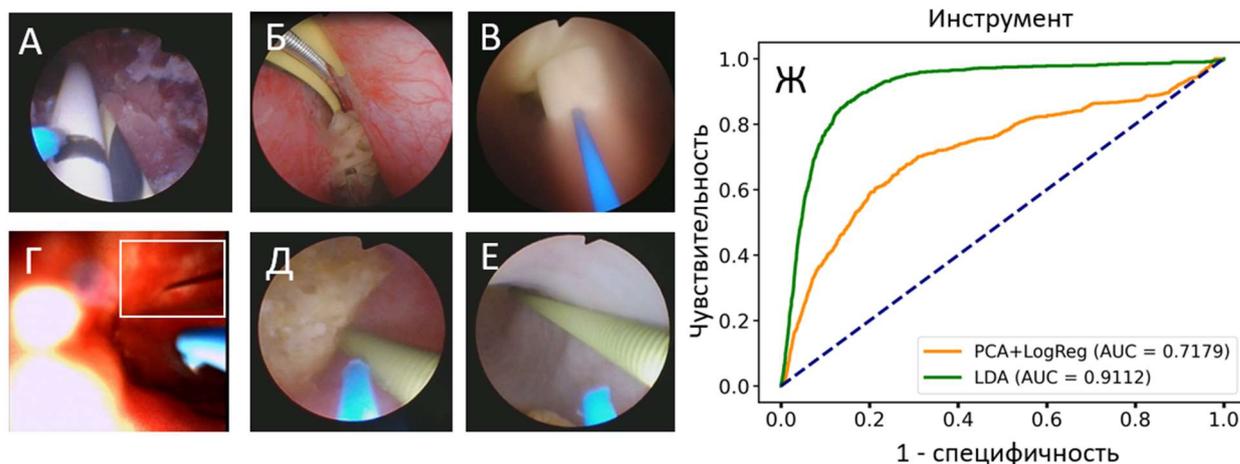


Рисунок 2.13. Изображения вспомогательных хирургических инструментов, используемых на операциях по лазерной литотрипсии. А – белый и черно-желтый проводник, Б – желтый проводник, В – белый проводник, Г – металлическая корзинка, Д – зеленый проводник, Е – зеленый проводник. Ж – Расчетная ROC кривая для алгоритмов PCA+LogReg и LDA.

Для модели PCA+LogReg значение AUC при определении инструмента составило 0.7179, тогда как для модели LDA - 0.9112 (Рисунок 2.13Ж). Следует отметить, что обе модели плохо идентифицировали белый инструмент и металлическую корзинку (точность ниже 50%). Обе модели отличали зеленые проводники от других объектов с точностью выше 50%. Модель LDA продемонстрировала 100% точность распознавания желтого проводника, в отличие от модели PCA+LogReg, показавшей нулевую точность.

### 2.3. Потенциальные области применения разработанной методики и сравнение с существующими аналогами

Разработанная система автоматического определения типа ткани имеет многочисленные потенциальные области применения. В частности, она может быть полезна при проведении лазерной литотрипсии в узком мочеточнике (Рисунок 2.14А), где значительно возрастает риск повреждения тканей, что может привести к послеоперационным осложнениям [103]. Кроме того, разработанная система особенно актуальна при ретроградной интратеральной хирургии (РИРХ) с использованием гибкого уретероскопа (Рисунок 2.14Б).

Основная сложность РИРХ заключается в непреднамеренном смещении конкремента в операционном поле из-за дыхательных экскурсий диафрагмы и грудной клетки [104], что может привести к травмам мягких тканей. Разработанный датчик тканей, интегрированный в тулиевый волоконный лазер Urolase+ («VPG Laserone») (Рис. 2.14В), успешно справился с рассмотренными клиническими сценариями.

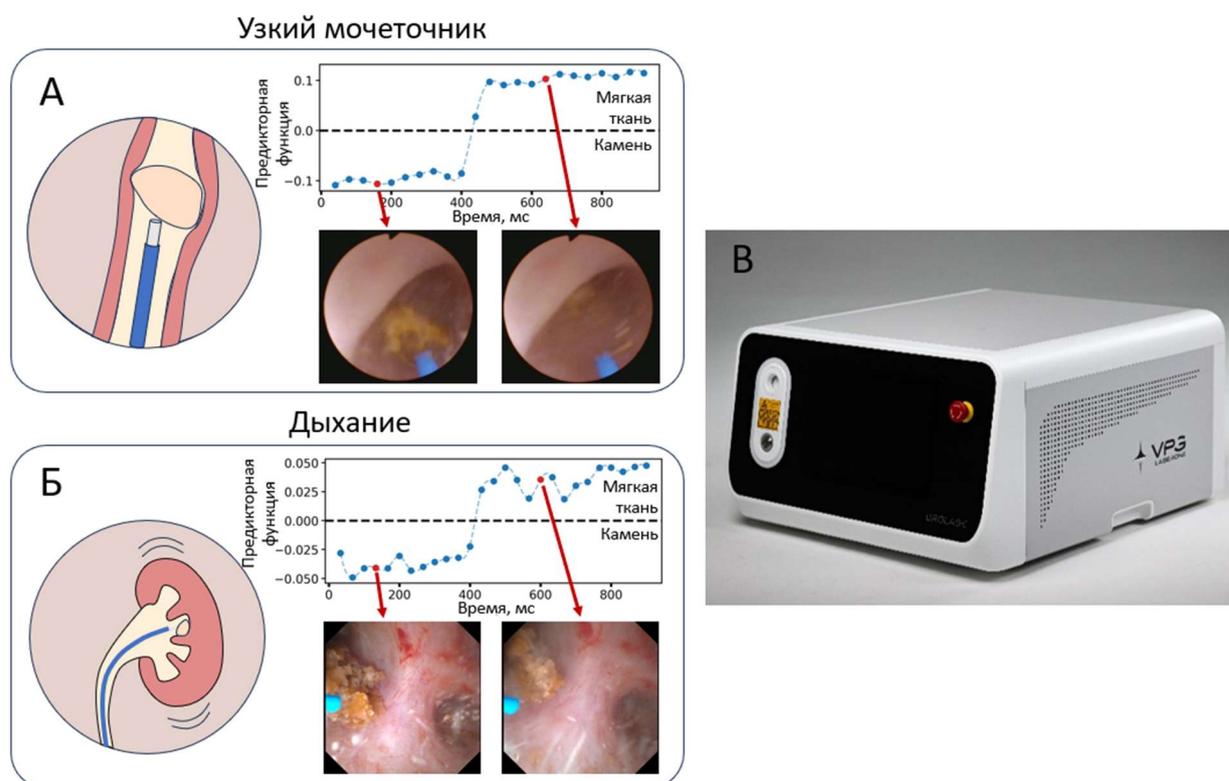


Рисунок 2.14. А-Б. Примеры использования оптического датчика для определения типа ткани во время лазерной литотрипсии: узкий мочеточник (диаметр сердцевины волокна 365 мкм, параметры лазера: средняя мощность 8 Вт, энергия импульса 0.4 Дж, частота 20 Гц) (А) и движение почки из-за дыхания пациента (диаметр сердцевины волокна 200 мкм, параметры лазера: средняя мощность 4.8 Вт, энергия импульса 0.3 Дж, частота 16 Гц) (Б). В. Тулиевый волоконный лазер Urolase+ (НТО «ИРЭ-Полюс») со встроенным датчиком ткани.

Ранее возможности спектроскопии диффузного отражения для определения типа ткани перед волокном были продемонстрированы на образцах *in vitro* и во время лазерной литотрипсии *in vivo* [15]. В эксперименте, проведенном *in vivo*, измерялись спектры отражения от различных точек мягких тканей и конкрементов на 8 операциях. Критерий мягкой ткани заключался в наличии локальных минимумов в спектрах отражения на длинах волн  $\lambda_1=(542\pm 8)$  нм и  $\lambda_2=(576\pm 8)$  нм. Точность определения мягкой ткани оказалась равной 91%, а камня – 77%. Применение данного критерия к нашим данным дает точность определения мягкой ткани 1% и конкрементов 99%. Причина заключается в том, что у осветителей эндоскопов, которые применялись во время операций, наблюдались резкие изменения интенсивности в зависимости от длины волны в рассматриваемом спектральном диапазоне (рисунок 2.4). В то же время в исследовании [15] использовался эндоскоп с ксеноновым источником света, интенсивность которого менялась незначительно с изменением длины волны. Кроме того, в данном исследовании не проводилось измерений во время подачи лазерных ИК импульсов.

Помимо спектроскопии диффузного отражения для разработки системы автоматического детектирования типа ткани активно используют тот факт, что конкременты обладают повышенной автофлуоресценцией при возбуждении зеленым лазером по сравнению с мягкой тканью. Например, было проведено исследование, в котором регистрировалась интенсивность автофлуоресценции тканей под действием возбуждения зеленым диодным лазером во время лазерной литотрипсии [105]. На основании ретроспективного анализа авторы пришли к выводу, что их алгоритм мог бы подавлять неэффективные лазерные импульсы, тем самым снижая суммарную энергию в среднем на 14% без увеличения продолжительности операции. Кроме того, использование алгоритма позволило бы почти в пять раз сократить повреждения вспомогательных хирургических инструментов. Однако стоит отметить, что

авторы не делали оценку точности определения мягкой ткани и камней и анализировали только моменты, когда подавались лазерные ИК импульсы.

В другом исследовании была разработана система обратной связи, основанная на регистрации флуоресцентных сигналов от ткани, возбуждаемых пилотным лазером. Данная система была протестирована во время лазерной литотрипсии на крупной животной модели (свиньи) с имплантированными мочевыми камнями [2]. Были исследованы повреждения, возникающие при отсутствии информации об объекте перед хирургическим волокном (т.е. при стандартной процедуре) и в случае, если энергия лазера модулировалась в зависимости от того, был ли обнаружен камень в поле зрения волокна. Эндоскопическое обследование выявило многочисленные поражения мочевыводящих путей после дробления камней, при этом степень поражения с использованием системы с обратной связью была ниже. Во всех случаях перфорации органов отсутствовали.

Для реализации системы детектирования типа ткани с использованием автофлуоресценции необходим дополнительный источник света. [57]. Часто гольмиевые и тулиевые лазеры, чье излучение невидимо для человеческого глаза, оснащаются пилотным лазером для облегчения наведения волокна на объект. Авторы исследования предлагают использовать именно его в качестве источника возбуждения. Кроме того, необходимо исключить влияние осветителя эндоскопа на регистрируемый сигнал. Для этого предлагается использовать систему, модулирующую интенсивность, например, синхронный усилитель, который позволяют минимизировать влияние засветки от осветителя эндоскопа [57].

Однако стоит отметить, что в литературе нет сведений о том, как система, основанная на регистрации флуоресцентных сигналов, будет реагировать на коагулированную ткань и кровотечение на фоне конкремента. Можно предположить, что при кровотечении автофлуоресцентный сигнал будет снижаться из-за поглощения излучения пилотного лазера гемоглобином,

что приведет к ошибочной идентификации конкремента как мягкой ткани. В этом случае подача ИК-излучения будет блокироваться, что приведет к увеличению продолжительности операции.

Авторы исследования [105] также отмечали, что усиленный флуоресцентный сигнал может наблюдаться при расположении волокна вблизи входа рабочего канала или напротив металлических поверхностей (корзинок и др.). Кроме того, интенсивность флуоресценции существенно зависит от расстояния между торцом волокна и объектом – при расстоянии 2 мм интенсивность падает примерно в три раза [106]. Для гольмиевого лазера рабочее расстояние может достигать 5 мм, например, при дроблении тонких конкрементов, поэтому в таких случаях интенсивность флуоресценции будет сопоставима с таковой для мягкой ткани [105]. В нашем методе особенности спектров эффективной оптической плотности остаются стабильными независимо от размера волокна и расстояния между волокном и объектом, что позволяет определять тип ткани на различных расстояниях и диаметрах волокна.

Регистрация отраженных сигналов не требует дополнительных источников света – в качестве него выступает осветитель эндоскопа. Он может применяться с различными моделями эндоскопов, необходимо только сделать процедуру нормировки на спектр осветителя. Для данной процедуры могут быть изготовлены специальные пригодные для стерилизации стандарты (например, из белого тефлона). Отраженные спектры можно измерять при любом расстоянии, так как главным образом мы смотрим на форму спектра, а не его интенсивность. Кроме того, регистрация спектров отражения позволяет также диагностировать облом волокна внутри рабочего канала эндоскопа, который ведет к значительному снижению сигнала.

Однако разработанный алгоритм определения типа ткани на основе спектров диффузного отражения имеет ряд ограничений. Во-первых, при дроблении конкрементов на высоких пиковых мощностях может возникать

люминесценция, вызванная образованием плазмы или сильным нагревом камня. Хотя спектры регистрировались непосредственно перед ИК-импульсами ТВЛ, часть спектров все же подвергается искажениям.

Также было замечено, что неочищенные концы волокон с синей полимерной оплеткой вызывают искажения в спектрах отражения, приводящие к ошибкам классификации. Эти искажения могут быть обусловлены частичным прохождением света через синюю оболочку и отражением от торца волокна. Поэтому для использования алгоритма необходимо удалять синюю оболочку с волокна на расстояние не менее 2 мм от кончика волокна. Данная проблема отсутствует при применении одноразовых нестерилизуемых волокон.

Несмотря на вышеперечисленные ограничения, наша система, основанная на спектроскопии диффузного отражения, позволяет с высокой точностью определять тип ткани перед волокном. Она может использоваться как с гольмиевым, так и с тулиевым лазером, с различными типами уретроскопов и различными диаметрами волокон. Система была встроена непосредственно в лазер для автоматического отключения при обнаружении конкремента перед волокном. Чувствительность и специфичность системы могут регулироваться для оптимального баланса между удобством использования и безопасностью. Например, чувствительность к мягким тканям может быть повышена при операциях в мочеточнике для увеличения безопасности или снижена для более точной идентификации конкрементов.

## **2.4. Выводы**

В данной главе исследовались возможности спектроскопии диффузного отражения для создания системы оптической обратной связи, способной определять тип объекта перед волокном во время лазерной литотрипсии. Спектры диффузного отражения регистрировались в ходе 22 оперативных вмешательств на протяжении всей процедуры, включая периоды работы лазера. Измерения проводились в различных условиях: с волокнами разного

диаметра (диаметр сердцевины от 200 до 550 мкм), двумя типами эндоскопов (жестким и гибким) и в разных отделах мочевыводящей системы.

Для разработки алгоритма, различающего спектры отражения от конкрементов и мягких тканей, были использованы методы машинного обучения. Точность определения мягких тканей составила  $93\pm 11\%$ , а точность распознавания конкрементов –  $93\pm 6\%$  (включая сложные случаи с кровотечением на фоне камня и поврежденной мягкой тканью). Кроме того, разработанный алгоритм позволяет определять вспомогательные хирургические инструменты желтого и зеленого цвета.

Разработанная система обратной связи в реальном времени предотвращает повреждение слизистой за счет автоматического отключения лазера при обнаружении мягких тканей, что существенно повышает безопасность процедуры лазерной литотрипсии. Полученные результаты представляют значительный прогресс в урологической хирургии, предлагая практическое решение для повышения точности и снижения осложнений при дроблении конкрементов. Кроме того, по результатам экспериментов был опубликован патент “Способ распознавания объекта при лазерной литотрипсии с использованием алгоритма цифровой обработки отраженного от него света”, а сама система встроена в коммерческий хирургический лазерный аппарат.

### **Глава 3. Флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия диффузного отражения для анализа состава и плотности почечных камней *in situ***

*В главе используются материалы, опубликованные в работе [A2].*

В данной главе изучается возможность применения спектроскопии диффузного отражения (СДО) и флуоресцентной спектроскопии для определения состава почечных камней в условиях измерений, максимально приближенных к интраоперационным. Были разработаны экспериментальные установки, имитирующие такие условия и реализующие методы зондирования для спектроскопии диффузного отражения и флуоресцентной спектроскопии, включая измерение трёхмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции. С помощью данных установок измерялся оптический отклик от почечных камней различного состава и плотности *ex vivo*. Полученные данные затем использовались для построения математических моделей, способных определять доминирующий тип камня (урат, оксалат или гидроксиапатит), процентное содержание данных веществ, а также плотность.

#### **3.1. Объекты и методы исследования**

##### **3.1.1. Объекты исследования**

Образцы конкрементов были предоставлены Медицинским научно-образовательным институтом МГУ имени М.В. Ломоносова. Перед проведением измерений все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного института МГУ. Конкременты были хирургически извлечены у 118 пациентов (возрастная группа – от 20 до 70 лет). После операции все камни были промыты дистиллированной водой и высушены. Размеры образцов варьировались от 1 до 10 мм. В исследуемом наборе объектов присутствовали три типа камней: гидроксиапатитовые, уратные и оксалатные.

### 3.1.2. Методы исследования

Образцы исследовались с помощью трёх методов оптической спектроскопии: спектроскопии диффузного отражения (СДО), флуоресцентной спектроскопии (измерение трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции) и ИК-Фурье спектроскопии.

Для регистрации трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции использовалась специально разработанная установка (Рис. 3.1А). Излучение от плазменного источника света (XWS-65, 400–1000 нм, мощность 20 Вт, Троицкий инженерный центр, Россия) проходило через оптическое волокно с диаметром сердцевины 550 мкм (NA 0.22, Ocean Optics, США), подключённое к входному порту монохроматора (диапазон настройки 300–700 нм, OceanOptics MonoScan2000, США). С его помощью выделялась полоса излучения шириной 10 нм (диапазон сканирования 280–480 нм с шагом 20 нм). Излучение с выхода монохроматора подавалось через оптическое хирургическое волокно (диаметр сердцевины 550 мкм, NA 0.22, IPG Photonics) на образец для возбуждения флуоресценции. Второе волокно (с аналогичными параметрами) использовалось для детектирования флуоресценции конкрементов. Волокна фиксировались в специальном держателе, обеспечивающем их симметричное расположение относительно вертикальной оси, с углом  $30^\circ$  между ними. Регистрация сигнала осуществлялась спектрометром (USB 2000, Ocean Optics, США; спектральное разрешение 0.5 нм) в диапазоне 400–1000 нм.

При обработке флуоресцентных спектров для каждой длины волны возбуждения соответствующие спектры эмиссии флуоресценции сглаживались медианным фильтром с окном 5 нм. После данной процедуры из каждого спектра выделялась спектральная область в диапазоне 500–850 нм с целью исключения диапазона рэлеевского рассеяния.

