

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет  
им. М.К. Аммосова»  
Физико-технический институт  
Кафедра общая и экспериментальная физика

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА КОНКРЕМЕНТОВ У БОЛЬНЫХ ЖЕЛЧНОКАМЕННОЙ  
БОЛЕЗНЬЮ**

(МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)

по направлению: 03.04.02 Физика

профиля: «Медицинская физика»

Выполнил: студент 2 курса  
группы М-Ф-19-1 ФТИ СВФУ  
Протопопов Федор Федорович

Руководитель: к.б.н., доцент кафедры ОиЭФ  
Алексеев Александр Алексеевич



Якутск 2021 г.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	5
1.1 Общая классификация желчнокаменной болезни.....	5
1.2 Причины образования желчного камня .....	6
1.3 ИК-спектроскопия. Теоретические основы метода .....	9
1.4 ИК-спектроскопия желчных камней .....	11
1.4.1    Некоторые моменты из истории исследования .....	11
1.4.2    Спектральные линии поглощения веществ .....	17
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	20
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	22
3.1 Внешняя и внутренняя морфология желчных камней.....	22
3.2 ИК-спектроскопия соскобов с поверхности желчного камня.....	23
3.2.1    Метод главных компонент в ИК-Фурье Спектроскопии.....	27
3.3 Внутренний состав желчных камней на ИК-фурье микроскопе .....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	40
ВЫВОДЫ.....	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	42
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	44
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 .....	46
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 .....	47

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Актуальность исследования. Образование желчных камней в желчном пузыре, желчной протоке и печени - распространенное заболевание пищеварительной системы, встречающееся у 10–20% населения в западных странах, и примерно 25% этих пациентов в конечном итоге нуждаются в хирургическом удалении из-за тяжелых симптомов [6, 15, 25, 26]. Традиционно камни в желчном пузыре подразделяются на 4 категории: холестериновые камни, камни с черным пигментом (билирубинат кальция), камни коричневого цвета и смешанные камни, состоящие из холестерина и билирубината кальция [6, 15]. Однако эта классификации во многом зависит от внешней формы и цвета камней в желчном пузыре и не точно отражает случаи, когда внутренняя морфология камней в желчном пузыре отличается от внешней.

ИК-Фурье спектроскопия была предпочтительным инструментом для классификации большого количества образцов желчных камней. Однако некоторые исследования продемонстрировали, что необходимо проявлять осторожность при классификации желчных камней с использованием только ИК-спектроскопии, поскольку полосы поглощения компонентов желчных камней часто перекрываются друг с другом, а поглощение связанной воды затрудняет интерпретацию спектров [6]. Спектрам желчных камней следует уделить должное внимание, и необходимы дальнейшие исследования с использованием различных аналитических методов для понимания компонентов желчных камней и этиологии образования желчных конкрементов. Известно, что для разных стран состав наиболее распространенных желчных конкрементов является разным [6, 13, 18], но в Российской литературе данная тема недостаточно освещена [25] и отсутствуют данные по республике Саха (Якутия).

**Целью работы является:** анализ состава желчных конкрементов больных желчнокаменной болезнью в Якутии с помощью ИК-спектроскопии.

### **Задачи:**

1. Проанализировать имеющуюся мировую научную литературу по данной тематике.
2. Измерить ИК-спектры желчных камней и расширить имеющуюся базу желчных камней.
3. Провести анализ и сравнение содержания желчных камней.

### **Предмет исследования:**

Желчные конкременты (камни) человека, полученные в результате хирургического удаления желчного пузыря (холецистэктомии).

**Научная новизна.** Впервые в мире проведены исследования внутренней структуры желчных камней с помощью ИК-фурье микроскопа, до 2021 года такие данные в мире отсутствуют, что подтверждается обзорными статьями на данную тематику [16].

Расширена имеющаяся база по ИК-спектрам желчных камней пациентов проживающих в республике Саха (Якутия). Проведен сравнительный анализ с результатами исследований состава желчных камней других авторов из разных стран.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** В данной работе был исследован состав желчных камней, извлеченные в результате хирургического удаления желчного пузыря (холецистэктомии). Была проработана методическая и теоретическая часть исследования и изучены мировой опыт в классификации желчных камней, которые кратко представлены в данной работе.