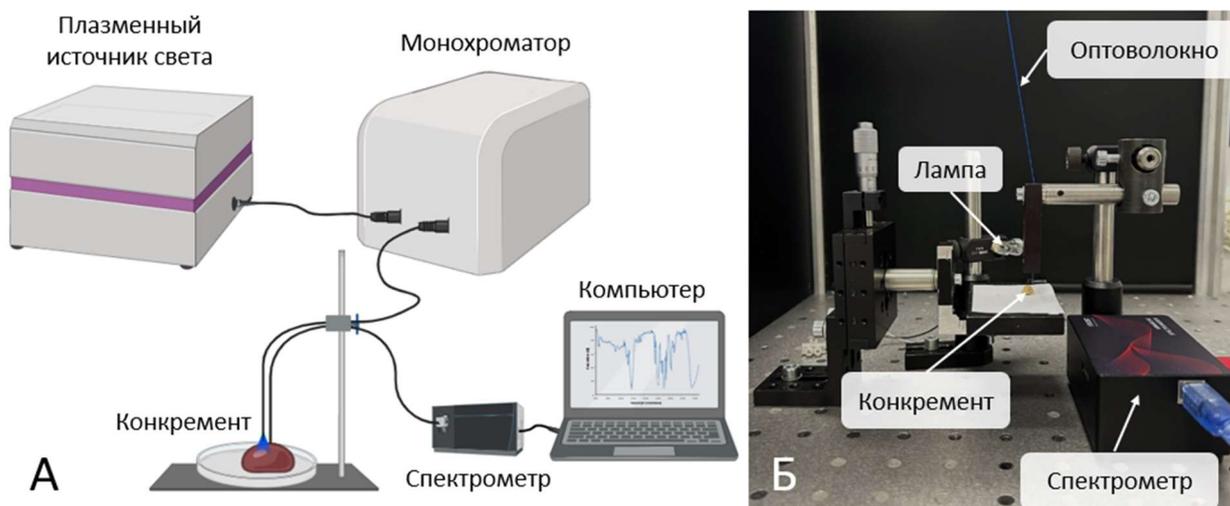


Рисунок 3.1. (А) Экспериментальная установка для измерения трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции от конкрементов; (Б) Экспериментальная установка для регистрации спектров диффузного отражения света от конкрементов.

Для регистрации спектров диффузного отражения была собрана экспериментальная установка, моделирующая условия освещения при проведении операции (Рисунок 3.1Б). В качестве источника света использовалась галогенная лампа (30 Вт, 12 В). Сигнал диффузного отражения от конкремента регистрировался с помощью хирургического оптического волокна (IPG Photonics, диаметр сердцевины 150 мкм, NA 0.22) спектрометром (YIXIST, Китай; спектральное разрешение 12 нм) в диапазоне 300-1100 нм при времени накопления 80 мс. Расстояние между образцом и волокном составляло 1 мм. Референсный спектр измерялся с использованием белого стандарта с коэффициентом отражения 99% (LabSphere) на расстоянии 1 мм. Темновой спектр регистрировался при отсутствии освещения.

Для расчета спектров эффективной оптической плотности применялась формула (2.1). Полученные спектры эффективной оптической плотности далее сглаживались медианным фильтром с окном 8 нм с последующей обрезкой в диапазоне 450-600 нм. Для сравнительного анализа спектров вычислялся параметр наклона по формуле:

$$\text{Slope} = \text{OD}_{450 \text{ нм}} - \text{OD}_{600 \text{ нм}} \quad (3.1)$$

Для измерений методом ИК-Фурье спектроскопии конкременты измельчались в порошок. Спектры регистрировались в геометрии нарушенного полного внутреннего отражения с алмазной призмой с использованием спектрометра (The Varian 640-IR FT-IR Spectrometer) в диапазоне  $200\text{-}4000 \text{ см}^{-1}$  при спектральном разрешении  $4 \text{ см}^{-1}$  и времени накопления 10 мс.

Обработка ИК-спектров выполнялась в следующей последовательности: сначала происходило вычитание фона с использованием адаптивного итеративно взвешенного метода наименьших квадратов с регуляризацией для улучшения видимости пиков, затем проводилось сглаживание фильтром Савицкого-Голея с окном 5 нм и полиномом 5-го порядка, и наконец спектры обрезались в спектральном диапазоне  $500\text{-}2500 \text{ см}^{-1}$ .

Определение типа конкрементов осуществлялось по характерным ИК-пикам при сравнении полученных данных с референсными спектрами из базы данных RRUFF [107,108]. На рисунке 3.2 представлены типичные ИК Фурье-спектры камней различного химического состава. Оксалатные камни идентифицировались по характерным полосам на  $1610$  и  $1315 \text{ см}^{-1}$ , соответствующим асимметричным и симметричным валентным колебаниям  $\text{COO-}$  группы, а также по полосам на  $777$  и  $514 \text{ см}^{-1}$ , отражающим ножничные колебания  $\text{O-C=O}$  в плоскости и веерные колебания  $\text{CO}_2$  соответственно (рисунок 3.2А). Полосы на  $1020$  и  $561 \text{ см}^{-1}$  характеризуют валентные и ножничные колебания фосфатной группы, присущие гидроксиапатитовым камням (рисунок 3.2Б). Валентные колебания группы  $\text{C-C}$  соответствуют узким полосам на  $1121$  и  $990 \text{ см}^{-1}$ , тогда как относительно широкая и интенсивная полоса на  $1670 \text{ см}^{-1}$  соответствует асимметричному колебанию  $\text{C=O}$  группы уратного конкремента (рисунок 3.2В) [109–111].

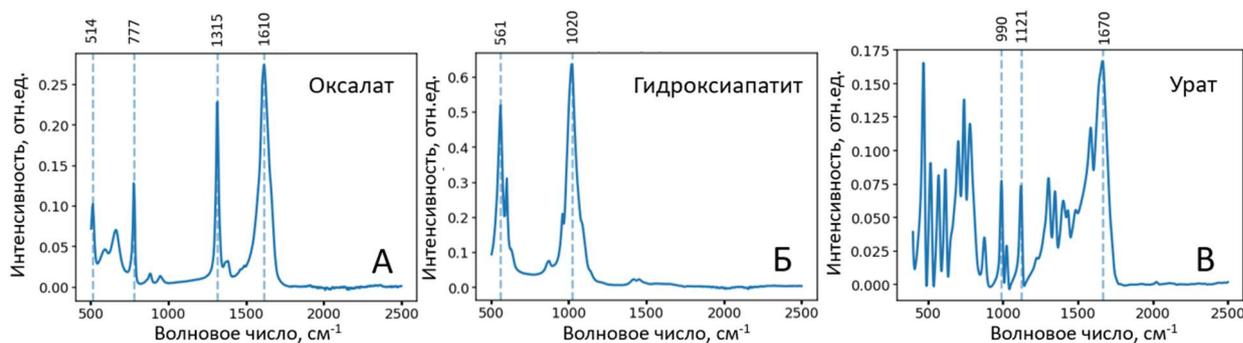


Рисунок 3.2. ИК спектры различных типов конкрементов: оксалат (А), гидроксиапатит (Б), урат (В). Пунктирные линии обозначают характерные полосы для каждого из химического состава камней.

Некоторые конкременты имели смешанный состав, то есть ИК-спектры содержали полосы, характерные для нескольких типов камней. В случае задачи определения доминирующего типа камня конкремент относили к тому типу, чьи характерные полосы имели наибольшую интенсивность. Для задачи определения процентного соотношения веществ в конкременте ИК-спектр раскладывался на три компонента с помощью метода неотрицательной матричной факторизации. Поскольку каждый спектр представляет собой взвешенную сумму спектральных компонент, были рассчитаны веса всех спектральных компонент для каждого класса. По существу, они отражают относительные концентрации чистых веществ в камне.

Для задачи определения плотности почечных камней референсным методом являлась компьютерная томография (напряжение составляло 100 кВ). Для данной задачи был произведен отбор камней, линейные размеры которых превышали 5 мм. Всего 76 камней удовлетворяло данному условию. Средняя плотность заданной области конкремента определялась с помощью программы Radiant.

### **3.1.3. Построение математических моделей для определения состава и плотности камней**

Для классификации трех типов конкрементов (определение доминирующего вещества в камне) были построены две математические модели: использующие матрицу возбуждения-эмиссии флуоресценции и комбинацию трехмерной матрицы возбуждения-эмиссии со спектрами диффузного отражения.

Процедура классификации включала следующие этапы. После предварительной обработки спектров, описанной выше, для флуоресцентных спектров выполнялось снижение размерности методом главных компонент (principal component analysis - PCA) для каждой длины волны возбуждения. Полученные матрицы с пониженной размерностью для разных длин волн возбуждения объединялись в единую матрицу, и далее проводилась стандартизация данных. Затем повторно применялся анализ главных компонент к результирующей матрице. Полученные проекции использовались для классификации.

Последовательность обработки комбинированных данных трехмерных спектров возбуждения-эмиссии флуоресценции и спектров диффузного отражения производилась аналогично с некоторой модификацией. Сначала проводилась стандартизация данных. Размерность матрицы, соответствующей спектрам диффузного отражения, уменьшалась методом главных компонент, после чего она объединялась с матрицей, полученной в результате объединения уменьшенных матриц флуоресцентных спектров. Размерность объединенной матрицы также уменьшалась методом главных компонент.

Затем выполнялась многоклассовая классификация (три класса: гидроксиапатит, оксалат и урат). В качестве классификационной модели был выбран метод сбалансированного случайного леса `BalancedRandomForest` из библиотеки `imbalanced`, что позволило учесть дисбаланс классов (наименьший по размеру класс - гидроксиапатит) и обеспечить устойчивость модели при

обучении на небольшом объеме данных. В качестве истинных классов использовались данные FTIR-спектроскопии для оценки качества классификации. Для обучения отбиралось 60% данных каждого класса, затем производилось тестирование модели на оставшихся данных.

Для выбора оптимальных гиперпараметров описанного классификатора (количество главных компонент при уменьшении размерности, максимальная глубина дерева для классификатора) применялась кросс-валидация с последовательным исключением одного элемента с оптимизацией метрики f1 меры. F1 меру можно интерпретировать как гармоническое среднее таких метрик как precision и recall, при этом для итогового результата вычислялось среднее арифметическое значений f1 мер для каждого класса.

Для определения процентного состава смешанных камней и плотности использовалась комбинация спектров оптической плотности и матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции. Предварительная обработка и понижение размерности производилось аналогично модели для решения задачи классификации. После этого решалась задача регрессии: для определения процентного содержания смешанных камней предсказывались относительные концентрации оксалата, гидроксиапатита и урата в камне, а также предсказывалась плотность конкремента. В качестве регрессионной модели был выбран метод, который реализует алгоритм градиентного бустинга, - CatBoostRegressor. Для обучения также отбиралось 60% данных, затем производилось тестирование модели на оставшихся данных.

## **3.2. Результаты**

### **3.2.1. Измерения трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции и спектров СДО**

На рисунке 3.3 (А-В) представлены характерные спектры флуоресценции от почечных камней трех типов для длин волн возбуждения, демонстрирующих наибольшие межгрупповые отличия. Можно наблюдать,

что флуоресцентные спектры уратных камней отличаются от других типов камней смещением максимума эмиссии в длинноволновую область. Трехмерные матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции оксалатных камней показали наличие вторичного пика при длине волны эмиссии около 620 нм и возбуждения 420 нм, который отсутствует у других типов.

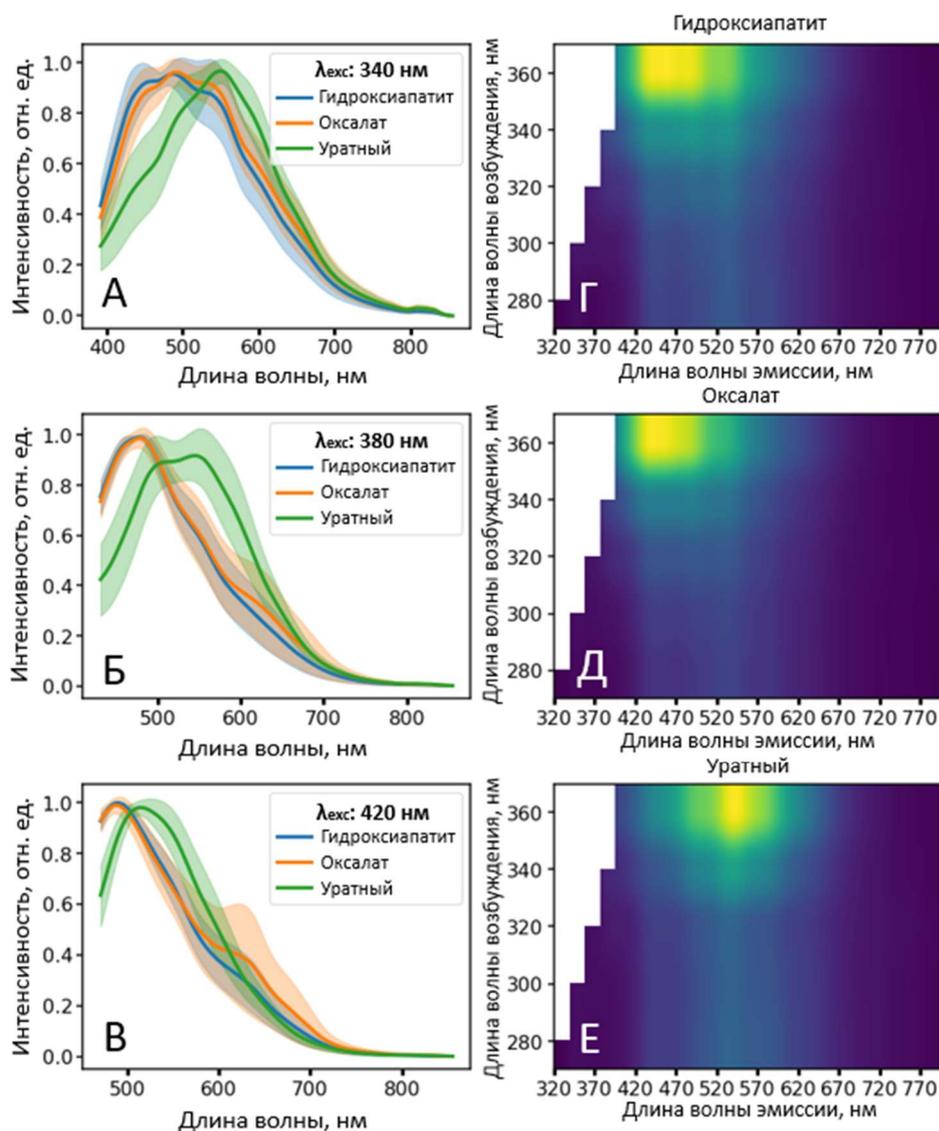


Рисунок 3.3. А)-В) Нормированные усредненные спектры флуоресценции для трех типов конкрементов при возбуждении на длинах волн 340 нм (А), 380 нм (Б) и 420 нм (В) соответственно. Полупрозрачные области показывают величину стандартного отклонения. Г)-Е) Характерные трехмерные матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции для трех типов камней: гидроксиапатит (Г), оксалат (Д), уратный камень (Е).

Для каждого конкремента проводилось не менее пяти измерений в различных точках. На рисунке 3.4А представлен усредненный нормированный спектр флуоресценции от всех пяти точек измерения для одного гидроксиапатитного камня. Разброс значений, обусловленный неоднородностью образца, оказался существенно меньше различий между спектрами разного химического состава (рисунок 3.4Б).

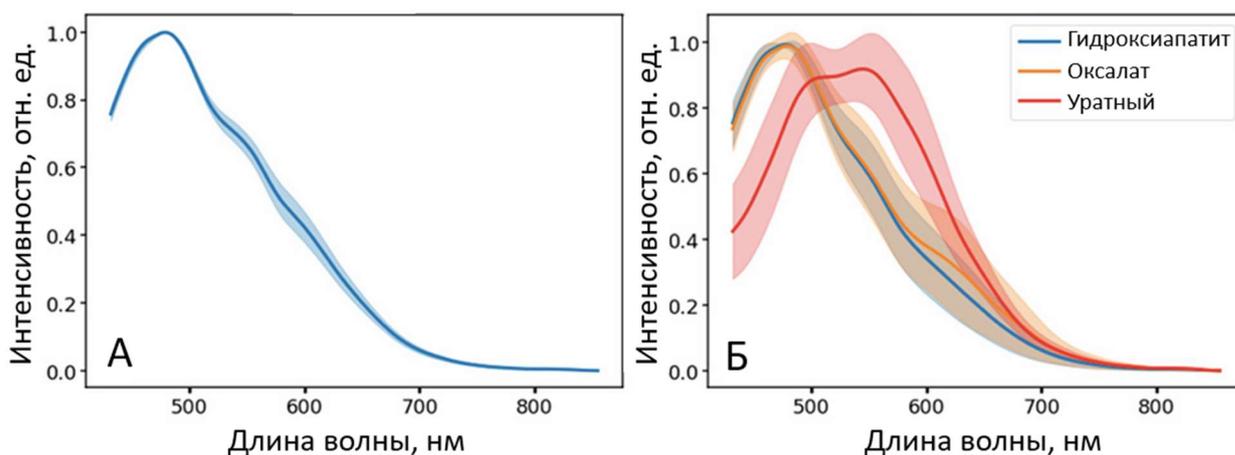


Рисунок 3.4. (А) Нормированный усредненный флуоресцентный спектр от всех точек измерения одного конкремента. (Б) Нормированные усредненные флуоресцентные спектры всех трех типов исследованных конкрементов. Полупрозрачные области отображают величину стандартного отклонения. Длина волны возбуждения - 380 нм.

На рисунке 3.5А представлены усредненные спектры эффективной оптической плотности для трех типов конкрементов. По графикам видно, что различие в отражательной способности в красной (600 нм) и синей (450 нм) областях спектра более выражено для уратных камней. Это связано с характерным желтым цветом уратных конкрементов, тогда как большинство оксалатных и гидроксиапатитных образцов имеют черную или серую окраску. Как видно из рисунка 3.5Б, средний наклон спектров уратных камней в пределах межквартильного размаха значительно больше, чем у спектров камней других типов.

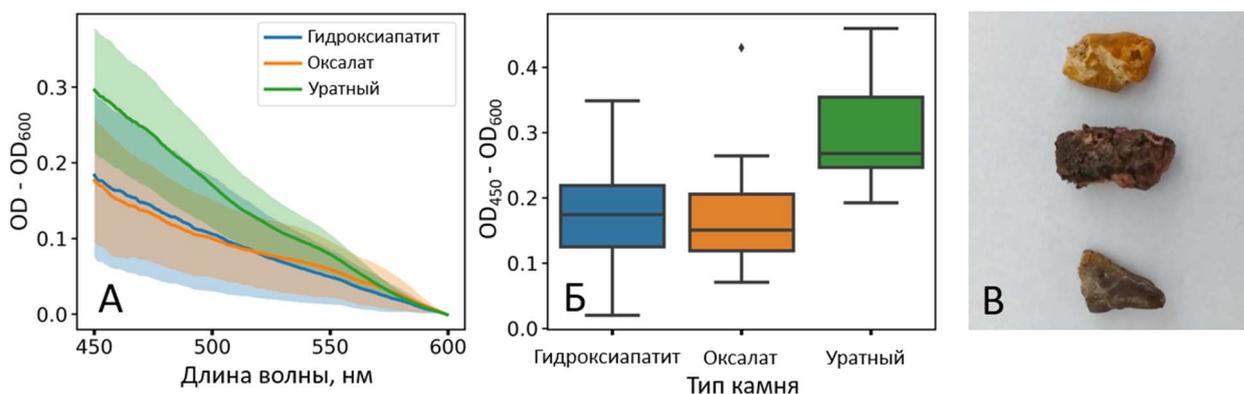


Рисунок 3.5. А) Усредненные спектры эффективной оптической плотности для трех типов камней с вычитанием значения на длине волны 600 нм. Полупрозрачные области обозначают величину стандартного отклонения. Б) Диаграммы размаха наклона спектров оптической плотности для трех типов конкрементов. В) Характерный внешний вид уратного конкремента, оксалата и гидроксиапатита (сверху вниз соответственно).