Теоретические выводы и практические результаты данной работы могут быть использованы в реабилитационном периоде, для выявления этиологии желчнокаменной болезни пациента.

Нижеописанная методика может быть внедрена в врачебную практику в местных больницах, для точного анализа состава конкремента пациента, которое позволит выбрать наиболее оптимальную методику лечения от желчнокаменной болезни и избежать рецидивов.

**Апробация работы и публикации.** По материалам диссертации опубликована 1 статья на материалах конференции – IX Международной конференции по математическому моделированию, которая индексируется в РИНЦ. В дальнейшем по полученным данным, планируется публикация в рейтинговый научный журнал. Структура и объем работы.

Магистерская работа состоит из введения, содержания, трех глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Список литературы включает 26 источников. Работа изложена на 49 страницах машинного текста, содержит 23 рисунка, 5 таблиц и 3 приложения.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 ОБЩАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ЖЕЛЧНОКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

В настоящее время классификация желчнокаменной болезни (ЖКБ) основывается на выделении основных стадий протекания болезни, которые хорошо ложатся на клинических наблюдениях пациента. Но так было не всегда, до этого были различные виды классификации, основные моменты, из которых представлены ниже.

В 1974 году выделили пять стадий в течении ЖКБ D. Small это:

- 1 стадия — генетические, биохимические и метаболические дефекты, приводящие к перенасыщению холестерином желчи.
- 2 стадия — химическая. При биохимическом исследовании желчи определяются признаки литогенной желчи.
- 3 стадия — физическая. Образуются кристаллы холестерина.
- 4 стадия — рост кристаллов и формирование холестериновых камней.
- 5 стадия — появление клинических симптомов холелитиаза [26].

Данная классификация имела ряд сложностей с определением первичных стадий заболевания и не обрела популярность [26]

В 1982 году Мансуров Х.Х. предложил новую классификацию, которая была более удобной клинически и разделялась на 3 стадии:

1. Физико-химическая стадия (секреция литогенной желчи, формирование микролитов).
2. Биохимические изменения, характерные для 1 стадии, формирование камней.
3. Клинические проявления и осложнения [26].

Данная классификация тоже имела сложности в определении первичной стадии, это проведение дуоденального зондирования и биохимического анализа жечи [26].

Позднее в 2000 году Дадвани С.А. и соавторами было предложено выделять следующие клинические формы ЖКБ[26]:

1. Латентная форма (каменосительство).
2. Первично-хронический холецистит.
3. Печеночная (желчная) колика.
4. Хронический рецидивирующий калькулезный холецистит.
5. Хронический резидуальный холецистит.
6. Прочие формы (стенокардитическая, синдром Сейнта)[26].

Критикой данной классификации являлось то, что данная классификация была направлена на наличие желчного камня, а не на камнеобразование (литогенез). Отсутствовала начальная стадия заболевания, когда ещё нет конкрементов в желчном пузыре и протоках.

Во многом дальнейшее развитие классификации стадии болезни способствовало развитие технологий связанных с широким внедрением аппаратов ультразвуковой диагностики, которая дала возможность выявлять на ранних стадиях видимые изменения в структуру желчи на эхограммах и диагностировать ЖКБ на ранних стадиях до образования желчных камней [26].

В настоящее время хорошо зарекомендовала себя классификация ЖКБ предложенная Центральным научно-исследовательским институтом гастроэнтерологии (ЦНИИГ) принятая 3-ем съезде научного сообщества гастроэнтерологов России [26].

Классификация ЖКБ (ЦНИИГ) она разделена на 4-ре стадии:

- 1 стадия — это начальная или предкаменная с образованием густой желчи или билиарного сладжа (БС);
- 2 стадия — это непосредственно образование конкрементов, отличаются: по локализации, по количеству, по составу (холестериновые, пигментные и смешанные) и по клиническому течению.
- 3 стадия — это хронически рецидивирующий калькулезный холецистит [26].
- 4 стадия — это уже широкий спектр осложнений, следует отметить, что осложнения возможны и уже на ранних стадиях ЖКБ.

В результате принятия данной классификации ЖКБ были подробно исследованы эхограммы и кристаллограммы желчи *in situ* и *in vitro*, соответственно [26]. Сейчас стало возможным определить с помощью УЗИ первичную стадию ЖКБ и провести превентивное лекарственное лечение БС желчи, тем самым с большой эффективностью избежать литогенеза и последующих осложнений [25].

## 1.2 ПРИЧИНЫ ОБРАЗОВАНИЯ ЖЕЛЧНОГО КАМНЯ

Патогенез ЖКБ представляет собой длительный и многостадийный процесс, непосредственно к этому ведет изменение метаболизма и физико-химических свойств желчи. Данное состояние желчи, предшествующее появлению конкрементов в желчном пузыре или в протоках, называют билиарный сладж (БС). БС чаще всего характеризуется повышением холестерина, а также появлением взвеси нерастворённых кристаллов, которые в итоге видны в эхограммах УЗИ. К тому же появление БС не всегда означает появление желчных камней в будущем, предполагая обратимость данных физико-химических изменений состава желчи [25]. Часто причиной образования желчных камней называют ещё ряд факторов, как перенесенная

инфекция или же воспаления желче-выводящих протоков в 12-персную кишку. Подробно об этом рассказано в работе Бакулиной и др. 2021 [25], часть из которых представлены ниже.

Образование билиарного сладжа (БС) сложный процесс, образование которого связано с совокупностью множества факторов, из которых главным считается генетическая предрасположенность и комбинация триггерных внешних факторов. Бакулина и др. [25] предлагают следующую таблицу факторов риска (см. Таблица 1).

Таблица 1. Факторы риска образования билиарного сладжа (с небольшими изменениями согласно Бакулиной и др. [25])

### Немодифицируемые

<p><b>Генетические факторы.</b> На сегодняшний день выявлено не менее 25 литогенных генов. Наиболее известные: мутации в гене CYP7A1, приводящие к снижению активности фермента холестерин 7-<math>\alpha</math>-гидроксилазы (CYP7A1) из семейства цитохрома P450, который играет важную роль в метаболизме холестерина; определенный генотип аполипопротеина E (содержащего аллель apoE4), который приводит к повышенному риску развития ЖКБ; дефекты в гене ABCB4 у взрослых и детей, приводящие к развитию ЖКБ через формирование интрагепатического сладжа, при этом дефектные варианты ABCB4 связаны не только с внутриспеченочным холестазом, но также с циррозом и раком печени; мутация p.D19H гена ABCG8; Мутации в семействе генов UDP глюкуронозилтрансферазы</p>
<p><b>Демографические факторы:</b> женский пол (эстрогены индуцируют синтез и секрецию холестерина в печени, а прогестерон вызывает гипомобильность желчного пузыря) Возраст старше 60 лет, регион проживания</p>
<p><b>Аномалии желчного пузыря и билиарных протоков,</b> гипербилирубинемии (например, синдром Жильбера)</p>
<p><b>Гематологические факторы:</b> анемии, которые сопровождаются снижением осмотических свойств эритроцитов</p>

### Модифицируемые

<p>Нутриционные: недостаточность питания и диета с пониженным содержанием калорий, парентеральное питание</p>
<p>Медицинские факторы, приводящие к уменьшению синтеза холецистокинина и снижению моторики желчного пузыря: резекция желудка, папиллосфинктеротомия, пострезекционные осложнения при операциях на верхних отделах пищеварительного тракта (например, гастродуоденостаз, анемии вследствие снижения секреции фактора Кастла при резекциях желудка и др.), бариатрические операции, гемиколэктомия</p>
<p>Гематологические факторы: гемолиз</p>
<p>Патология желчного пузыря: холестероз желчного пузыря и хронический некалькулезный холецистит, приводящие к снижению его сократительной способности</p>