### 3.2.2. Оценка эффективности разработанных моделей

В процессе кросс-валидации были подобраны оптимальные гиперпараметры для классификации конкрементов на основе данных трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции. Оптимальное количество главных компонент (PCA) для разложения флуоресцентных спектров при каждой длине волны возбуждения составило 5, а для разложения матрицы с пониженной размерностью - 3 компоненты. При классификации с использованием как матриц флуоресценции, так и спектров СДО, оптимальное число главных компонент для разложения обоих типов спектров также составило 5, причем для матрицы с пониженной размерностью было подобрано такое же количество компонент. Для оценки качества классификации были рассчитаны матрицы ошибок для обучающей и тестовой выборок, а также вычислена  $f1$  мера на тестовых данных (рис. 3.6).

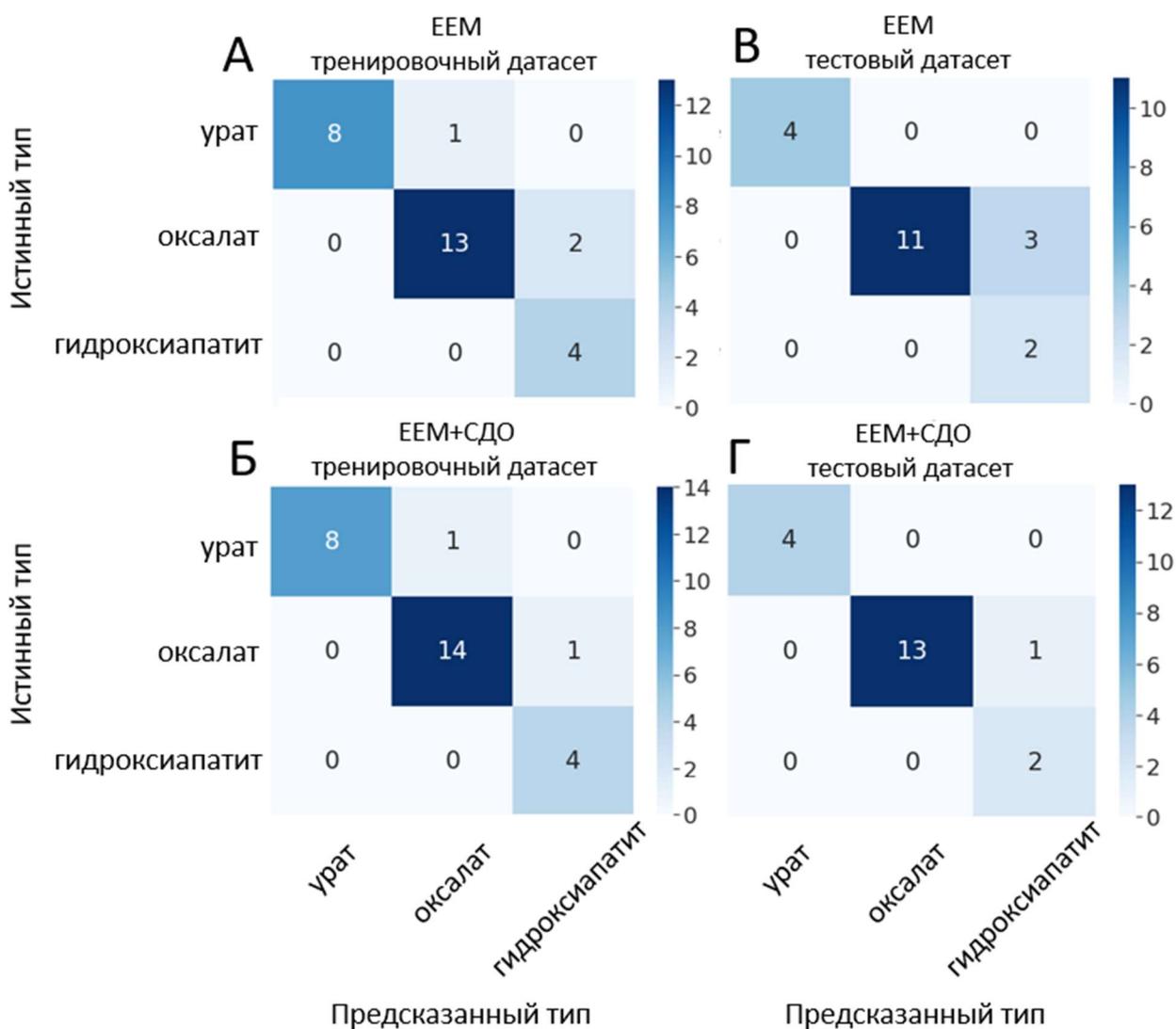


Рисунок 3.6. Матрицы ошибок: (А) для обучающей выборки при использовании только данных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции (ЕЕМ), (Б) для тестовой выборки при аналогичном подходе, (В) для обучающей выборки при комбинировании данных ЕЕМ и СДО, (Г) для тестовой выборки при комбинированном подходе.

Значение  $f1$  меры для классификации только по данным матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции составило 87%. При добавлении спектров СДО качество классификации повысилось, достигнув значения  $f1$ -меры 92%.

Для определения процентного содержания состава смешанных камней оптимальное количество компонент для понижения размерности было равно

10. Средняя относительная ошибка для определения оксалатов, уратов и гидроксиапатитов составила 27%, 11% и 24% соответственно.

При определении плотности конкрементов средняя абсолютная ошибка построенной регрессионной модели на тестовой выборке составила 290 единиц Хаунсфилда.

### **3.3. Сравнение полученных результатов с другими исследованиями**

В предыдущих исследованиях трехмерные матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции использовались для двух задач бинарной классификации: разделения кальциевых камней (моногидрат и дигидрат оксалата кальция) от других типов и разделение уратных камней от струвитных [4]. Данное исследование продемонстрировало точность классификации свыше 90% для данных двух задач. Предлагаемый нами метод отличается от [4], где выполнялась бинарная классификация исключительно по матрицам флуоресценции. В отличие от этого, наша модель является многоклассовой и достигает высокой точности за счет комбинации двух методов оптической спектроскопии. Более того, насколько нам известно, комбинация СДО и трехмерных матриц для классификации конкрементов ранее не оценивалась. Точность нашей классификационной модели при использовании обоих методов достигла 92%, причем добавление данных СДО повысило значение метрики точности по сравнению с использованием только матриц флуоресценции.

Предложенная методика требует минимальных модификаций для измерений с использованием одножильного хирургического волокна, что позволяет адаптировать ее для оборудования, применяемого хирургами во время эндоскопических операций. Поскольку диапазон длин волн возбуждения (260-480 нм) и регистрации флуоресценции (выше 500 нм) не перекрываются, достаточно простой оптической схемы с дихроичным зеркалом, отсекающим излучение ниже 500 нм, аналогично реализации в работе [4]. Спектры СДО в диапазоне 450-600 нм также могут быть измерены

с использованием хирургического волокна и освещения эндоскопа. Наиболее продолжительная часть - регистрация трехмерных матриц флуоресценции - в нашем случае занимала менее 5 секунд. Схожее время измерений можно ожидать при использовании эндоскопа, что является приемлемым показателем, учитывая, что процедура удаления конкрементов может занимать десятки минут. В исследовании [112] представлен пример реализации СДО и флуоресцентной спектроскопии в экспериментальной установке с использованием эндоскопа и оценена возможность применения этих методов во время литотрипсии. Таким образом, подобные измерения могут быть реализованы в операционной с применением эндоскопа и одножильного хирургического волокна, которое затем может быть использовано для фрагментации камня.

При сравнении нашего метода с двухэнергетической компьютерной томографией (ДЭКТ), который уже применяется в клинике, наш метод сохраняет аналогичную точность идентификации уратных камней и дополнительно позволяет определять оксалатные и гидроксиапатитные конкременты. Потенциально это может обеспечить дальнейшую оптимизацию процедуры литотрипсии при отсутствии радиационного воздействия, которое неизбежно при использовании ДЭКТ.

Важно отметить, что измерения оптических спектров могут проводиться непосредственно во время операции по удалению конкрементов, что позволяет уточнять тип камня перед оптоволоком в реальном времени, особенно при его значительной неоднородности. Это позволит хирургу настраивать параметры лазера непосредственно в ходе хирургического вмешательства, сокращая продолжительность процедуры.

### **3.4. Гипотезы о природе флуоресценции от почечных конкрементов**

Наконец, довольно интересен вопрос о происхождении флуорофоров, ответственных за наблюдаемую флуоресценцию в почечных камнях. Авторы работы [3] исследовали оптический отклик мочевых камней, уделяя особое

внимание струвитным конкрементам и камням из моногидрата оксалата кальция. Важным наблюдением было то, что в образцах оксалатного камня *ex vivo* флуоресцентный сигнал наблюдался, в то время как сигнал от синтетического порошка моногидрата оксалата кальция отсутствовал. Этот факт позволяет предположить, что флуоресценция, вероятно, в основном генерируется пигментами и органическими макромолекулами, которые попадают в решетку оксалатного камня в процессе его роста. Более того, было показано, что разные слои конкремента из оксалата кальция обладают разной интенсивностью флуоресценции, что может быть связано с изменением плотности распределения пигментов/макромолекул между слоями.

Таким образом, общепринятая концепция предполагает, что флуоресценция камней обусловлена излучением органических соединений, имеющих неоднородное распределение и различные оптические свойства внутри образца. Необходимо отметить, что концепция окислительно-индуцированной автофлуоресценции, дающей широкополосное излучение со свойствами, аналогичными наблюдаемым в конкрементах, была ранее предложена в исследовании [24]. С этой точки зрения, различия в органических соединениях и связанных с ними пигментах, включенных в состав камней, приводят к различиям в наблюдаемых спектрах. Это объясняет особенности спектров уратных камней. А именно, процессы окисления и накопления мочевой кислоты и других специфических молекул могут приводить к усилению флуоресценции и смещению полосы излучения.

Аналогичные объяснения представлены в недавней работе по автофлуоресценции камней [4], где отмечается: "Правдоподобное объяснение состоит в том, что камни с разными неорганическими компонентами содержат различные классы матричных белков, которые, вероятно, играют основную роль в формировании спектров, поскольку чистые неорганические вещества демонстрируют крайне слабую автофлуоресценцию".

Некоторые дополнительные соображения, касающиеся флуоресценции органических компонентов камней, можно найти в работе [59], где отделялась органическая и неорганическая фракции с помощью нелинейной микроскопии.

### 3.5. Выводы

В данной главе был продемонстрирован потенциал спектроскопии диффузного отражения (СДО) и флуоресцентной спектроскопии (измерение трехмерных спектров возбуждения-эмиссии флуоресценции) в качестве эффективных методов определения состава мочевых камней во время процедур лазерной литотрипсии. Разработанные на основе *ex vivo* экспериментальных данных математические модели показали высокую точность. Использование данных трехмерных матриц возбуждения-эмиссии флуоресценции и СДО для определения доминирующего типа конкремента позволила достичь значения  $f_1$  меры 92%, что свидетельствует о преимуществе по сравнению с использованием только флуоресцентных данных. Для определения относительных концентраций оксалата, урата и гидроксиапатита ошибка составила 27%, 11% и 24% соответственно, а для определения плотности – 290 единиц Хаунсфилда.

Полученные результаты указывают на то, что внедрение методов оптической спектроскопии может улучшить интраоперационное принятие решений и потенциально повысить эффективность лечения пациентов за счет возможности анализа состава и плотности почечных камней в режиме реального времени.

## **Глава 4. Детектирование здоровой и опухолевой тканей мочевого пузыря в условиях операции с использованием методов оптической спектроскопии**

*В главе используются материалы, опубликованные в работах [A3] и [A4].*

В рамках главы производится оценка эффективности мультимодальной методики, объединяющей три метода оптической спектроскопии: спектроскопию диффузного отражения, флуоресцентную спектроскопию в видимом и ближнем инфракрасном (БИК) диапазонах, а также спектроскопию комбинационного рассеяния света (КР) в области высоких волновых чисел, для интраоперационной детекции новообразований мочевого пузыря.

### **4.1. Объекты и методы исследования**

#### **4.1.1. Экспериментальная установка**

Для проведения измерений была использована специальная экспериментальная установка, совместимую с хирургическим оптоволоконном ( $d = 550$  мкм,  $NA = 0.22$ , IPG Photonics), которое хирурги применяют для удаления опухоли методом лазерной трансуретральной резекции.

Экспериментальная установка (рисунок 4.1А,Б) сочетала в себе четыре метода оптической спектроскопии: спектроскопию диффузного отражения (рис. 4.2А), флуоресцентную спектроскопию в видимом (длина волны возбуждения  $\lambda_{exc} = 405$  нм) и БИК ( $\lambda_{exc} = 690$  нм) диапазонах (рис. 4.2Б,В), а также спектроскопию КР в диапазоне больших волновых чисел (рис. 4.2Г).

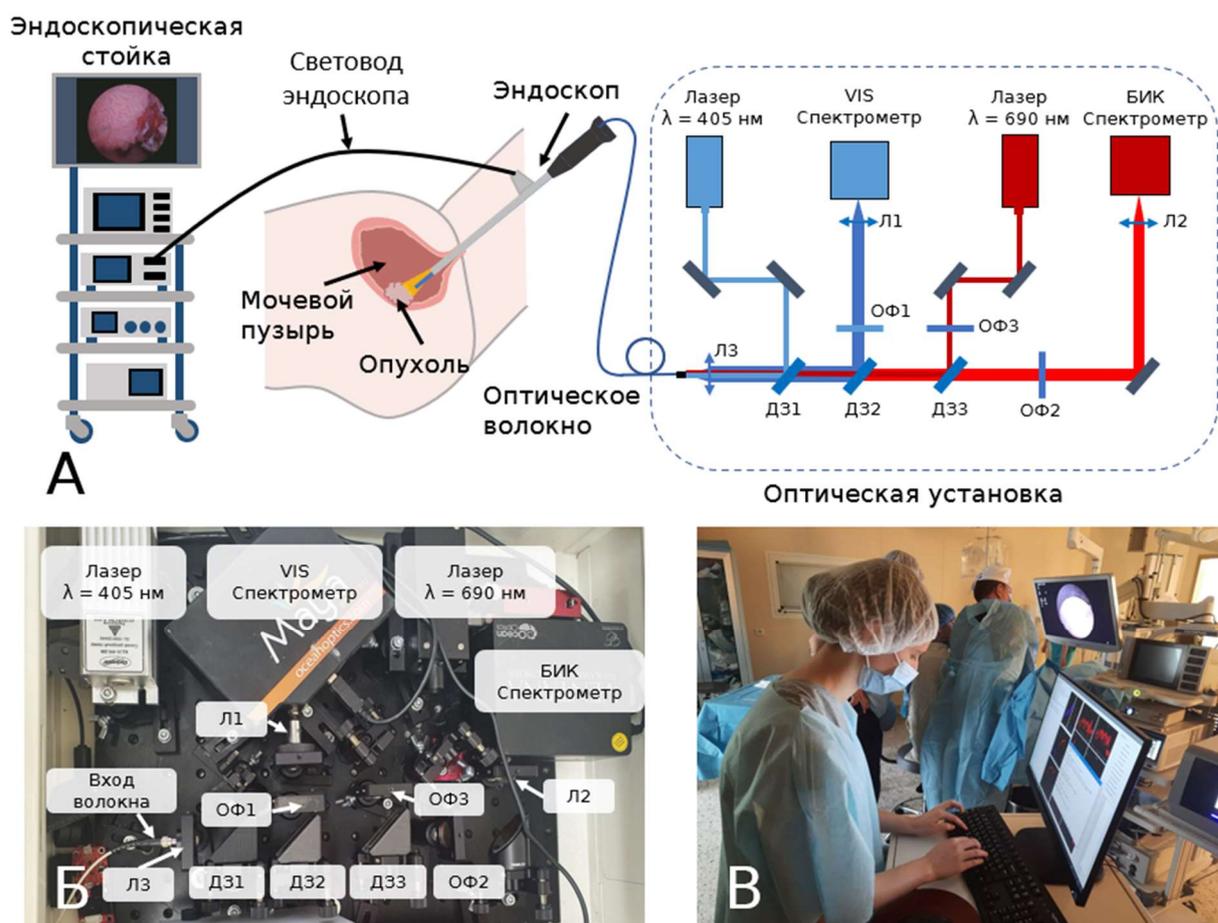


Рисунок 4.1. (А) Схематическое изображение экспериментальной мультимодальной установки: эндоскоп, вводимый в мочевой пузырь, эндоскопическая стойка и оптическая часть установки в сочетании с оптическим волокном, вставленным в эндоскоп. (Б) Фотография оптической части экспериментальной установки. (В) Общий вид установки в операционной. ДЗ – дихроичное зеркало, Л – линза, ОФ – оптический фильтр. Подробности см. в тексте.

Для реализации методов флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии КР использовались два лазерных источника с непрерывным излучением, которое вводилось в одно оптическое волокно. Первый лазер KLM-405-200 (Sintrec Optronics Technology) с длиной волны возбуждения 405 нм и мощностью до 10 мВт на выходе из волокна возбуждал флуоресценцию в ткани в видимом диапазоне. Для реализации метода КР и флуоресцентной спектроскопии в БИК диапазоне использовалось

непрерывное излучение второго лазера FC-D-690 (CNI laser) с длиной волны 690 нм и мощностью 30 мВт на выходе из волокна. Лазеры управлялись компьютером, что позволяло модулировать излучение для вычитания фоновой засветки. Для регистрации спектров диффузного отражения использовался источник света эндоскопа, входящего в состав эндоскопической платформы визуализации Visera Elite II компании Olympus.

Спектры видимой флуоресценции и диффузного отражения света регистрировались на спектрометре Maya 2000 Pro (Ocean Optics) в спектральном диапазоне от 420 до 650 нм, время накопления 20 мс, разрешение  $\sim 13$  нм (щель не использовалась для увеличения интенсивности сигнала). Спектры флуоресценции в БИК диапазоне и комбинационного рассеяния регистрировались с помощью спектрометра Ventana (Ocean Optics) в диапазоне от 800 до 930 нм, время интегрирования 300 мс, щель 150 мкм, разрешение 2 нм ( $30 \text{ см}^{-1}$ ). Для разделения спектральных полос использовались длинноволновые дихроичные зеркала с длинами волн отсечки 414, 660 и 757 нм (ДЗ1 - FF414Di01, ДЗ2 - FF660-Di02, ДЗ3 - FF757-Di01, Semrock). Для дополнительной фильтрации лазерной накачки и подавления рассеянного лазерного излучения перед спектрометрами были установлены длинноволновые фильтры с длинами волн отсечки 450 нм (ОФ1-FELH0450, Thorlabs) и 800 нм (ОФ2 - FELH0800, Thorlabs) и полосовой фильтр (ОФ3 - FBH70040, Thorlabs). Объектив Л1 (Lomo $\times 10$ ) использовался для фокусировки излучения на щель спектрометра Maya 2000 Pro, а объектив Л2 (ACL2520U-B, Thorlabs) использовался на спектрометре Ventana.

Для проведения измерений в условиях операции данная оптическая схема была размещена в корпусе, расположенном на мобильной тележке, что позволило проводить измерения в нескольких операциях, а на время отсутствия подходящих операций – убирать установку из операционной (рисунок 4.1В).

Для записи спектров использовалась собственная программа, написанная на языке Python. Для считывания данных со спектрометров использовался пакет seabreeze. Программа позволяла наблюдать за изменением основных спектральных параметров в режиме онлайн и сохранять спектральные данные для последующей обработки.