Патология печени с нарушением синтетической функции: снижение синтеза холестерина и желчных кислот
Беременность (развитие гиперэстрогемии и гиперхолестеринемии во время беременности)
Прием лекарственных препаратов: комбинированные оральные контрацептивы, антибиотики (цефалоспорины), препараты кальция, фибраты и др.
Заболевания кишечника (болезнь Крона, терминальный илеит и др.), приводящие к нарушению энтерогепатической циркуляции и всасыванию желчных кислот

Видно, что в действительности для образования БС достаточно много факторов, однако часть из них поддаётся к коррекции. В частности это: качество питания, физическая активность, регулирование психоэмоциональной нагрузки и т.д., одним словом, следование «общережимным моментам». Данные корректировки рекомендуются для профилактики появления БС, а также на начальных стадиях образования БС.

Тем самым в группу риска подпадают все работники с низким физическим уровнем активности, что значительно увеличивает риск желчнокаменной болезни (ЖКБ). Но в тоже время эффективность диетотерапии неясна, рандомизированные контролируемые исследования отсутствуют [25].

Между тем практикуется медикаментозное лечение БС, одним из довольно исследованных медикаментозных средств является препараты *урсодезоксихолевой кислоты* (УДХК). Данный препарат имеет давнюю историю, начиная с середины 1930 годов, где была описана структура и затем уже в 1954 году метод синтеза Т. Kanasawa. В настоящее время препараты на основе УДХК считаются терапией первой линии для лечения холеостаза. Лечение данным препаратом снижает риск смерти и необходимость пересадки печени [12]. Положительное действие УДХК доказано клинически множеством исследований, вызывает снижение выделения холестерина из печени в желчный пузырь, которое в свою очередь стимулирует выделение желчи из самих камней в желчь. Вызывает ингибирование активность ГМГ-КоА-редуктазу [22], которое тормозит синтез холестерина в печени, доказано 40-60% снижение синтеза холестерина печенью при принятии per os (мед. лат. перорально, внутрь, через рот) УДХК [7].



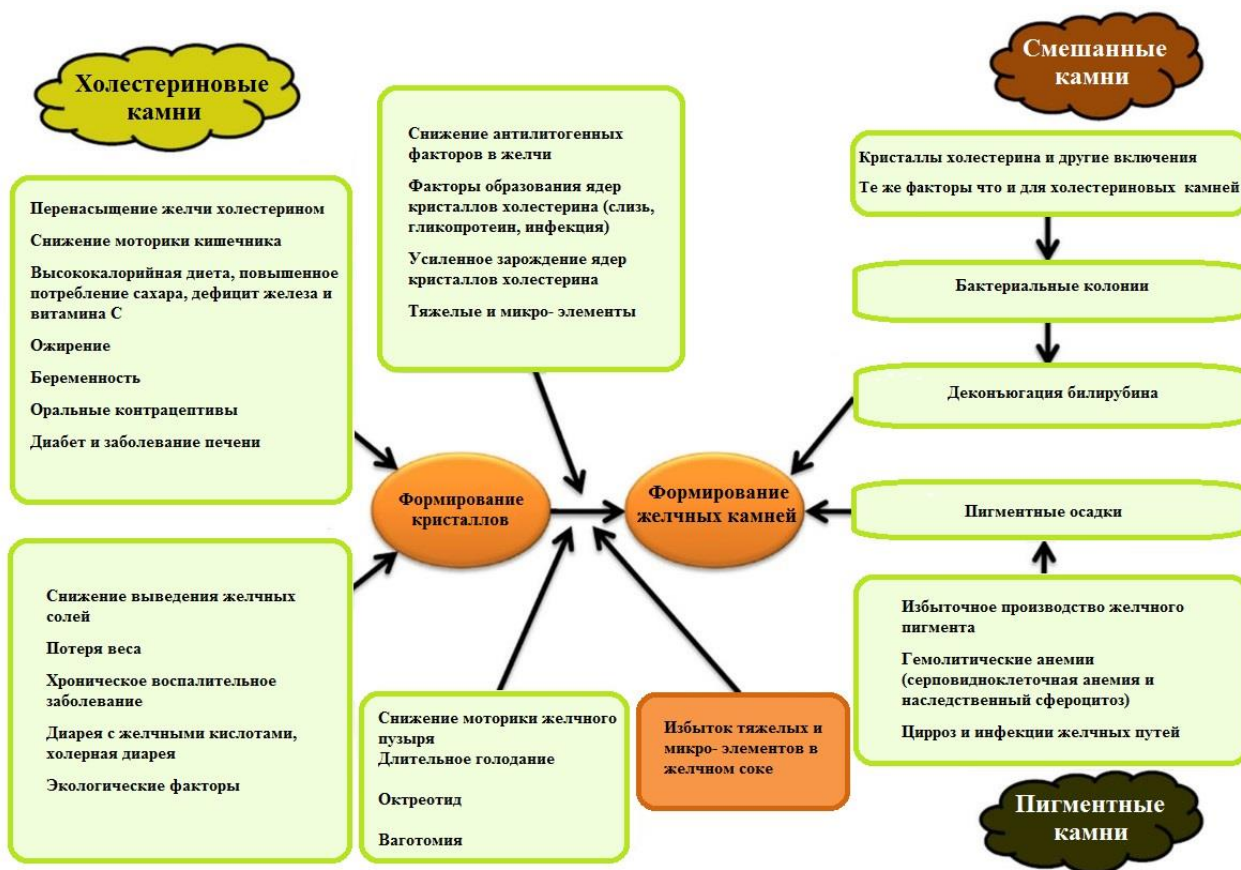


Рис. 1. Патогенез холестериновых, смешанных и пигментных камней в желчном пузыре и факторы, влияющие на их образование и рост (согласно Vivek и др., 2020).

В литературе приводятся общие схемы патогенеза желчных камней, одна из которых представлена на Рис. 1.

### 1.3 ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДА

Аналитические инфракрасные спектрометры в основном измеряют в режимах на отражение и поглощение электромагнитного излучения в диапазоне длины волны от 1 до 1000 мкм. Этот диапазон разделен на три участка это: ближний ИК (NIR или БИК) в диапазоне от 0,76-2,5 мкм, средний ИК (MIR) в диапазоне 2,5-25 мкм и дальний ИК (FIR) за пределами 25 мкм (см. Рис. 2).

БИК-спектроскопия ( $12500 - 4000 \text{ см}^{-1}$ ) чаще всего используется для промышленного производственного процесса. Данный диапазон оказывается полезен для проверки качества материала/сырья. MIR-спектроскопия — это широко применяемый и надежный метод, с помощью которого можно определить большое количество классов веществ и количество вещества. Область от  $4000$  до  $400 \text{ см}^{-1}$  часто применяется для биологических исследований, в

частности в данном диапазоне находится так называемая область «отпечатков пальцев», где проявляются часто липиды, белки, амиды I/II, углеводы