#### **4.1.2. Дизайн исследования**

Измерения стенок мочевого пузыря *in vivo* проводились у пациентов с подозрением на рак мочевого пузыря или во время контрольной цистоскопии после удаления опухоли. Был измерен оптический отклик тканей 21 пациента (13 первичных и 7 рецидивных опухолей). Исследование проводилось на базе Медицинского научно-образовательного института Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (МНОИ МГУ). На проведение исследований было получено разрешение от локального этического комитета МНОИ МГУ. От всех пациентов было получено информированное согласие. Каждому пациенту сначала проводилась цистоскопия в белом свете и узкоспектральная визуализация (NBI) в течение 10 минут для поиска подозрительных участков. Затем все подозрительные участки и один здоровый участок измерялись в соответствии с приведенным ниже протоколом. Участки для измерения выбирал хирург, проводивший операцию по удалению опухоли или повторное обследование. У пациентов, прошедших повторное обследование, также проводилось измерение рубцовой ткани на месте опухоли. Типичные изображения различных участков слизистой мочевого пузыря, полученных с помощью эндоскопической камеры, представлены на рисунке 4.2Д-3. После всех измерительных процедур под эндоскопическим видео-наведением были взяты биопсии всех подозрительных участков ткани размером около 5 мм. Оставшиеся участки удалялись во время хирургической процедуры. Образцы помещались в отдельные маркированные контейнеры и затем исследовались

патологоанатомом. Идентификация здоровых и рубцовых участков основывалась на данных цистоскопии.

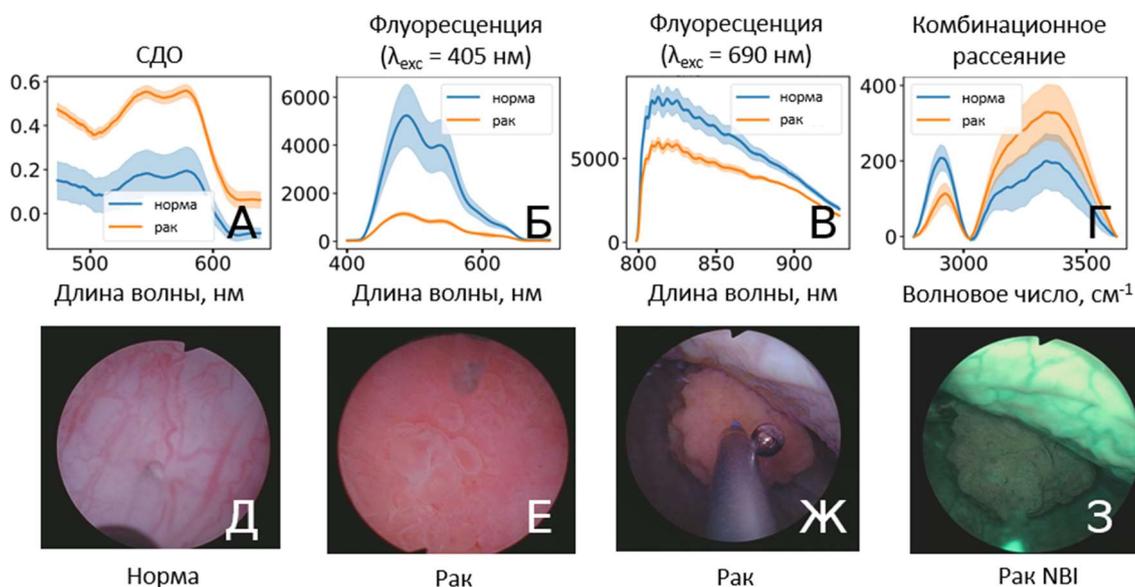


Рисунок 4.2. (А-Г) Типичные спектры здоровой и раковой тканей, измеренных с помощью методов спектроскопии диффузного отражения (А), флуоресцентной спектроскопии возбуждением на длине волны 405 нм (Б) и 690 нм (В), спектроскопии КР (Г). (Д-З) Изображения с камеры эндоскопа различных типов тканей мочевого пузыря: здоровая ткань (Д), стелющийся рак (Е), экзофитный рак (Ж), экзофитный рак в подсветке NBI (З).

Каждый участок ткани измерялся следующим образом. Сначала записывались 300 спектров флуоресценции в видимом диапазоне и диффузного отражения с использованием как широкополосного эндоскопического освещения, так и модулированного лазерного излучения на длине волны 405 нм. Данное измерение занимало около 25 секунд. Затем, с использованием модулированного излучения лазера на длине волны 690 нм, проводилось измерение 30 спектров в БИК-диапазоне (около 35 секунд). Регистрация спектров на каждом участке проводилось по области над тканью на расстоянии 0-1 мм от ее поверхности, при этом хирург плавно перемещал зонд по области, тем самым измеряя разные точки ткани. Объем области, где детектировался сигнал, можно оценить как 1 мм в диаметре и несколько

десятых долей миллиметра в глубину (такие оценки приведены в работе [113]). При измерении участков с подозрением на рак сканировалась либо вся подозрительная зона, если она была достаточно мала (менее 3-4 мм в диаметре), либо часть зоны с подозрением на рак в случае больших поражений (около 1 см в диаметре). При сканировании здоровых и воспаленных участков оценивалась область диаметром около 4-5 мм. Во всех случаях хирург перемещал волокно над интересующей областью, при этом регистрировалось несколько спектров в разных местах исследуемой области. Измерения проводились при фиксированном уровне яркости осветителя эндоскопа.

Для наблюдения за операционным полем во время измерений на операции использовалась камера эндоскопа; синхронизация между записываемой видеопоследовательностью и спектрами осуществлялась в момент первой активации лазерного излучения.

После каждой операции измерялись два калибровочных спектра: фоновый спектр и референсный спектр осветителя. Референсный спектр  $I_{\text{ref}}(\lambda)$  осветителя эндоскопа измерялся с помощью изготовленного на заказ эталона, откалиброванного по стандарту LabSphere (99% отражения).

Записанные данные обрабатывались с помощью языка программирования Python и ряда научных библиотек (numpy, scipy, sklearn).

В ходе исследования был проанализирован оптический отклик тканей у 21 пациента, из которых 13 прошли первичную цистоскопию и 8 - повторное эндоскопическое исследование. Всего было подтверждено 10 случаев рака по данным гистологического анализа, из которых 9 выявлены при первичных обследованиях и 1 — при повторном. У 10 пациентов с обнаруженным раком было выявлено 13 участков с разной локализацией. У двух пациентов обнаружены участки с признаками воспаления, но гистологически рак не подтвердился. У двух других пациентов не было выявлено ни раковой, ни воспаленной, ни рубцовой ткани. Типы исследованных участков мочевого пузыря для каждого пациента представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Типы измеренных участков мочевого пузыря для каждого пациента.

Номер пациента	Измеренные области			
	Здоровая ткань	Раковая ткань	Воспаление	Рубец
1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
5	+	+	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	+	+	-	-
9	+	+	-	+
10	+	+(4 области)	-	-
11	+	-	-	+
12	+	-	-	+
13	+	-	-	+
14	+	-	-	+
15	+	-	-	+
16	+	-	-	+
17	+	-	-	+
18	+	-	+	-
19	+	-	+	-
20	+	-	-	-
21	+	-	-	-

### 4.1.3. Обработка оптических спектров

Оценка эффективной оптической плотности спектров рассчитывалась по формуле (2.1). Для оценки общего содержания гемоглобина, оксигенации и рассеяния в мягкой ткани спектры эффективной оптической плотности участков ткани мочевого пузыря аппроксимировались суммой известных из литературы спектров поглощения оксигемоглобина и дезоксигемоглобина (рис. 4.4С) [114]. Помимо этого, необходимо учитывать вклад рассеяния, который аппроксимировался прямой линией. Такая аппроксимация производилась в диапазоне 510-590 нм. В данном диапазоне такое приближение возможно [115], поскольку в этой спектральной области расположены полосы поглощения оксигемоглобина и дезоксигемоглобина, а вклад остальных хромофоров незначителен. Таким образом, спектр эффективной оптической плотности был описан следующей моделью:

$$OD_{\text{model}}(a_{HbO_2}, b_{Hb}, c_s, d_s, \lambda) = a_{HbO_2}\mu_{HbO_2}(\lambda) + b_{Hb}\mu_{Hb}(\lambda) + c_s\lambda + d_s, \quad (4.1)$$

где  $\mu_{HbO}$ ,  $\mu_{Hb}$  - коэффициенты поглощения оксигемоглобина и дезоксигемоглобина,  $a_{HbO_2}$ ,  $b_{Hb}$  - индексы оксигемоглобина и дезоксигемоглобина,  $c_s$ ,  $d_s$  - индексы рассеяния.

Индексы общего гемоглобина, оксигенации и рассеяния рассчитывались как  $a_{HbO_2} + b_{Hb}$ ,  $a_{HbO_2}/(a_{HbO_2} + b_{Hb})$  и  $c_s * 550 + d_s$ , соответственно. Выражение для индекса рассеяния дает оценку уровня рассеяния на длине волны 550 нм, которая близка к длине волны пика поглощения окси- и дезоксигемоглобина. Поглощение других веществ в тканях (воды, липидов, белков и т.д.) считалось пренебрежимо малым.

Чтобы учесть вариабельность здоровых тканей между пациентами, индексы общего гемоглобина и оксигенации нормировались на медианные значения индекса здоровой ткани для каждого пациента, а из индексов рассеяния вычиталось медианное значение индекса здоровой ткани для каждого пациента:

$$Hb_{total} = a_{HbO_2} + b_{Hb}; Hb_{total}^{(rel)} = \frac{Hb_{total}}{\text{Median}(Hb_{total}^{(normal)})}, \quad (4.2, 4.3)$$

$$SpO_2 = \frac{a_{HbO_2}}{a_{HbO_2} + b_{Hb}}, SpO_2^{(rel)} = \frac{SpO_2}{\text{Median}(SpO_2^{(normal)})}; \quad (4.4, 4.5)$$

$$Scattering = c_s * 550 + d_s, Scattering^{(rel)} = Scattering - \text{Median}(Scattering^{(normal)}), \quad (4.6, 4.7)$$

где  $Hb_{total}^{(normal)}$ ,  $SpO_2^{(normal)}$ ,  $Scattering^{(normal)}$  – индексы общего гемоглобина, оксигенации и рассеяния для здоровой ткани каждого пациента. Индекс «rel» соответствует относительным (по пациентам) индексам.

Все здоровые ткани каждого пациента выглядели одинаково, различия были связаны в основном с наличием сосудов, содержащих более высокую концентрацию гемоглобина. Однако внешний вид здоровых тканей значительно отличался у разных пациентов (рис. 4.3 А,В,Г,Е), поэтому была проведена нормировка на здоровые ткани для каждого пациента. Подозрительные участки, которые, как оказалось, являются воспалениями, не рассматривались в нашей модели как здоровая ткань и не использовались при расчете медианного значения здоровой ткани.

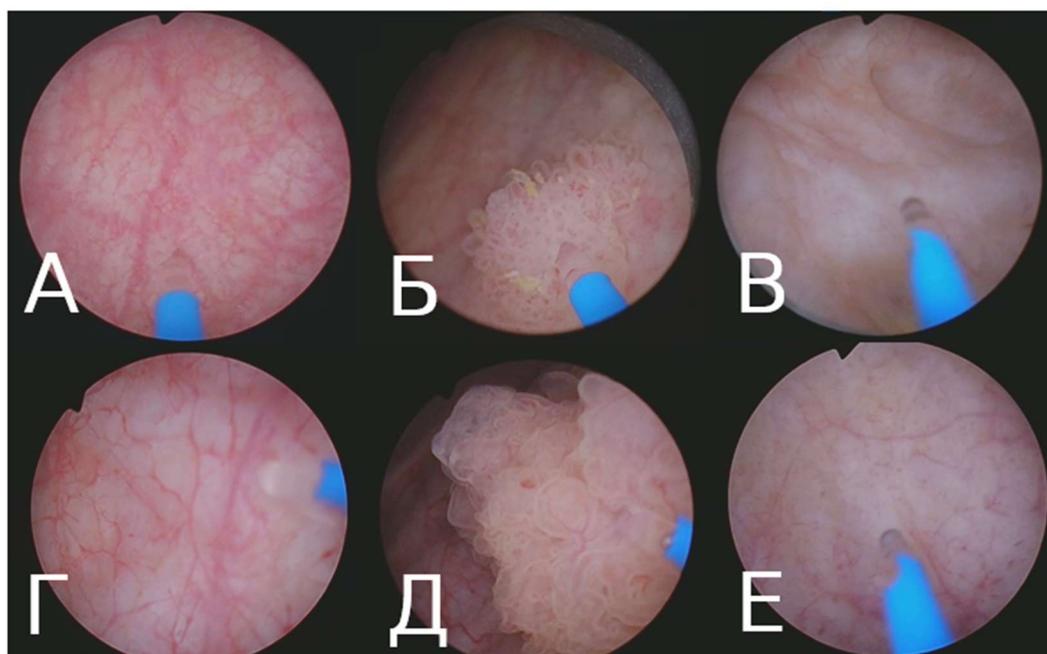


Рисунок 4.3. Эндоскопические изображения здоровой и раковой тканей мочевого пузыря двух пациентов с нетипичной картиной. А, Б – здоровая и раковая ткань пациента с сильно васкуляризованной здоровой тканью. Г, Д – здоровая и раковая ткани пациента, раковая ткань имеет более бледный цвет. В, Е – здоровая ткань пациентов со слабо васкуляризованной тканью.

Спектры видимой флуоресценции были измерены в режиме модуляции синего лазера. Из спектров с включенным синим лазером вычитались спектры с выключенным лазером (спектры отражения). Индексы интенсивности синей флуоресценции рассчитывались как среднее значение интенсивностей в детектируемой области. Затем производилась нормировка индексов на медианный индекс интенсивности синей флуоресценции здоровой ткани для каждого из пациентов.

Спектры БИК флуоресценции вычислялись путем вычитания из спектров с включенным красным лазером спектров с выключенным лазером. Интенсивность БИК флуоресценции была рассчитана как среднее значение интенсивностей на длинах волн 800-930 нм. Как и в случае с индексами, полученными из спектров диффузного отражения, и интенсивностью видимой флуоресценции, для интенсивности БИК флуоресценции была произведена нормировка на медианные значения интенсивности флуоресценции для здоровой ткани каждого пациента.

Колебательные полосы С-Н и О-Н (рис. 4.2Г) были получены путем вычитания БИК флуоресцентного фона из исходных спектров, который аппроксимируется прямыми, проходящими через значения интенсивности на длинах волн 855 и 875 нм для С-Н линии и 875 и 920 нм для О-Н линии. Из-за неровной поверхности опухоли было трудно обеспечить полноценный контакт волокна с поверхностью, что могло приводить к появлению вклада воды, заполняющей мочевой пузырь, в регистрируемый отклик и тем самым завышать содержание воды.

#### **4.1.4. Классификация**

Для построения классификационной модели, позволяющей по набору параметров определить принадлежность измерения к классу опухоли или нормальной ткани, использовались различные сочетания нормированных индексов, полученных из оптических спектров. В качестве классификационной модели использовалась логистическая регрессия. Перед классификацией проводилась стандартизация признаков. Обучающая выборка состояла из 200 случайных спектров здоровой ткани и 200 случайных спектров раковой ткани с каждой операции, на которой были измерены и здоровый и раковый участки. Участки с подозрением на злокачественную опухоль, оказавшиеся воспалениями и рубцовой тканью, не рассматривались в качестве здоровых тканей и не включались в обучающую выборку. Предсказание типа ткани проводилось по всем измерениям, проведенным во время операций, где оценивались раковые и/или здоровые участки ткани, т. е. использовалось 6300 образцов раковой ткани и 3000 образцов здоровой ткани. Качество классификации оценивалось при помощи перекрестной проверки с исключением одной группы на обучающей выборке, где в качестве группы выступали спектры, измеренные на одной операции.

## **4.2. Результаты**

### **4.2.1. Спектроскопия диффузного отражения**

Усредненные спектры эффективной оптической плотности здоровой и опухолевой ткани для каждого пациента изображены на рисунке 4.4А. Спектры поглощения здоровой и опухолевой ткани не перекрывались в пределах среднеквадратичной ошибки из-за повышенного вклада рассеяния в оптическую плотность раковой ткани. Это объясняется большей гетерогенностью клеточной структуры опухолевой ткани по сравнению со здоровой. Более высокая вариабельность спектров здоровых участков связана с неоднородностью поверхности из-за наличия сосудов (они хорошо видны, например, на Рисунке 4.2Г). При расположении зонда над сосудами

наблюдается повышенная оптическая плотность в области полос поглощения гемоглобина и оксигемоглобина.

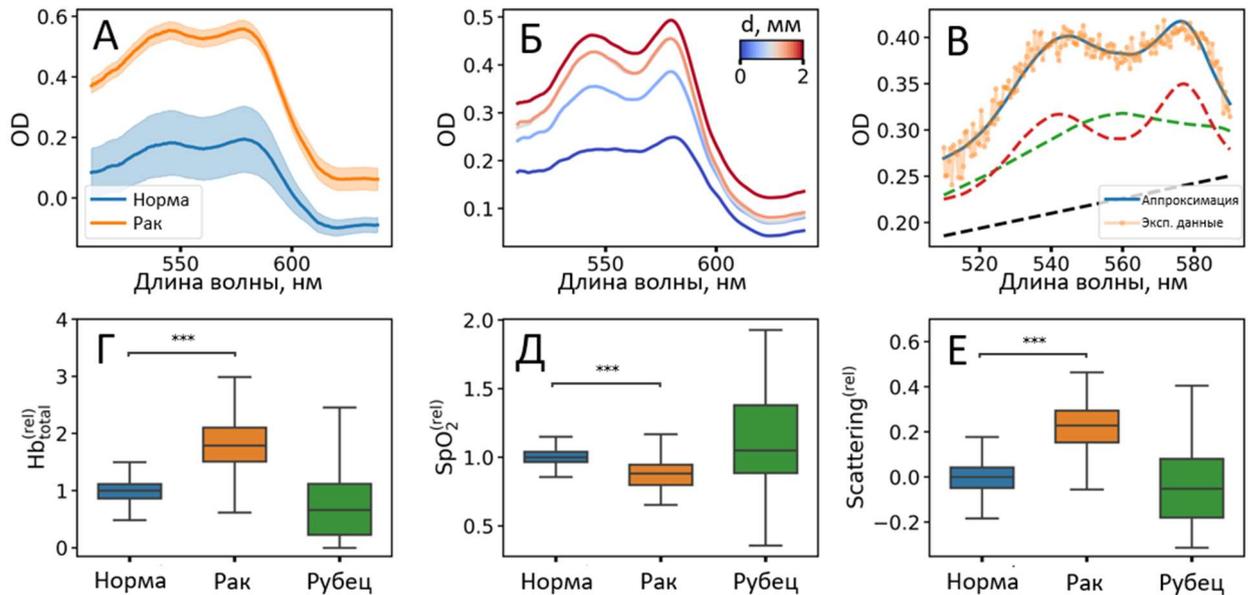


Рисунок 4.4. (А) Усредненные спектры эффективной оптической плотности для здоровой и опухолевой ткани мочевого пузыря, измеренные у одного из пациентов. Полупрозрачные области обозначают стандартное отклонение. (Б) Спектры эффективной оптической плотности здоровой ткани при различных расстояниях между волокном и тканью. (В) Разложение экспериментальных спектров эффективной оптической плотности (оранжевые точки) на сумму спектров поглощения дезокси- (зеленая пунктирная линия) и оксигемоглобина (красная пунктирная линия) и компоненты рассеяния (черная пунктирная линия). (Г-Е) Диаграммы размаха относительных показателей общего гемоглобина  $Hb_{total}^{(rel)}$  (Г), оксигенации  $SpO_2^{(rel)}$  (Д) и рассеяния  $scattering^{(rel)}$  (Е) для здоровой, опухолевой ткани и рубцов. Значения усреднены для 21 пациента.