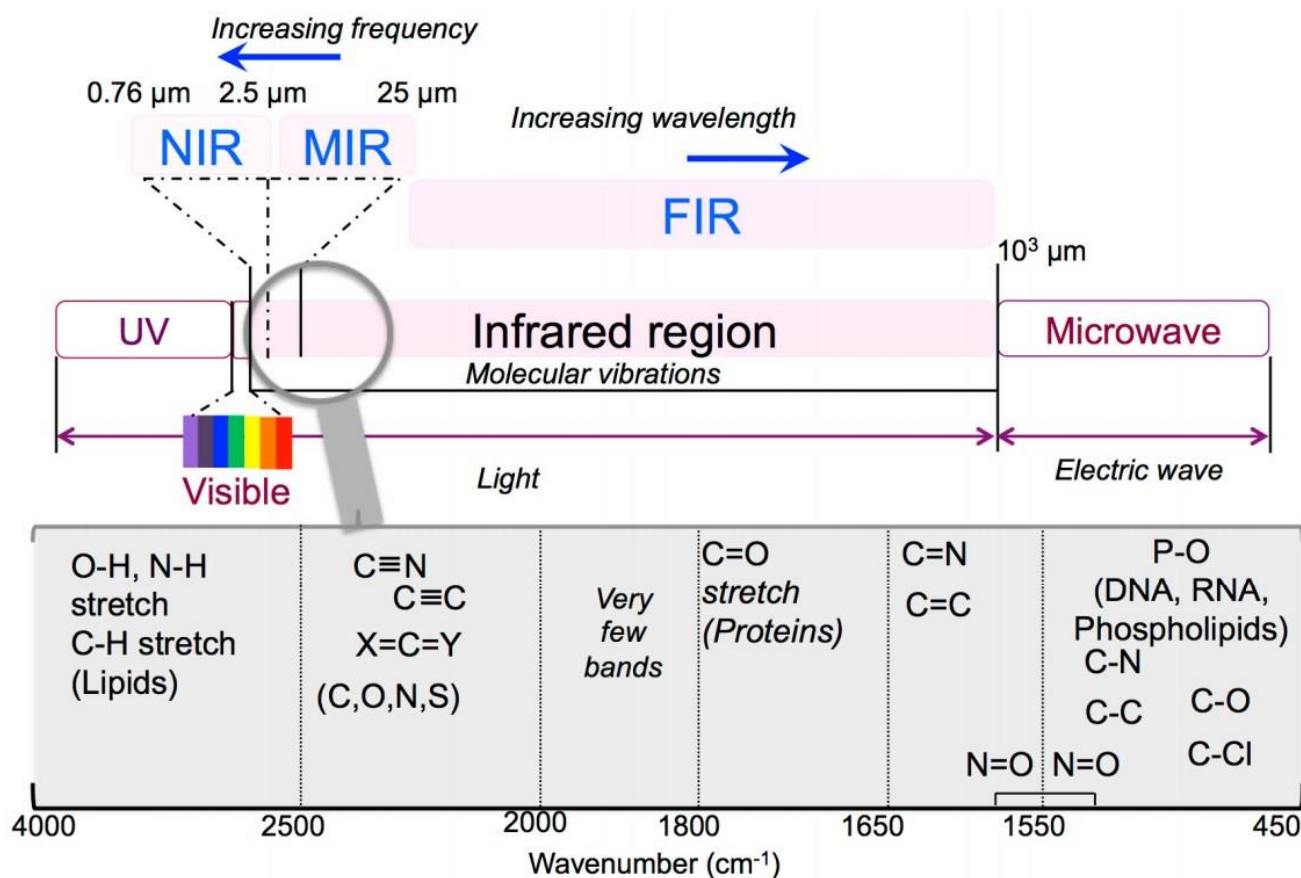


Рис. 2. ИК область в электромагнитном излучении, а также представлены наиболее характерные колебательные процессы протекающие в MIR-диапазоне (согласно Balan V. и др., 2019 [1]).

и нуклеиновые кислоты (см. Рис. 2). FIR-спектроскопия (400-20 см<sup>-1</sup>) дает информацию о «высокоупорядоченных структурах», таких как образование фибрилл и динамики белков, так как данный диапазон более чувствителен к колебаниям пептидных и водородных связей по сравнению с MIR-областью [1].

Одним из достоинств ИК-спектроскопии является её способность получать спектры от различных твердых тел, жидкостей и газов. Часто применяется режим на пропускание, в котором твердые частицы измельчают до порошкообразное состояние и перемешивают по мере нужды с ИК-прозрачным веществом, например, KBr или же NaCl. К тому же возможно измерение тонкой пленки жидкости между ИК прозрачными окнами. Но есть свои ограничения и недостатки, так, например, для изготовления бромидной таблетки, исследуемый образец и бромид калия должны быть сухими, иначе полосы поглощения воды ухудшат качество полученных спектров, в некоторых случаях это мешает определить слабые сигналы (либо перекрываются, либо исчезают вовсе). К тому же появление дополнительных водородных связей может исказить форму ИК-

спектра исследуемого образца. Существует ещё трудности воспроизводимости результатов, в виду разного качества изготовления бромидных таблеток, соотношения исследуемого вещества и бромида калия. Всех этих недостатков лишен метод нарушенного полного внутреннего отражения, часто этот метод применяется для анализа состава порошков и относительно твердых веществ. Ограничением часто выступает материал кристалла НПВО, где широкое распространение имеет германиевые кристаллы и алмазные, последние из которых являются наиболее твердыми из известных веществ. Алмазные кристаллы НПВО применяются для ИК-микроскопов, где принцип работы НПВО основывается на одном единственном полном отражении сигнала, само собой данные измерения нуждаются в высокочувствительных детекторах на подобие МСТ (Ртуть-кадмий теллуридный детектор). Но есть возможные сложности в измерении твердых веществ это шероховатая-неровная поверхность, где часть кристалла НПВО будет находится в воздухе, а повышение давления приведет к высокой вероятности к повреждению кристалла НПВО. Но данный метод сейчас является самым быстрым и не требует особой пробоподготовки, кроме ограниченного размера пробы.

## **1.4 ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ**

### **1.4.1 Некоторые моменты из истории исследования**

ИК-Фурье спектроскопия – отличный инструмент для анализа органических и неорганических компонентов, посредством анализа ИК-спектров поглощения образцов. Данный метод может давать качественную информацию о составе исследуемого материала. К тому же, в некоторых своих приложениях ИК-спектроскопия может быть применена для количественного анализа. ИК-спектроскопия желчных камней давно доказала свою эффективность в анализе камней в желчном пузыре, обладая достаточной специфичностью, быстротой анализа и универсальностью. К тому же данный метод может быть использован для широкого спектра исследуемых материалов как: сыпучие материалы, тонкие пленки жидкостей, твердых тел, паст, порошков и тонких волокон. Есть даже исследования где ИК-Фурье спектроскопия применяется для клеточных измерений на молекулярном уровне.

Часто в ИК-Фурье спектроскопии в анализе состава желчных камней применяется диапазон  $4000-400\text{ см}^{-1}$ , этот диапазон называют средним диапазон ИК области спектра или же на английском MIR. В данной области ИК-спектра отчетливо видны основные функциональные группы органических веществ, такие как: гидридные группы X-H,  $\text{CH}_3$  в  $sp^2$  и  $sp^3$  гибридизации, колебания ОН-группы, различные виды колебаний азот содержащих групп  $\text{NH}_2$ , двойных и тройных углеродных связей, сполохов бензольных колец и т.д. В среднем диапазоне ИК-области лежит так называемая область «отпечатков пальца», которая часто применяется для

идентификации химических веществ. Между тем ИК-Фурье спектроскопия имеет свои преимущества и недостатки (см. Таблица 2).

Таблица 2. Преимуществ и ограничения ИК-Фурье спектроскопии в целом (согласно с изменениями Vivek и др. 2020)[16]

<b>Преимущества</b>	<b>Ограничения</b>
<p>Возможности микро-FTIR-визуализации, образцов с размером от 10 мкм и более (изменением апертуры).</p> <p>Точное измерение волнового числа / хорошее отношение сигнал/шум.</p> <p>Наличие различных способов измерения, где преимущественно метод на пропускание имеет меньшее кол-во артефактов.</p>	<p>Артефакты</p> <p>Влажность препарата, содержание воды ухудшает качество спектров.</p> <p>В редких случаях сложность пробоподготовки и измерения некоторыми методами.</p>

FTIR успешно применяется в исследованиях химических компонентов желчных камней, ранее было показано, что они содержат: холестерин, билирубинат кальция и карбонат//фосфаты кальция [8, 9, 21]. Применение FTIR быстро расширилось в гастроэнтерологии, было неоднократно показано, что оно дает быстрые и точные результаты. К тому было показано, что билирубин присутствует в камнях в виде соли кальция, а не в виде протонированной кислоты [20]. Вне зависимости от цвета желчного камня, FTIR-спектроскопия надежно дифференцирует различные виды пигментных камней [8, 9].

Традиционные походы к анализу и классификации желчных камней включают визуальный осмотр, химический и физический анализы. Однако классификация по внешнему виду связана с проблемами субъективного анализа. Химический же анализ является достаточно трудоемким и имеет низкую чувствительность и по некоторым данным приводит к недооценке содержания холестерина и нерастворимых остатков [5, 18, 19].