Значение эффективной оптической плотности также зависело от расстояния между волокном и тканью (Рисунок 4.4Б). Чем меньше расстояние, тем больше отраженного сигнала собирает волокно, что приводит к снижению OD. Форма спектров при этом существенно не изменялась. Следует отметить, что при аппроксимации суммой спектров окси- и дезоксигемоглобина с

линейной компонентой величина индекса рассеяния  $d_s$  может изменяться. Однако при измерениях здоровой и опухолевой ткани на фиксированном расстоянии это не влияет на индекс рассеяния.

На рисунках 4.4 Г-Е представлены диаграммы размаха относительных показателей  $Hb_{total}^{(normal)}$ ,  $SpO_2^{(normal)}$ ,  $Scattering^{(normal)}$  для 21 пациента. Все рассчитанные относительные показатели для раковой и здоровой ткани не перекрываются в пределах межквартильного размаха. Для опухолевой ткани по сравнению со здоровой наблюдались повышенный индекс общего гемоглобина, пониженный индекс оксигенации и повышенный индекс рассеяния. Повышенная васкуляризация характерна для опухолей [116], что объясняет увеличенное содержание гемоглобина. Сниженный индекс оксигенации в опухолях согласуется с тем, что крупные новообразования часто проявляют гипоксию, вызванную дисбалансом между потреблением кислорода тканью и его доставкой с кровью [117]. Увеличенное рассеяние в опухолевой ткани может быть связано со значительными вариациями формы и размеров ядер раковых клеток по сравнению со здоровой тканью, поскольку ядра таких клеток могут быть аномально увеличены [118,119].

В отдельных случаях отмечались нетипичные показатели общего гемоглобина -  $Hb_{total}^{(rel)}$  для опухолевой ткани был выше, чем для здоровой. В одном случае здоровая ткань пациента имела высокую степень васкуляризации (Рис. 4.3А-Б). В другом случае опухоль была малого размера и имела более бледную окраску по сравнению с другими образцами (Рис. 4.3 В-Г). В целом, для рубцовой ткани наблюдались более низкие значения относительного индекса общего гемоглобина по сравнению со здоровой тканью (Рис. 4.4Г), тогда как  $SpO_2^{(rel)}$  и  $Scattering^{(rel)}$  статистически не отличались (Рис. 4.4Д-Е).

Для предсказания типа ткани (здоровая или патологическая) перед волокном были построены несколько классификаторов на основе

логистической регрессии. Первый использует относительные показатели  $Hb_{total}^{(rel)}$ ,  $SpO_2^{(rel)}$  и  $Scattering^{(rel)}$ , полученные из спектров диффузного отражения. Качество классификации данной модели представлено на рисунке 4.5. Для оценки качества бинарной классификации использовалась ROC-кривая, показывающая зависимость чувствительности алгоритма классификации (или частоты обнаружения рака) от частоты ложных срабатываний, равной (1 - специфичность).

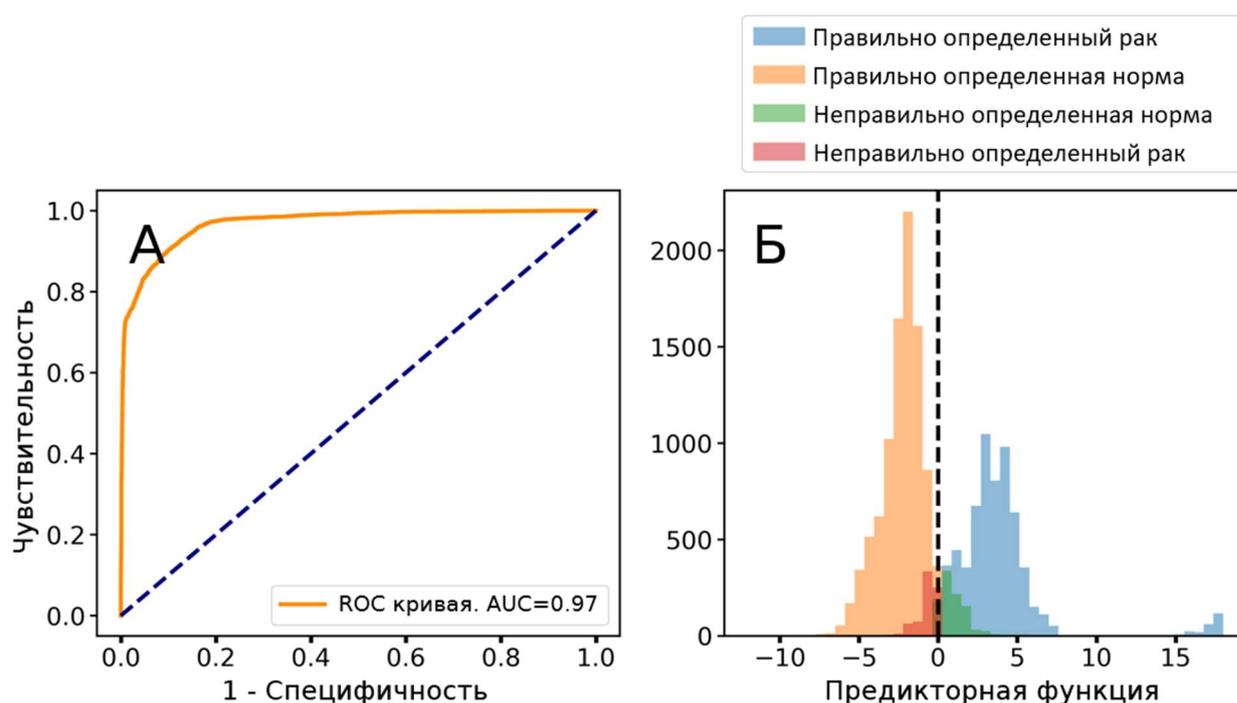


Рисунок 4.5. Результаты классификации здоровой и опухолевой ткани с использованием трех признаков (относительных показателей общего гемоглобина  $Hb_{total}^{(rel)}$ , оксигенации  $SpO_2^{(rel)}$  и рассеяния  $Scattering^{(rel)}$ ). (А) Рассчитанная ROC-кривая (характеристическая кривая классификатора),  $AUC=0.97$ . (Б) Гистограмма значений линейной предикторной функции для измерений опухолевой и здоровой ткани.

Значение площади под кривой (AUC) составило 0.97 при использовании относительных показателей общего гемоглобина  $Hb_{total}^{(rel)}$ , оксигенации  $SpO_2^{(rel)}$  и рассеяния  $Scattering^{(rel)}$  в качестве входных признаков (Рисунок

4.5А), что свидетельствует о высоком качестве классификации. При пороговом значении 0.5 чувствительность и специфичность алгоритма составили 89.6% и 90.5% соответственно. Гистограмма взвешенной суммы относительных показателей представлена на Рисунке 4.5Б.

Дополнительно была рассчитана точность ошибочной идентификации воспаления как опухолевой ткани бинарным классификатором. Точность распознавания участков воспаления как злокачественных при использовании показателей  $Hb_{total}^{(rel)}$ ,  $SpO_2^{(rel)}$  и  $Scattering^{(rel)}$  составила 62.8%.

Рубцовая ткань не включалась в модель классификации, так как только у одного пациента присутствовали все три типа ткани (здоровая, опухолевая и рубцовая), что недостаточно для надежного обучения модели. Классификатор, обученный только на здоровой и опухолевой ткани, идентифицировал рубцовую ткань как здоровую с точностью 79.5% при использовании показателей  $Hb_{total}^{(rel)}$ ,  $SpO_2^{(rel)}$  и  $Scattering^{(rel)}$ .

#### 4.2.2. Флуоресцентная спектроскопия в видимом диапазоне

При добавлении относительной средней интенсивности флуоресценции при возбуждении на длине волны 405 нм (видимая флуоресценция) к анализируемым параметрам наблюдается незначительное улучшение показателей классификации: значение площади под ROC-кривой возрастает до 0.98 (Рисунок 4.6Б-В). Для злокачественных тканей характерна более низкая интенсивность флуоресценции по сравнению со здоровыми тканями (рис. 4.6А). Вариабельность показателя видимой флуоресценции между пациентами может объясняться двумя основными факторами. Во-первых, расстояние между оптическим волокном и поверхностью ткани в ходе измерений варьировалось от 0 до 1 мм, что существенно влияет на регистрируемый флуоресцентный сигнал. Во-вторых, значительные различия между пациентами в интенсивности флуоресценции здоровой ткани могут

быть связаны с индивидуальными вариациями содержания гемоглобина, что проявляется в различиях окраски ткани.

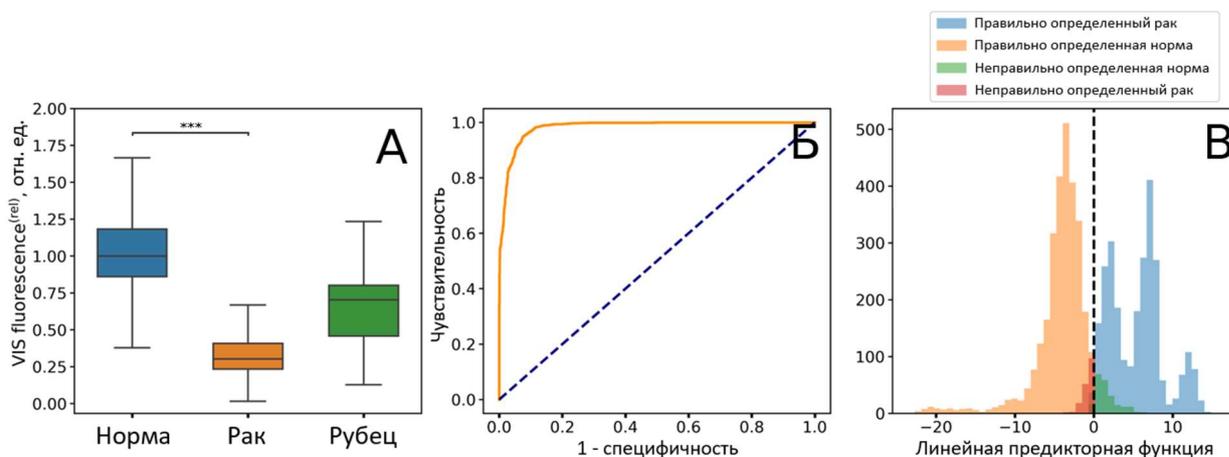


Рисунок 4.6. (А) Диаграммы размаха относительной интенсивности видимой флуоресценции здоровой ткани, опухоли и рубцовой ткани. (Б, В). Результаты классификации здоровых и раковых тканей с использованием четырех признаков (относительные показатели общего гемоглобина  $Hb_{total}^{(rel)}$ , оксигенации  $SpO_2^{(rel)}$ , рассеяния  $Scattering^{(rel)}$  и интенсивности видимой флуоресценции). (Б) ROC-кривая, AUC=0.98. (В) Гистограмма значений линейной предикторной функции для измерений раковой и здоровой ткани.

Помимо опухолевой, рубцовой и здоровой ткани, были исследованы участки воспаления мочевого пузыря (Рис. 4.7). Один из воспаленных участков первоначально был заподозрен хирургами как злокачественный из-за внешнего вида. Воспаленная ткань характеризовалась повышенными значениями относительных индексов общего гемоглобина (рис. 4.7А) и рассеяния (рис. 2.7В), сниженной видимой флуоресценцией (рис. 4.7Г), но при этом демонстрировала более высокую оксигенацию по сравнению с опухолевыми очагами (рис. 4.7Б). Подозрительный участок, ошибочно принятый за рак, по большинству показателей соответствовал воспалительным изменениям, за исключением уровня общего гемоглобина  $Hb_{total}^{(rel)}$ , что объясняется повышенной васкуляризацией здоровой ткани у

данного пациента. Результаты биопсии подтвердили наличие реактивных изменений стенки мочевого пузыря без признаков малигнизации.

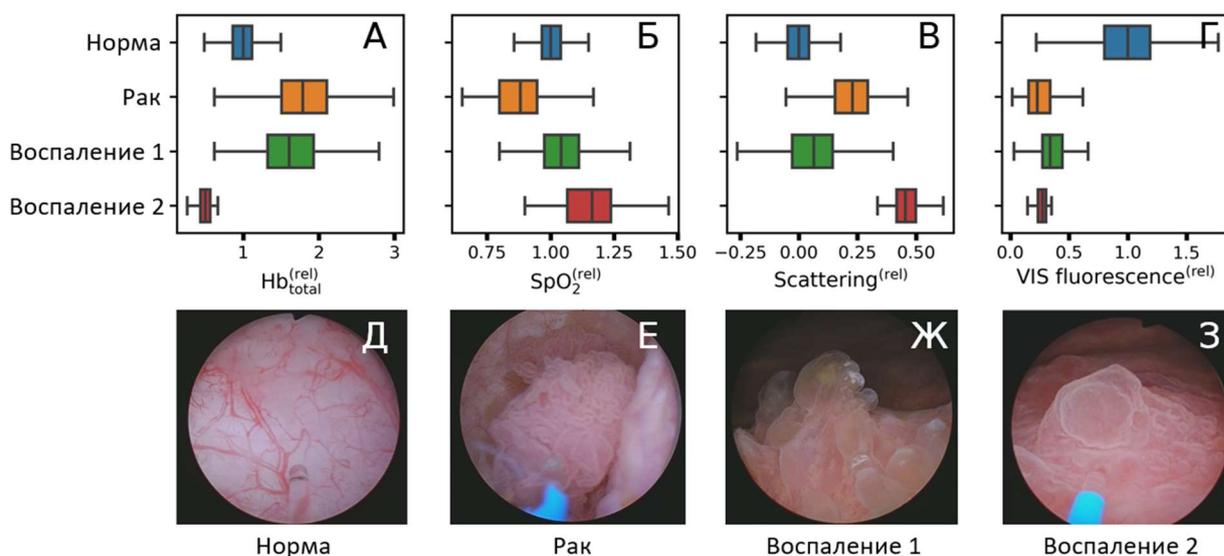


Рисунок 4.7. (А-Г) Диаграммы размаха относительных показателей: (А) общего гемоглобина, (Б) оксигенации, (В) рассеяния, (Г) видимой флуоресценции для здоровой, опухолевой ткани и двух участков воспаления. (Д-З) Фотографии различных тканей мочевого пузыря: (Д) Здоровая ткань, (Е) Опухолевая ткань, (Ж-З) Участки с воспалением.

С помощью классификатора, дополнительно использующего относительный показатель интенсивности видимой флуоресценции, воспаление определяется как раковая ткань с точностью 66.6%. Рубцовая ткань корректно определяется как здоровая с точностью 96.5%.

#### 4.2.3. БИК флуоресценция и спектроскопия КР

В среднем, в опухолевой ткани наблюдалась несколько более низкая относительная интенсивность БИК флуоресценции по сравнению со здоровой тканью (Рисунок 4.8А). Значения относительной интенсивности флуоресценции в БИК диапазоне у рубцовой ткани статистически не отличались от здоровой ткани и демонстрировали высокую вариабельность. При использовании только значения относительной флуоресценции в БИК диапазоне в качестве входного параметра для модели, предсказывающий тип

ткани (здоровая или опухолевая), значение AUC составило 0.686 (Рисунок 4.8Б). Таким образом, качество классификации с использованием относительной флуоресценции в БИК диапазоне значительно уступает таковому при использовании спектроскопии диффузного отражения или флуоресцентной спектроскопии в видимом диапазоне.

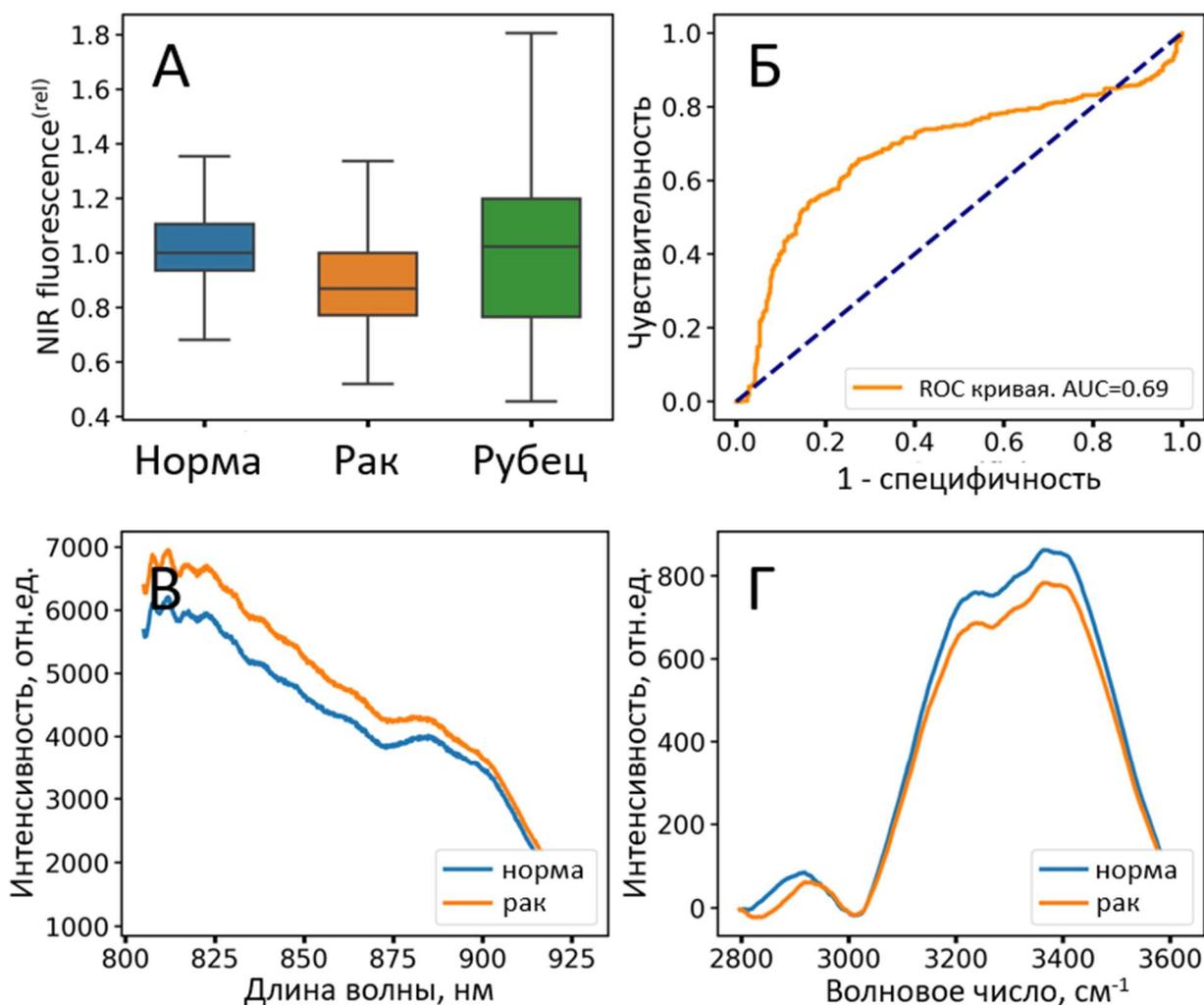


Рисунок 4.8. (А) Диаграммы размаха относительной интегральной интенсивности флуоресценции в БИК диапазоне для здоровой, опухолевой и рубцовой ткани. (Б) ROC-кривая классификатора, прогнозирующего тип ткани (здоровая/опухолевая) только по относительной интенсивности БИК флуоресценции. (С) Усредненные спектры БИК флуоресценции здоровой и опухолевой ткани для одного из пациентов. (Д) Типичные спектры КР, демонстрирующие колебательные полосы О-Н и С-Н для здоровой и опухолевой ткани у одного из пациентов.

Помимо относительной интенсивности флуоресценции в БИК диапазоне, из спектров в ближнем инфракрасном диапазоне были рассчитаны амплитуды колебательных полос С-Н и О-Н (Рисунок 4.8Г). Поскольку во время операции мочевого пузыря заполнен водой, это вносит дополнительный вклад в полосу О-Н, что затрудняет оценку амплитуды линии О-Н или соотношения интенсивностей линий О-Н и С-Н.

Поскольку измерения спектров флуоресценции в БИК диапазоне проводились последовательно с измерениями спектров видимой флуоресценции, для оценки диагностической ценности интенсивности флуоресценции в БИК диапазоне в качестве дополнительного признака была построена классификационная модель на основе средних значений интенсивности. Результаты эксперимента показывают, что значение AUC, рассчитанное при погрупповой кросс-валидации, не изменяется при добавлении средней интенсивности БИК флуоресценции в качестве признака.

Одной из причин низкого качества классификации при использовании интенсивности БИК флуоресценции в качестве признака может быть неконтролируемое расстояние между торцем волокна и поверхностью ткани, которое в нашем исследовании могло варьироваться от 0 до 1 мм. По сравнению с видимой флуоресценцией, интенсивность БИК флуоресценции демонстрировала значительно меньший контраст (интенсивность видимой флуоресценции отличалась до 4 раз между раковой и здоровой тканью, тогда как интенсивность БИК флуоресценции — менее чем в 1.5 раза). Более того, в 4 случаях из 10 средняя интенсивность БИК флуоресценции была немного выше для раковой ткани по сравнению со здоровой, что также могло быть связано с вариациями расстояния между волокном и тканью во время измерения.

В работе [120] было протестировано устройство, сочетающее цистоскопию в белом свете и ИК визуализацию, для обнаружения рака мочевого пузыря *in vivo*. Авторы отметили, что опухоли на ранней стадии (T<sub>a</sub>)

имели сниженную флуоресценцию, тогда как опухоли на более поздних стадиях (T1, T2) демонстрировали повышенную флуоресценцию по сравнению с другими участками опухоли и здоровой ткани. Это также подтверждает выводы о ненадежности интенсивности флуоресценции в БИК диапазоне в качестве дескриптора для локализации опухоли мочевого пузыря.

Основной причиной низкой эффективности спектроскопии КР в области высоких волновых чисел для классификации опухолей мочевого пузыря является заполнение мочевого пузыря физическим раствором во время операции. Эта жидкость также вносит вклад в колебательную полосу О-Н, когда зонд не плотно прижат к поверхности ткани, искажая результат. Кроме того, при более высоких интенсивностях БИК флуоресценции наблюдалось небольшое изменение формы спектра (Рисунок 2.9А). При вычитании флуоресцентного фона наблюдались отрицательные значения линий С-Н и О-Н (Рисунок 2.9Б). Следовательно, спектры КР не могли быть использованы для классификации.

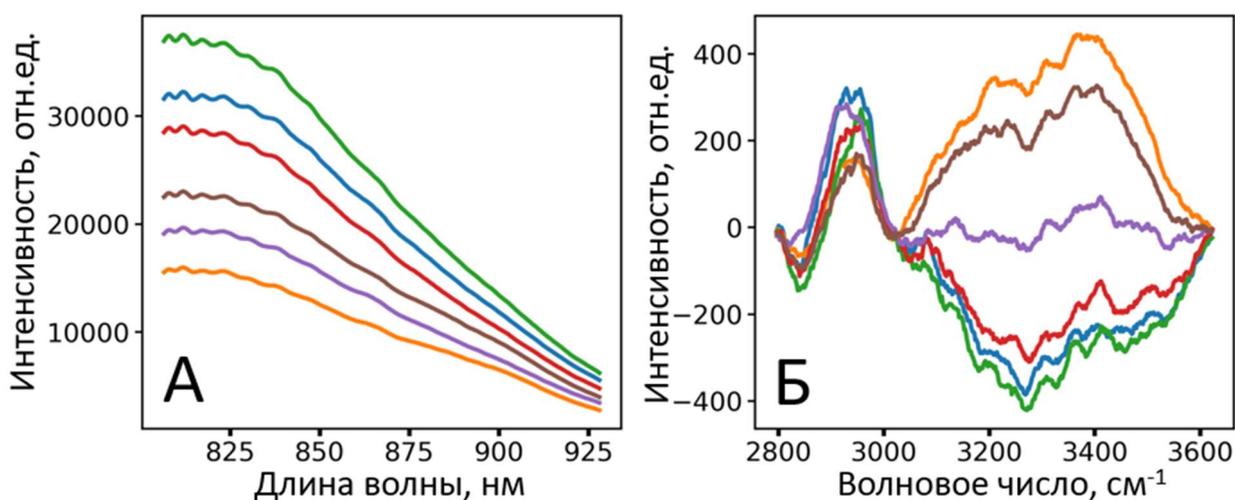


Рисунок 2.9. (А) Спектры флуоресценции в ближней инфракрасной области (каждый 5-й спектр) при сканировании участка раковой ткани одного из пациентов. (Б) Соответствующие спектры комбинационного рассеяния, демонстрирующие колебательные полосы О-Н и С-Н после вычитания флуоресцентного фона.

### 4.3. Сравнительный анализ классификаторов, использующих разные комбинации признаков

Метрики классификации, полученные для различных комбинаций признаков, полученных из спектров диффузного отражения и флуоресцентных спектров при возбуждении на длине волны 405 нм, приведены в Таблице 4.2.

Для воспаленной ткани точность обнаружения в качестве раковой ткани была достаточно высокой (>50%), как при использовании только признаков из спектров эффективной оптической плотности, так и при добавлении интенсивности видимой флуоресценции. Помимо оптических методов, примененных в нашем исследовании, для различения воспаления и раковой ткани мочевого пузыря могут использоваться другие диагностические методы. Точность идентификации рубцовой ткани как здоровой с помощью метода спектроскопии диффузного отражения была умеренной; при добавлении видимой флуоресценции точность значительно улучшилась (более 90%). Таким образом, разработанный алгоритм может быть полезен при повторных цистоскопиях для обследования послеоперационной области на предмет рецидива опухоли.

Предложенная процедура сканирования удобна для хирурга во время операции, однако фиксация геометрии представляет собой сложную задачу (особенно при измерении экзофитного рака, который представляет собой подвижную древовидную опухоль, см. Рисунок 4.3Б,Д). Оценки показывают, что изменение расстояния между волокном и тканью от 0 до 1 мм не приводит к изменению индекса  $Hb_{total}^{(rel)}$ , но вызывает изменение индекса  $Scattering^{(rel)}$  на уровне 0.1–0.2, что незначительно по сравнению с вариабельностью спектров поглощения между пациентами (Рисунок 4.4Б,Е). Таким образом, данное обстоятельство не оказывает существенного влияния на расчетные индексы, используемые в классификации.

Таблица 4.2. Метрики качества классификации (чувствительность, специфичность, ROC-AUC) для различных комбинаций признаков, извлеченных из спектральных данных.

Используемый признак	Погрупповая кросс-валидация			Все данные
	Чувствительность	Специфичность	ROC-AUC	ROC-AUC
$Hb_{total}^{(rel)}$	$78 \pm 39\%$	$87 \pm 12\%$	$0.82 \pm 0.17$	0.89
$Scattering^{(rel)}$	$82 \pm 28\%$	$87 \pm 11\%$	$0.84 \pm 0.14$	0.88
$SpO_2^{(rel)}$	$67 \pm 43\%$	$34 \pm 14\%$	$0.50 \pm 0.18$	0.60
$Hb_{total}^{(rel)}$ , $scattering^{(rel)}$	$79 \pm 38\%$	$85 \pm 14\%$	$0.82 \pm 0.21$	0.90
$Hb_{total}^{(rel)}$ , $SpO_2^{(rel)}$	$78 \pm 39\%$	$87 \pm 11\%$	$0.82 \pm 0.17$	0.89
$Scattering^{(rel)}$ , $SpO_2^{(rel)}$	$83 \pm 29\%$	$88 \pm 10\%$	$0.85 \pm 0.16$	0.92
$Hb_{total}^{(rel)}$ , $scattering^{(rel)}$ , $SpO_2^{(rel)}$	$78 \pm 37\%$	$90 \pm 10\%$	$0.84 \pm 0.17$	0.92
$Hb_{total}^{(rel)}$ , $scattering^{(rel)}$ , $SpO_2^{(rel)}$ , VIS $fluorescence^{(rel)}$	$78 \pm 36\%$	$91 \pm 11\%$	$0.84 \pm 0.16$	0.92
$Hb_{total}^{(rel)}$ , VIS $fluorescence^{(rel)}$	$82 \pm 33\%$	$88 \pm 11\%$	$0.85 \pm 0.14$	0.89

#### 4.4. Сравнение разработанного метода с другими исследованиями

Аналогично методике NBI [121], волоконное зондирование позволяет достичь высоких значений чувствительности, но склонно ошибочно идентифицировать воспаленные участки, что приводит к снижению специфичности.

В ранее опубликованных исследованиях, использующих только спектроскопию диффузного отражения для оценки тканей *in situ* у людей, были получены следующие результаты [7,93]. В работе [7] были достигнуты значения чувствительности и специфичности 91% и 60% при использовании аналогичной методики измерений. Основным диагностически значимым параметром в этой работе было общее содержание гемоглобина в ткани, что согласуется с нашими результатами.

В еще одном исследовании было показано, что использование наклона спектра оптической плотности в диапазоне 330–370 нм позволяет увеличить чувствительность и специфичность до 100% и 97% соответственно [93]. Предложенная методика требует специального двухволоконного зонда в отличие от рассмотренной в данной работе.

Согласно результатам наших экспериментов, добавление данных флуоресценции может повысить точность классификации (Таблица 4.2). Чувствительность и специфичность, рассчитанные с помощью погрупповой кросс-валидации, составили 78% и 91% соответственно. Этот результат коррелирует с работой [94], где были получены сопоставимые значения чувствительности и специфичности (76.6% и 87%). В этом исследовании две методики — автофлуоресцентная спектроскопия и спектроскопия диффузного отражения — использовались совместно для измерений *in situ* на модели опухоли мочевого пузыря у мышей. Таким образом, использование спектров автофлуоресценции при возбуждении на длине волны 405 нм предоставляет дополнительную информацию о типе ткани, дополняя спектроскопию диффузного отражения.

Как было сказано в разделе 1.2.3. Главы 1 основными флуорофорами слизистой считаются НАДН, коллаген I типа и флавины [83,122]. Для мочевого пузыря НАДН и флавины преимущественно локализованы в эпителиальном слое (150–200 мкм), тогда как коллаген находится глубже — в собственной пластинке и мышечном слое. Возможными причинами снижения интенсивности флуоресцентного сигнала в раковой ткани по сравнению со здоровой являются утолщение эпителиального слоя, приводящее к уменьшению флуоресценции коллагена и связанных флуорофоров, а также изменения метаболического статуса клеток. В работе [95] использовалась автофлуоресцентная спектроскопия с возбуждением на длине волны 337 нм для обнаружения рака мочевого пузыря во время цистоскопии. Для разделения здоровой и раковой ткани рассчитывалось отношение  $I_{385}/I_{455}$ . Было выдвинуто предположение, что это отношение зависит как от толщины эпителия, так и от содержания гемоглобина. Те же соображения применимы и к нашему случаю: снижение флуоресценции раковой ткани может быть связано с увеличением содержания гемоглобина, а также с усилением рассеяния из-за увеличения толщины эпителия и менее эффективного возбуждения в глубоких слоях.

Коэффициенты Спирмена для интенсивности флуоресценции и содержания гемоглобина указывают на то, что в некоторых случаях изменение содержания гемоглобина может быть определяющим фактором снижения флуоресценции, однако часто антикорреляция между интенсивностью флуоресценции и оценкой содержания гемоглобина по спектрам диффузного отражения на измеренных данных не наблюдалась. Так, для раковой ткани корреляция и антикорреляция наблюдались в 3 и 2 случаях из 8 соответственно, а для здоровой ткани — в 3 и 7 случаях из 12 при уровне значимости 0.05 с поправкой Бонферрони.

#### **4.5. Использование спектроскопии диффузного отражения для оценки оксигенации и содержания гемоглобина других тканей**

Оценка оксигенации в ткани и общего содержания гемоглобина может использоваться не только для интраоперационной идентификации раковых и здоровых тканей, но и для других задач интраоперационной диагностики. Например, актуальной задачей является оценка жизнеспособности и перфузии околощитовидных желез (ОЩЖ) во время операции по удалению щитовидной железы (ЩЖ), называемой тиреоидэктомией. Во время такой операции нередко может нарушаться кровоснабжение ОЩЖ, что приводит к послеоперационным осложнениям у пациента в виде гипопаратиреоза (снижения выработки уровня паратгормона) и гипокальциемии (снижении выработки кальция) [123–125]. Существующие подходы в основном опираются на опыт хирурга, визуальный осмотр и пальпацию [126]. Кроме того, «золотым стандартом» оценки жизнеспособности ОЩЖ является измерение уровня паратгормона, однако он является косвенным методом.

Один из методов оценки перфузии ОЩЖ, уже применяемых в клинике, является использование флуоресцентного красителя индоцианина зеленого. Данный краситель вводится в кровоток пациенту и связывается с белками плазмы крови. По интенсивности флуоресценции хирург определяет перфузию ОЩЖ и оценивает ее жизнеспособность. Однако этому методу присущи недостатки: отсутствие стандартизированной системы для оценки интенсивности флуоресценции и возможные ошибки из-за накопления красителя в щитовидной железе.

Перфузия и жизнеспособность ОЩЖ также могут быть оценены без введения контрастных веществ. Одним из перспективных методов объективной оценки кровотока является лазерная спекл-контрастная визуализация (ЛСКВ), которая позволяет анализировать перфузию ОЩЖ по размытию спекл-картины. Однако данный метод крайне чувствителен к движениям, которые могут артефакты и снижать точность измерений.

Метод оценки оксигенации и содержания полного гемоглобина на основе спектроскопии диффузного отражения, разработанный в данной работе для интраоперационного определения опухоли мочевого пузыря, можно также применить и для других тканей, в том числе для оценки жизнеспособности и перфузии ОЩЖ. Так как удаление щитовидной железы является открытой операцией и проводится без эндоскопа, для этого был изготовлен специальный стерилизуемый зонд с двумя хирургическими волокнами, по одному из которых подавалось излучение от широкополосного источника света (галогеновая лампа ВМ-8814, Brolight). Второе волокно являлось детектирующим и было подсоединено к спектрометру (YIXIST, разрешение 12 нм, время накопления 20 мс).

Измерения проводились во время тиреоидэктомии в «НМИЦ Эндокринологии». От всех пациентов было получено информированное согласие. Также было получено разрешение локального этического комитета на проведение эксперимента.

В рамках специально проведённого эксперимента, предусматривающего временную окклюзию (сжатие) сосудов, питающих околощитовидные железы, была выполнена оценка изменений их оксигенации. Полученные данные показали следующие закономерности: в двух клинических случаях тиреоидэктомии зафиксировано статистически значимое снижение степени оксигенации ОЩЖ, рассчитанного по формуле (4.4), после пережатия сосудов по сравнению с исходным уровнем (Рисунки 4.10В, Г). Наиболее выраженная динамика наблюдалась при полной окклюзии, когда оксигенация ОЩЖ достигла нулевых значений в течение нескольких минут (Рисунок 4.10Г). Было отмечено исчезновение двух локальных максимумов, характерных для спектра поглощения оксигемоглобина, с одновременным появлением единственного максимума, соответствующего спектру поглощению дезоксигемоглобина, что свидетельствует о полной деоксигенации ткани (Рисунок 4.10Б). В другом случае полная окклюзия не была подтверждена,

однако хирург отметил визуальное изменение цвета ткани на синеватый оттенок, что косвенно подтверждает снижение оксигенации. Для визуальной оценки на рисунках 4.10А, Б представлены спектры  $OD_{sub}$ , иллюстрирующие постепенное уменьшение локальных максимумов поглощения гемоглобина со временем. Соответствующее снижение общего индекса гемоглобина, рассчитанного по формуле (4.2) наблюдалось в обеих операциях и коррелировало с временем, прошедшим с момента пережатия сосудов (Рисунки 4.10Д, Е). Это может указывать на то, что изменение значения полного гемоглобина в тканях, связанное с нарушением кровоснабжения, также может быть использовано для определения повреждения ОЦЖ.

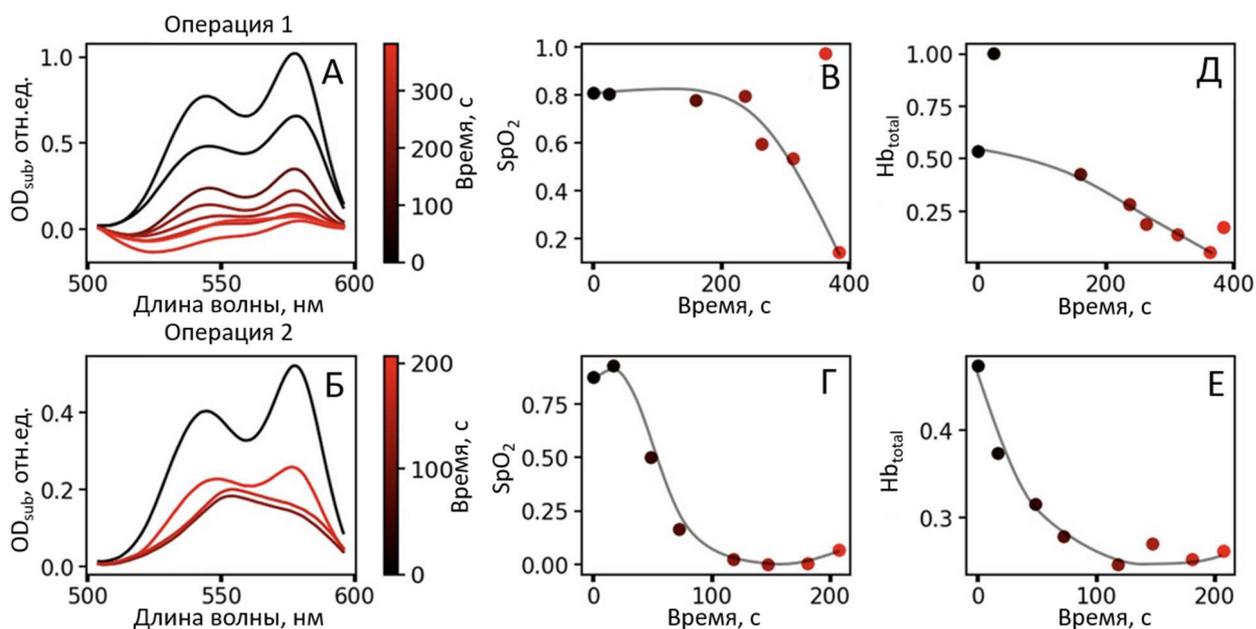


Рисунок 4.10. А, Б – Спектры эффективной оптической плотности (после вычитания прямой) ОЦЖ, зарегистрированные во время двух оперативных вмешательств. В, Г – Динамика степени оксигенации во время окклюзии сосудов. Д, Е – Динамика индекса полного гемоглобина во время окклюзии сосудов.

Спектры эффективной оптической плотности ОЦЖ, соответствующие различным уровням оксигенации крови, представлены на рисунке 4.11А. Локальный минимум поглощения оксигемоглобина в спектре, окрашенном

синим цветом, более выражен, что указывает на более высокую степень оксигенации ОЦЖ ( $SpO_2 = 0.9$ ) по сравнению со спектром, окрашенным оранжевым цветом ( $SpO_2 = 0.5$ ). Синий и оранжевый спектры на рисунке 4.11А соответствуют спектрам отражения, измеренным от ОЦЖ до и после удаления щитовидной железы, а соответствующие уровни ПТГ в крови составили 69 и 24 пг/мл. Таким образом, учитывая явное снижение степени оксигенации ОЦЖ (с 0.9 до 0.6) и снижение уровня ПТГ сразу после операции, можно предположить, что перфузия ОЦЖ могла быть нарушена, и этот факт можно предсказать по данным СДО.

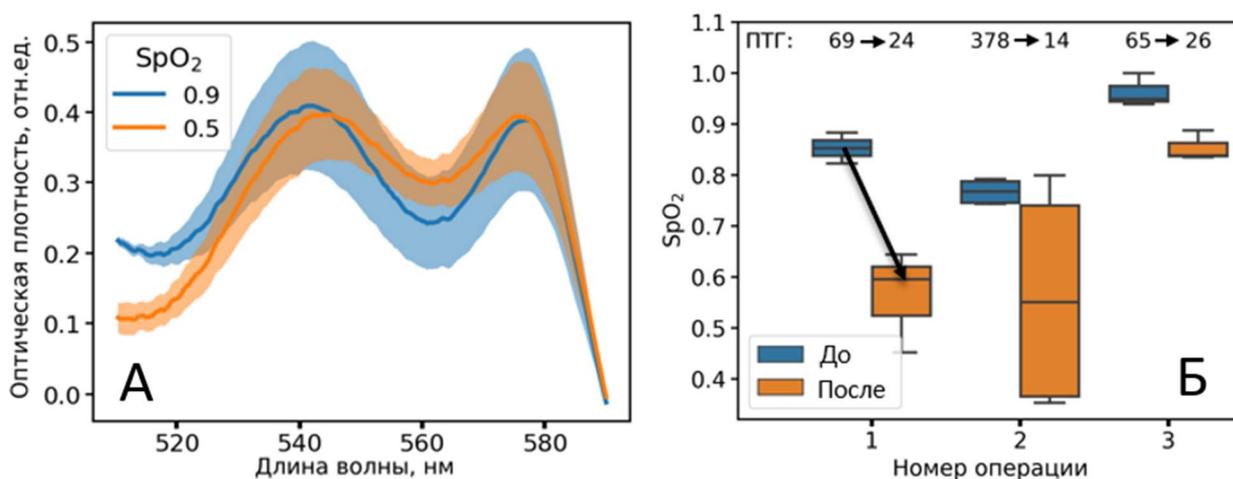


Рисунок 4.11. А – Усредненные спектры эффективной оптической плотности ОЦЖ, полученные на первой операции, снятые до и после удаления щитовидной железы, прозрачным показана величина стандартного отклонения. В легенде отмечены значения оксигенации, рассчитанные по усредненным спектрам. Б – Диаграммы размаха степени оксигенации ОЦЖ до и после удаления щитовидной железы для разных операций, сверху представлены значения ПТГ, полученных до (синие) и после (оранжевые) операции.

На рисунке 4.11Б представлены средние значения степени оксигенации ОЦЖ для трех операций до и после удаления щитовидной железы. Соответствующие уровни ПТГ указаны в верхней части панели рисунка 11Б.

Очевидно, что снижение уровня ПТГ сопровождается снижением степени оксигенации ОЩЖ. Полученные результаты свидетельствуют о наличии корреляции между показателями степени оксигенации ОЩЖ, рассчитанными по спектрам диффузного отражения, и послеоперационным уровнем ПТГ у пациентов после тиреоидэктомии.

Таким образом, было показано, что метод расчета степени оксигенации и полного гемоглобина на основе спектроскопии диффузного отражения может быть использован не только для интраоперационного определения здоровой и патологической ткани мочевого пузыря, но и для других задач интраоперационной диагностики, а именно для оценки жизнеспособности ОЩЖ во время операции по удалению щитовидной железы.

#### **4.6. Выводы**

В данной главе были продемонстрированы возможности мультимодального подхода, сочетающего спектроскопию диффузного отражения, флуоресцентную спектроскопию в видимом и ближнем инфракрасном диапазонах, а также рамановскую спектроскопию высоких волновых чисел с использованием одножильного оптического волокна для дифференциации рака мочевого пузыря и здоровой ткани во время операции. Различные комбинации нормированных спектральных индексов, полученных из оптических данных, были использованы для построения классификационной модели на основе алгоритма логистической регрессии. Сочетание спектроскопии диффузного отражения и флуоресцентной спектроскопии в видимом диапазоне позволило обнаруживать раковую ткань с чувствительностью 78% и специфичностью 91%. Такой мультимодальный подход не требует специальных зондов и может применяться с использованием стандартного одножильного хирургического оптического волокна во время процедуры удаления опухоли. Кроме того, данный метод

легко может быть интегрирован в лазерный аппарат для удаления патологических тканей.

Также было показано, что разработанный метод определения степени оксигенации и содержания полного гемоглобина на основе СДО может быть применен для определения жизнеспособности других тканей во время операции.

## Заключение

В диссертационной работе были получены следующие основные результаты:

- На основе спектроскопии диффузного отражения разработан алгоритм для автоматического распознавания типа ткани (почечный камень или слизистая оболочка) в режиме реального времени во время лазерной литотрипсии. Точности определения мягкой ткани и камня составили по 93%.
- Показано, что модель для распознавания типа ткани перед оптоволоконном по спектрам оптической плотности способна правильно определять не только неповрежденную мягкую ткань и камень, но и более сложные случаи, такие как коагулированная ткань и кровотечение на фоне камня с точностями соответственно 67 и 80%.
- Разработанный алгоритм распознавания типа ткани перед оптоволоконном и автоматического прекращения подачи излучения при наведении на слизистую был встроен в клинический лазерный аппарат.
- Показано, что трехмерные матрицы возбуждения-эмиссии флуоресценции отличаются у уратных, оксалатных и гидроксиапатитовых камней. Спектры флуоресценции уратных камней отличаются смещением максимума эмиссии в длинноволновую область, а оксалатных – наличием характерного вторичного пика при  $\lambda_{\text{возб}}=420$  нм и  $\lambda_{\text{эм}}=620$  нм. При этом механизм формирования флуоресценции связан с наличием окисленных органических молекул в минеральной матрице конкремента, образующих гетерогенную систему флуорофоров.
- Была разработана математическая модель, которая по данным СДО и трехмерным матрицам возбуждения-эмиссии флуоресценции при использовании ИК-Фурье спектроскопии в качестве референсного метода, определяет доминирующий тип почечного камня (урат, оксалат,

гидроксиапатит) перед оптоволоконном с точностью 92% (f1-мера), а также процентное содержание данных веществ с относительной ошибкой 11%, 27% и 24% для урата, оксалата и гидроксиапатита соответственно. Данная модель также определяет плотность почечных камней со средней абсолютной ошибкой 290 единиц Хаунсфилда.

- Проведена сравнительная оценка вклада различных методов оптической спектроскопии в диагностику рака мочевого пузыря *in vivo*. Установлено, что флуоресцентная спектроскопия в БИК-диапазоне и спектроскопия КР в области высоких волновых чисел в условиях цистоскопии демонстрируют низкий диагностический контраст (AUC для БИК-флуоресценции = 0.686). Наибольший вклад вносят спектроскопия диффузного отражения и флуоресценция в видимом диапазоне, что обосновывает оптимальный выбор методов для диагностической системы, которую можно встроить в лазерный аппарат.
- На раковой ткани наблюдался повышенный индекс полного гемоглобина, пониженная степень оксигенации и повышенный индекс рассеяния. Кроме того, наблюдалась пониженная интенсивность флуоресценции в видимом диапазоне от опухолевой ткани, которая связана с изменением вклада клеток эпителия в детектируемый сигнал.
- Была разработана модель, которая по данным СДО и флуоресцентной спектроскопии в видимом диапазоне способна определять раковую и здоровую ткань *in vivo* с точностями 78 и 91% соответственно. Алгоритм также показал способность с высокой точностью (96.5%) отличать послеоперационные рубцы от опухолевой ткани.
- Показано, что разработанный метод определения степени оксигенации и содержания полного гемоглобина на основе СДО также эффективен для определения жизнеспособности других тканей во время операции.

## **Благодарности**

Выражаю искреннюю благодарность научным руководителям, Ширшину Евгению Александровичу и Фадееву Виктору Владимировичу, за профессионализм и всестороннюю помощь на каждом этапе исследования, а также за неоценимый опыт, полученный в процессе подготовки данной диссертации. Также выражаю благодарность всему коллективу лаборатории лазерной биофотоники кафедры квантовой электроники физического факультета МГУ за готовность помочь и поддержание неповторимой атмосферы. Особенно хотелось бы поблагодарить Будылина Глеба Сергеевича за готовность поделиться опытом и неоценимую помощь на протяжении всего исследования, а также Давыдова Дениса Андреевича за ценные советы и поддержку. Также выражаю благодарность Церегородцевой Полине и Ширяеву Святославу за помощь при проведении экспериментов и обработке данных, без которой была бы невозможна данная диссертационная работа.

Искренне благодарю коллектив урологического отделения МНОИ МГУ и его директора Камалова Армаиса Альбертовича, без которых выполнение данной работы было бы невозможно. Отдельно хотелось бы сказать спасибо хирургам Сорокину Николаю Ивановичу, Камалову Давиду Михайловичу, Дзитиеву Виталию Казихановичу, Хохлову Максиму Андреевичу, Стригунову Алексею Михайловичу за безграничное терпение и неоценимую помощь в *in vivo* экспериментах. Особая благодарность Цигура Дарье за помощь в организационных вопросах при проведении экспериментов во время операций.

Спасибо компании «VPG Laserone» и всем причастным сотрудникам за предоставление лазерного аппарата для экспериментов и плодотворное сотрудничество.

И, конечно, выражаю огромную благодарность родителям, мужу и друзьям за то, что были рядом и верили в меня.

## Публикации автора по теме диссертации

*Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:*

A1. Ширшин Е.А., Якимов Б.П., Будылин Г.С., **Злобина Н.В. (Корнева Н.В.)**, Давыдов Д.А., Армаганов А.Г., Фадеев В.В., Сысоев Н.Н., Камалов А.А. *Биомедицинская фотоника в задачах интраоперационной диагностики: обзор возможностей и клинических применений* // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия, 2022, № 6, С. 3–18. Импакт-фактор 0,125 (РИНЦ). EDN: OUNHXI. Общий объем статьи = 2 п.л., личный вклад = 0,3 п.л.

Переводная версия: Shirshin E.A., Yakimov B.P., Budylin G.S., **Zlobina N.V. (Korneva N.V.)**, Davydov D.A., Armaganov A.G., Fadeev V.V., Sysoev N.N., Kamalov A.A. *Biomedical photonics for intraoperative diagnostics: review of capabilities and clinical applications* // Moscow University Physics Bulletin, 2022, Vol. 77, No. 6, P. 777–800. Импакт-фактор 0,4 (JIF). EDN: ANUEXU. Общий объем статьи = 2 п.л., личный вклад = 0,3 п.л.

A2. Tseregorodtseva P.S., Budylin G.S., **Zlobina N.V. (Korneva N.V.)**, Gevorkyan Z.A., Filatova D.A., Tsigura D.A., Armaganov A.G., Strigunov A.A., Nesterova O.Y., Kamalov D.M., Afanasyevskaya E.V., Mershina E.A., Sorokin N.I., Sinitsyn V.E., Kamalov A.A., Shirshin E.A. *Multiwavelength fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy for an in situ analysis of kidney stones* // Photonics, 2023, Vol. 10, No. 12, P. 1353. Импакт-фактор 1,9 (JIF). EDN: ESJJOE. Общий объем статьи = 0,638 п.л., личный вклад = 0,5 п.л.

A3. **Zlobina N.V. (Korneva N.V.)**, Budylin G.S., Tseregorodtseva P.S., Andreeva V.A., Sorokin N.I., Kamalov D.M., Strigunov A.A., Armaganov A.G., Kamalov A.A., Shirshin E.A. *In vivo assessment of bladder cancer with diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy: A comparative study* // Lasers in Surgery and Medicine, 2024, Vol. 56, No. 5, P. 496–507. Импакт-фактор 1,9

(JIF). EDN: SBLKVC. Общий объем статьи = 1,425 п.л., личный вклад = 1,1 п.л.

- A4. Tseregordtseva P., Budylin G., **Korneva N.**, Kim I., Shiriaev S., Yakimov B., Pachuashvili N., Vorotnikov A., Shcherbakova A., Willmon P., Petrov V., Tuchin V., Mokrysheva N., Mahadevan-Jansen A., Urusova L., Shirshin E. *Parathyroid glands viability assessment and identification during surgery with multimodal diffuse reflectance spectroscopy and NIR autofluorescence probe* // Scientific Reports, 2025, Vol. 15, P. 22097. Импакт-фактор 3,9 (JIF). EDN: VASVRT. Общий объем статьи = 0,657 п.л., личный вклад = 0,5 п.л.
- A5. **Korneva N.**, Budylin G., Tseregordtseva P., Nikitin D., Andreeva V., Baytsaeva O., Rudomanova P., Musaeva D., Yakupov F., Baranov A., Armaganov A., Gevorkyan Z., Tsigura D., Kamalov D., Nesterova O., Strigunov A., Sorokin N., Kamalov A., Shirshin E. *Optical feedback for safe automatic laser lithotripsy: tissue sensor implementation in a clinical system* // Lasers in Surgery and Medicine, 2026, Vol. 58, No. 1, P. 38–48. Импакт-фактор 1,9 (JIF). EDN: NERDFB. Общий объем статьи = 1,338 п.л., личный вклад = 1,1 п.л.

## Список литературы

1. Boichenko E., Kirsanov D. Optical spectroscopy and chemometrics in intraoperative tumor margin assessment // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2023. Vol. 160. P. 116955.
2. Schlager D. et al. Laser-guided real-time automatic target identification for endoscopic stone lithotripsy: a two-arm in vivo porcine comparison study // *World J. Urol.* 2021. Vol. 39, № 7. P. 2719–2726.
3. Tamosaityte S. et al. Raman spectroscopy as a non-destructive tool to determine the chemical composition of urinary sediments // *Comptes Rendus. Chim.* 2022. Vol. 25, № S1. P. 1–10.
4. Li X. et al. Autofluorescence spectral analysis for detecting urinary stone composition in emulated intraoperative ambient // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2023. Vol. 300. P. 122913.
5. Aaboubout Y. et al. Intraoperative assessment of resection margins by Raman spectroscopy to guide oral cancer surgery // *Analyst. The Royal Society of Chemistry*, 2023. Vol. 148, № 17. P. 4116–4126.
6. Koenig F. et al. Spectroscopic measurement of diffuse reflectance for enhanced detection of bladder carcinoma // *Urology.* 1998. Vol. 51, № 2. P. 342–345.
7. Koenig F. et al. Spectroscopic measurement of diffuse reflectance for enhanced detection of bladder carcinoma // *Urology.* 1998. Vol. 51, № 2. P. 342–345.
8. Tuchin V. V. Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnosis: Third edition // *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis: Third Edition.* 3rd ed. SPIE, 2015. 1–935 p.
9. Кочубей В.И., Башкатов А.Н. Спектроскопия рассеивающих сред. Саратов: Новый ветер, 2014. 88 p.
10. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2 т. Т. 1. ФИЗМАТЛИТ, 2006. 559 p.
11. Wang L. V., Wu H.-I. Biomedical Optics // *Biomedical Optics.* 2009.
12. Bashkatov A.N. et al. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2005. Vol. 38, № 15. P. 2543–2555.
13. Gabella G. Lamina propria: The connective tissue of rat urinary bladder mucosa // *Neurourol. Urodyn.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 38, № 8. P. 2093–2103.

14. Jacques S.L. Optical properties of biological tissues: a review // *Phys. Med. Biol.* IOP Publishing, 2013. Vol. 58, № 11. P. R37.
15. Lange B. et al. Stone/tissue differentiation during intracorporeal lithotripsy using diffuse white light reflectance spectroscopy: In vitro and clinical measurements // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 46, № 8. P. 614–619.
16. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy // *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2006. 1–954 p.
17. Shirshin E.A. et al. Label-Free Multiphoton Microscopy: The Origin of Fluorophores and Capabilities for Analyzing Biochemical Processes // *Biochem.* 2019. Vol. 84. P. 69–88.
18. Mayevsky A., Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007. Vol. 292. P. 615–640.
19. Gaitan B. et al. Development of an endoscopic auto-fluorescent sensing device to aid in the detection of breast cancer and inform photodynamic therapy // *Metabolites.* MDPI, 2022. Vol. 12, № 11. P. 1097.
20. Lukina M.M. et al. Metabolic imaging in the study of oncological processes // *Sovrem. Tehnol. v Med.* 2016. Vol. 8, № 4. P. 113–124.
21. Vergen J. et al. Metabolic imaging using two-photon excited NADH intensity and fluorescence lifetime imaging // *Microsc. Microanal.* Oxford University Press, 2012. Vol. 18, № 4. P. 761–770.
22. Yu Q., Heikal A.A. Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2009. Vol. 95, № 1. P. 46–57.
23. Lifante J. et al. The role of tissue fluorescence in in vivo optical bioimaging // *J. Appl. Phys.* AIP Publishing LLC, 2020. Vol. 128, № 17.
24. Semenov A.N. et al. The oxidation-induced autofluorescence hypothesis: Red edge excitation and implications for metabolic imaging // *Molecules.* 2020. Vol. 25, № 8.
25. Qian X. et al. Epidemiological Trends of Urolithiasis at the Global, Regional, and National Levels: A Population-Based Study // *Int. J. Clin. Pract.* / ed. Wang Q. Hindawi, 2022. Vol. 2022. P. 6807203.
26. Lv G. et al. Safety and efficacy of extracorporeal shock wave lithotripsy vs. flexible ureteroscopy in the treatment of urinary calculi: A systematic review and meta-analysis // *Front. Surg.* 2022. Vol. 9.
27. Scales Jr C.D. et al. Comparative Effectiveness of Shock Wave Lithotripsy

- and Ureteroscopy for Treating Patients With Kidney Stones // *JAMA Surg.* 2014. Vol. 149, № 7. P. 648–653.
28. Kaplan-Marans E. et al. National Utilization, Reimbursement, and Urban Versus Rural Trends of Extracorporeal Shockwave Lithotripsy and Ureteroscopic Laser Lithotripsy // *Urology.* 2023. Vol. 174. P. 48–51.
  29. Haas C.R. et al. Ureteroscopy and Shock Wave Lithotripsy Trends from 2012 to 2019 Within the US Medicare Dataset: Sharp Growth in Ureteroscopy Utilization // *J. Endourol.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2022. Vol. 37, № 2. P. 219–224.
  30. Fried N.M. Recent advances in infrared laser lithotripsy [Invited] // *Biomed. Opt. Express.* Optica Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 9. P. 4552–4568.
  31. Rice P., and Somani B.K. A Systematic Review of Thulium Fiber Laser: Applications and Advantages of Laser Technology in the Field of Urology // *Res. Reports Urol.* Dove Medical Press, 2021. Vol. 13, № null. P. 519–527.
  32. Wright A.E., Rukin N.J., Somani B.K. Ureteroscopy and stones: Current status and future expectations. // *World J. Nephrol.* United States, 2014. Vol. 3, № 4. P. 243–248.
  33. Türk C. et al. EAU Guidelines on Interventional Treatment for Urolithiasis // *Eur. Urol.* 2016. Vol. 69, № 3. P. 475–482.
  34. Strittmatter F. et al. Laser-induced lithotripsy: a review, insight into laboratory work, and lessons learned // *Transl. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 2, № 1–2. P. e201900029.
  35. Marks A.J., Teichman J.M.H. Lasers in clinical urology: state of the art and new horizons // *World J. Urol.* 2007. Vol. 25, № 3. P. 227–233.
  36. Corrales M. et al. Classification of Stones According to Michel Daudon: A Narrative Review // *Eur. Urol. Focus.* 2021. Vol. 7, № 1. P. 13–21.
  37. Wilson D.M. Clinical and laboratory approaches for evaluation of nephrolithiasis // *J. Urol.* Elsevier, 1989. Vol. 141, № 3. P. 770–774.
  38. Wisenbaugh E.S. et al. Dual-energy vs Conventional Computed Tomography in Determining Stone Composition // *Urology.* 2014. Vol. 83, № 6. P. 1243–1247.
  39. Uvarov V. et al. X-ray diffraction and SEM study of kidney stones in Israel: quantitative analysis, crystallite size determination, and statistical characterization // *Environ. Geochem. Health.* 2011. Vol. 33, № 6. P. 613–622.
  40. Kravdal G., Helgø D., Moe M.K. Infrared spectroscopy is the gold standard for kidney stone analysis // *Tidsskr. Den Nor. legeförening.* 2015.
  41. Tonannavar J. et al. Identification of mineral compositions in some renal

- calculi by FT Raman and IR spectral analysis // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016. Vol. 154. P. 20–26.
42. Daudon M. et al. Examination of whewellite kidney stones by scanning electron microscopy and powder neutron diffraction techniques // *Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2009. Vol. 42, № 1. P. 109–115.
  43. Orlando M.T.D. et al. Study of calcium oxalate monohydrate of kidney stones by X-ray diffraction // *Powder Diffr. Cambridge University Press*, 2008. Vol. 23, № S1. P. S59–S64.
  44. Larsson L. et al. A method for quantitative wet chemical analysis of urinary calculi // *Clin. Chim. acta. Elsevier*, 1984. Vol. 140, № 1. P. 9–20.
  45. ROSE G.A., Woodfine C. The thermogravimetric analysis of renal stones (in clinical practice) // *Br. J. Urol. Wiley Online Library*, 1976. Vol. 48, № 6. P. 403–412.
  46. Štěpánková K. et al. Laser ablation methods for analysis of urinary calculi: comparison study based on calibration pellets // *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. Elsevier*, 2013. Vol. 81. P. 43–49.
  47. Ghosh S. et al. Structural and microstructural characterization of human kidney stones from eastern India using IR spectroscopy, scanning electron microscopy, thermal study and X-ray Rietveld analysis // *Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2009. Vol. 42, № 4. P. 629–635.
  48. Afzal M., Iqbal M., Ahmad H. Thermal analysis of renal stones // *J. Therm. Anal. Springer*, 1992. Vol. 38. P. 1671–1682.
  49. Aran S., Shaqdan K.W., Abujudeh H.H. Dual-energy computed tomography (DECT) in emergency radiology: basic principles, techniques, and limitations // *Emerg. Radiol. Springer*, 2014. Vol. 21. P. 391–405.
  50. McGrath T.A. et al. Diagnostic accuracy of dual-energy computed tomography (DECT) to differentiate uric acid from non-uric acid calculi: systematic review and meta-analysis // *Eur. Radiol.* 2020. Vol. 30, № 5. P. 2791–2801.
  51. Primak A.N. et al. Noninvasive differentiation of uric acid versus non-uric acid kidney stones using dual-energy CT // *Acad. Radiol. Elsevier*, 2007. Vol. 14, № 12. P. 1441–1447.
  52. Lopez F. et al. Assessing deep learning methods for the identification of kidney stones in endoscopic images // 2021 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC). IEEE, 2021. P. 2778–2781.
  53. Wilson C.R. et al. Collateral damage to the ureter and Nitinol stone baskets during thulium fiber laser lithotripsy // *Lasers Surg. Med. John Wiley &*

- Sons, Ltd, 2015. Vol. 47, № 5. P. 403–410.
54. PIERGIOVANNI M. et al. Ureteral and Bladder Lesions After Ballistic, Ultrasonic, Electrohydraulic, or Laser Lithotripsy\* // *J. Endourol.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 1994. Vol. 8, № 4. P. 293–299.
  55. Zheng J. et al. Risk factors for ureteroscopic lithotripsy: a case-control study and analysis of 385 cases of holmium laser ureterolithotripsy // *Videosurgery Other Miniinvasive Tech.* Termedia, 2020. Vol. 15, № 1. P. 185–191.
  56. Kozminski M.A. et al. Symptomatic Subcapsular and Perinephric Hematoma Following Ureteroscopic Lithotripsy for Renal Calculi // *J. Endourol.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2014. Vol. 29, № 3. P. 277–282.
  57. Lange B. et al. Stone/tissue differentiation for Holmium laser lithotripsy using autofluorescence: Clinical proof of concept study // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 49, № 4. P. 361–365.
  58. Daniel S. et al. A Novel Laser Lithotripsy System with Automatic Real-Time Urinary Stone Recognition: Computer Controlled Ex Vivo Lithotripsy is Feasible and Reproducible in Endoscopic Stone Fragmentation // *J. Urol.* WoltersKluwer, 2019. Vol. 202, № 6. P. 1263–1269.
  59. Schütz J. et al. Experimental evaluation of human kidney stone spectra for intraoperative stone-tissue-instrument analysis using autofluorescence // *J. Urol.* Wolters Kluwer Philadelphia, PA, 2019. Vol. 201, № 1. P. 182–188.
  60. Schlager D. et al. A novel laser lithotripsy system with automatic real-time urinary stone recognition: computer controlled ex vivo lithotripsy is feasible and reproducible in endoscopic stone fragmentation // *J. Urol.* Wolters Kluwer Philadelphia, PA, 2019. Vol. 202, № 6. P. 1263–1269.
  61. Eisel M. et al. Holmium: yttrium-aluminum-garnet laser induced lithotripsy: in-vitro investigations on fragmentation, dusting, propulsion and fluorescence // *Biomed. Opt. Express.* Optical Society of America, 2018. Vol. 9, № 11. P. 5115–5128.
  62. Baltussen E.J.M. et al. Using Diffuse Reflectance Spectroscopy to Distinguish Tumor Tissue From Fibrosis in Rectal Cancer Patients as a Guide to Surgery // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 52, № 7. P. 604–611.
  63. Spliethoff J.W. et al. Real-time In Vivo Tissue Characterization with Diffuse Reflectance Spectroscopy during Transthoracic Lung Biopsy: A Clinical Feasibility Study // *Clin. Cancer Res.* 2016. Vol. 22, № 2. P. 357–365.
  64. de Boer L.L. et al. Towards the use of diffuse reflectance spectroscopy for real-time in vivo detection of breast cancer during surgery // *J. Transl. Med.* 2018. Vol. 16, № 1. P. 367.
  65. Castiglione V. et al. Raman chemical imaging, a new tool in kidney stone

- structure analysis: Case-study and comparison to Fourier Transform Infrared spectroscopy // PLoS One. Public Library of Science, 2018. Vol. 13, № 8. P. e0201460.
66. Cui X. et al. Analysis and classification of kidney stones based on Raman spectroscopy // Biomed. Opt. Express. Optica Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 9. P. 4175–4183.
  67. Muhammed Shameem K.M. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy-Raman: An effective complementary approach to analyze renal-calculi // J. Biophotonics. John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 11, № 6. P. e201700271.
  68. Miernik A. et al. Is in vivo analysis of urinary stone composition feasible? Evaluation of an experimental setup of a Raman system coupled to commercial lithotripsy laser fibers // World J. Urol. 2015. Vol. 33, № 10. P. 1593–1599.
  69. Croce A.C., Bottiroli G. Autofluorescence Spectroscopy for Monitoring Metabolism in Animal Cells and Tissues BT - Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols / ed. Pellicciari C., Biggiogera M. New York, NY: Springer New York, 2017. P. 15–43.
  70. Bratchenko I.A. et al. Combined Raman and autofluorescence *ex vivo* diagnostics of skin cancer in near-infrared and visible regions // J. Biomed. Opt. 2017. Vol. 22, № 2. P. 1–10.
  71. Ajallouean F. et al. Bladder biomechanics and the use of scaffolds for regenerative medicine in the urinary bladder // Nat. Rev. Urol. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 15, № 3. P. 155–174.
  72. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2 т. Т. 2. ФИЗМАТЛИТ. 2007. 364 p.
  73. Volikova A.I. et al. Structural, biomechanical and hemodynamic assessment of the bladder wall in healthy subjects // Res. Reports Urol. 2019. Vol. 11. P. 233–245.
  74. Sanli O. et al. Bladder cancer // Nat. Rev. Dis. Prim. Macmillan Publishers Limited, 2017. Vol. 3. P. 1–19.
  75. Heiden M.G.V., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation // Science (80-. ). 2009. Vol. 324, № 5930. P. 1029–1033.
  76. Ostrander J.H. et al. Optical redox ratio differentiates breast cancer cell lines based on estrogen receptor status // Cancer Res. 2010. Vol. 70, № 11. P. 4759–4766.
  77. Dick J.M. Water as a reactant in the differential expression of proteins in cancer // Comput. Syst. Oncol. 2021. Vol. 1, № 1. P. 1–13.

78. Santos I.P. et al. Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: Translation to the clinics // *Analyst*. 2017. Vol. 142, № 17. P. 3025–3047.
79. Vafapour Z., Keshavarz A., Ghahraloud H. The potential of terahertz sensing for cancer diagnosis // *Heliyon*. Elsevier, 2020. Vol. 6, № 12.
80. Kiricuta Jr I.-C., Simplăceanu V. Tissue water content and nuclear magnetic resonance in normal and tumor tissues // *Cancer Res. The American Association for Cancer Research*, 1975. Vol. 35, № 5. P. 1164–1167.
81. Heijblom M. et al. Imaging tumor vascularization for detection and diagnosis of breast cancer // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2011. Vol. 10, № 6. P. 607–623.
82. Mowatt G. et al. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis // *Int. J. Technol. Assess. Health Care*. 2011.
83. Bochenek K. et al. Methods for bladder cancer diagnosis – The role of autofluorescence and photodynamic diagnosis // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2019. Vol. 27, № May. P. 141–148.
84. Cho J.H. Advanced imaging technology other than narrow band imaging // *Clin. Endosc.* 2015. Vol. 48, № 6. P. 503–510.
85. Lotan Y. et al. Blue light flexible cystoscopy with hexaminolevulinate in non-muscle-invasive bladder cancer: review of the clinical evidence and consensus statement on optimal use in the USA — update 2018 // *Nat. Rev. Urol.*
86. Herr H.W., Donat S.M. A comparison of white-light cystoscopy and narrow-band imaging cystoscopy to detect bladder tumour recurrences // *BJU Int.* 2008. Vol. 102, № 9. P. 1111–1114.
87. Zheng C. et al. Narrow band imaging diagnosis of bladder cancer: Systematic review and meta-analysis // *BJU Int.* 2012. Vol. 110, № 11 B.
88. Lee J.Y. et al. A network meta-analysis of therapeutic outcomes after new image technology-assisted transurethral resection for non-muscle invasive bladder cancer: 5-aminolaevulinic acid fluorescence vs hexylaminolevulinate fluorescence vs narrow band imaging // *BMC Cancer*. 2015. Vol. 15, № 1. P. 566.
89. Geldof F. et al. Diffuse reflection spectroscopy at the fingertip: design and performance of a compact side-firing probe for tissue discrimination during colorectal cancer surgery // *Biomed. Opt. Express*. Optica Publishing Group, 2023. Vol. 14, № 1. P. 128–147.
90. Pleskow D.K. et al. In vivo detection of bile duct pre-cancer with endoscopic light scattering spectroscopy // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14, № 1. P. 109.

91. Lanhout G.C. et al. Nerve detection using optical spectroscopy, an evaluation in four different models: In human and swine, in-vivo, and post mortem // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 50, № 3. P. 253–261.
92. Douplik A. et al. Diffuse reflectance spectroscopy in Barrett’s Esophagus: developing a large field-of-view screening method discriminating dysplasia from metaplasia // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 7, № 5. P. 304–311.
93. Mourant J.R. et al. Spectroscopic diagnosis of bladder cancer with elastic light scattering // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 1995. Vol. 17, № 4. P. 350–357.
94. Péry E. et al. Spectral Features Selection and Classification for Bimodal Optical Spectroscopy Applied to Bladder Cancer In Vivo Diagnosis // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2014. Vol. 61, № 1. P. 207–216.
95. FRANK K. et al. AUTOFLUORESCENCE GUIDED BIOPSY FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF BLADDER CARCINOMA // *J. Urol.* WoltersKluwer, 1998. Vol. 159, № 6. P. 1871–1875.
96. Desroches J. et al. A new method using Raman spectroscopy for in vivo targeted brain cancer tissue biopsy // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 1792.
97. Baria E. et al. Label-free grading and staging of urothelial carcinoma through multimodal fibre-probe spectroscopy // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 12, № 11. P. e201900087.
98. Morselli S. et al. The feasibility of multimodal fiber optic spectroscopy analysis in bladder cancer detection, grading, and staging // *Urol. J.* SAGE Publications Ltd STM, 2021. Vol. 88, № 4. P. 306–314.
99. Alfonso-Garcia A. et al. Mesoscopic fluorescence lifetime imaging: Fundamental principles, clinical applications and future directions // *J. Biophotonics.* 2021. № November 2020. P. 1–27.
100. Tseregorodtseva P.S. et al. Single-Fiber Diffuse Reflectance Spectroscopy and Spatial Frequency Domain Imaging in Surgery Guidance: A Study on Optical Phantoms // *Materials.* 2021. Vol. 14, № 24. P. 7502.
101. Martov A. et al. Treatment of Urolithiasis with Thulium Fiber Laser in Fragmentation Mode Using Optimized Pulse Sequences // *J. Endourol.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2024. Vol. 38, № 10. P. 1097–1103.
102. Studier-Fischer A. et al. Spectral organ fingerprints for machine learning-based intraoperative tissue classification with hyperspectral imaging in a porcine model // *Sci. Rep.* 2022. Vol. 12, № 1. P. 11028.
103. De Coninck V. et al. Complications of ureteroscopy: a complete overview // *World J. Urol.* 2020. Vol. 38, № 9. P. 2147–2166.

104. Gadzhiev N. et al. Reducing kidney motion: optimizing anesthesia and combining respiratory support for retrograde intrarenal surgery: a pilot study // *BMC Urol.* 2019. Vol. 19, № 1. P. 61.
105. Lange B. et al. Fluorescence-guided laser lithotripsy: Estimation of the potential effectiveness and safety increase based on first clinical data // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2023. Vol. 16, № 8. P. e202300044.
106. Krumm L.S. et al. Fiber-based Fluorescence and Reflection Measurements during Laser Lithotripsy // *European Conferences on Biomedical Optics 2021 (ECBO).* Munich: Optica Publishing Group, 2021. P. ETh2A.6.
107. Channa N.A. et al. Analysis of kidney stones by FTIR spectroscopy // *Jlumhs.* 2007. Vol. 2. P. 66–73.
108. Asyana V. et al. Analysis of urinary stone based on a spectrum absorption FTIR-ATR // *Journal of Physics: Conference Series.* IOP Publishing, 2016. Vol. 694, № 1. P. 12051.
109. Chatterjee P., Chakraborty A., Mukherjee A.K. Phase composition and morphological characterization of human kidney stones using IR spectroscopy, scanning electron microscopy and X-ray Rietveld analysis // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2018. Vol. 200. P. 33–42.
110. Mandel I., Mandel N. Structure and Compositional Analysis of Kidney Stones BT - *Urinary Stone Disease: The Practical Guide to Medical and Surgical Management* / ed. Stoller M.L., Meng M. V. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. P. 69–81.
111. Kanchana G., Sundaramoorthi P., Jeyanthi G.P. Bio-chemical analysis and FTIR-spectral studies of artificially removed renal stone mineral constituents // *J. Miner. Mater. Charact. Eng. Scientific Research Publishing,* 2009. Vol. 8, № 2. P. 161–170.
112. Lange B., Cordes J., Brinkmann R. Stone/tissue differentiation for holmium laser lithotripsy using autofluorescence // *Lasers Surg. Med.* John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 47, № 9. P. 737–744.
113. Budylin G.S. et al. In vivo sensing of cutaneous edema: A comparative study of diffuse reflectance, Raman spectroscopy and multispectral imaging // *J. Biophotonics.* John Wiley & Sons, Ltd, 2022. Vol. 15, № 1. P. e202100268.
114. Prahl S.A. Tabulated molar extinction coefficient for hemoglobin in water // <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html>. 1999.
115. Stratonnikov A.A., Loschenov V.B. Evaluation of blood oxygen saturation in vivo from diffuse reflectance spectra // *J. Biomed. Opt.* 2001. Vol. 6, № 4. P. 457–467.
116. Heijblom M. et al. Imaging Tumor Vascularization for Detection and

Diagnosis of Breast Cancer // Technol. Cancer Res. Treat. SAGE Publications Inc, 2011. Vol. 10, № 6. P. 607–623.

117. Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch // Nat. Rev. Cancer. 2003. Vol. 3, № 6. P. 401–410.
118. Fischer E.G. Nuclear Morphology and the Biology of Cancer Cells // Acta Cytol. 2020. Vol. 64, № 6. P. 511–519.
119. Mourant J.R. et al. Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells // Cancer Cytopathol. John Wiley & Sons, Ltd, 1998. Vol. 84, № 6. P. 366–374.
120. Jacobson M.C., White R.W. deVere, Demos S.G. *In vivo* testing of a prototype system providing simultaneous white light and near infrared autofluorescence image acquisition for detection of bladder cancer // J. Biomed. Opt. 2012. Vol. 17, № 3. P. 1–7.
121. Zheng C. et al. Narrow band imaging diagnosis of bladder cancer: systematic review and meta-analysis // BJU Int. John Wiley & Sons, Ltd, 2012. Vol. 110, № 11b. P. E680–E687.
122. D’Hallewin M.-A., Bezdetnaya L., Guillemin F. Fluorescence Detection of Bladder Cancer: A Review // Eur. Urol. 2002. Vol. 42, № 5. P. 417–425.
123. Ritter K. et al. Hypoparathyroidism after total thyroidectomy: incidence and resolution // J. Surg. Res. Elsevier, 2015. Vol. 197, № 2. P. 348–353.
124. Sitges-Serra A. Etiology and Diagnosis of Permanent Hypoparathyroidism after Total Thyroidectomy // Journal of Clinical Medicine. 2021. Vol. 10, № 3. P. 543.
125. Büttner M., Musholt T.J., Singer S. Quality of life in patients with hypoparathyroidism receiving standard treatment: a systematic review // Endocrine. Springer, 2017. Vol. 58, № 1. P. 14–20.
126. Madill E.M., Cooray S.D., Bach L.A. Palpation thyroiditis following subtotal parathyroidectomy for hyperparathyroidism // Endocrinol. Diabetes Metab. Case Reports. Bristol, UK: Bioscientifica Ltd, 2016. Vol. 2016. P. 16–49.