Гокуларишнан в 2001 году провел определение состава 168 желчных камней из Индии, визуальным методом определения и ИК-спектральным методом определения типа камня и пришел к выводу, что ошибка определения состава не сильно большая (значение Каппа 85%; 95% ДИ 77-93%) [5].

Основой химического состава желчных камней человека является холестерин и билирубин. А также присутствуют другие соединения такие как карбонат кальция, соли фосфата кальция, билирубинат кальция, жирные соли, различные производные холевой кислоты, полисахариды и белки [14]. Известно, что коричневые пигменты желчных камней это нерастворимые соединения билирубина, билирубинатной соли и белков [14].

В работе Чандрен П. и др. 2007 года были проанализированы на состав различными химическими и физическими методами 120 желчных камней из штата Харьян (Индия) из них 52 оказались холестериновыми, 76 смешанными и 72 пигментными [3]. Было указано авторами, что у холестериновых камней было высокое содержание общего холестерина, фосфолипидов, жирных кислот (этерифицированных) и неорганического фосфата и меди по сравнению с пигментными камнями. Тогда как у смешанных камней было более высокое содержание железа и триглицеридов по сравнению с холестериновыми и пигментными камнями. Пигментные были насыщены общим билирубином, желчными кислотами, кальцием, оксалатом, магнием, натрием, калием, хлоридом и растворимыми белками по сравнению с холестериновыми и смешанными камнями. Автор также указывает, что помимо холестерина, который входил во все типы камней, другие виды липидов отличались у разных типов камней, что возможно указывает на различный механизм их образования [3].

Олег Клейнер и др. в 2002 исследовали отличия между желчными камнями у взрослых и детей. В исследовании использовали методы FTIR спектроскопии и флуоресцентной микроскопии на желчных камнях полученных от 67 взрослых пациентов и 21 детей. Показано, что черные камни богаты билирубином, коричневые камни в основном состоят из различного количества билирубина и холестерина и зеленые камни состоят в основном из холестерина. Флуоресцентная микроскопия показала, что билирубинат кальция присутствует во всех типах камней, однако, билирубинат меди присутствовал только в смешанных и черных камнях. Анализ показал, что состав черных и коричневых камней по составу схож у взрослых и детей. Кольца, которые наблюдали с помощью флуоресцентной микроскопии у зеленых камней возможно имеют отношение к механизму образования желчных камней. К тому же пришли к выводу что холестерин и билирубин являются основными факторами риска образования желчных камней [10].

Виирекен и др. в 2015 году исследовали желчные камни 102 пациентов из Шри-Ланки с помощью FTIR спектроскопии и обнаружили, что большая часть камней относилась к пигментным и смешанным камням, тогда как холестериновых камней было всего лишь 9% [23] (см. Таблица 3).

Таблица 3. Содержание желчных камней согласно различным исследованиям, для упрощения желчные камни были разделены на 3 вида: холестериновые, пигментные и смешанные

	Weerakoon H. et al., 2015, Шри-Ланка [23]	Cheng C. L. et al., 2016, Тайвань [4]	Ha B. J., Park S., 2018, Соннам, ЮК [6].	Laloum E. et al., 1998,	Laloum E. et al., 1998, Франция [13]
--	---	---------------------------------------	--	-------------------------	--------------------------------------

				Вьетнам [13]	
N	102	36	26	67	62
Женщины, количество	80	17	-	-	-
Мужчины, количество	22	18	-	-	-
Средний возраст	46.1±11.6	-	-	-	-
Диапазон возраста, лет	-	ж (30-76) м (29-88)	-	-	-
Пигментный	54.53%	30.60%	42,3%	11,9%	22,6%
смешанный	37%	47.20%	23,1%	86,6%	61,3%
холестериновый	9%	19.40%	34,6%	1,5%	16%
острый холецистит	-	1 (ж)	-	-	-

Симона Савали и др. также в 2015 исследовали желчные камни используя широкий спектр высокочувствительных методов такие как: сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), FTIR-спектроскопия, электронный парамагнитно резонансная спектроскопия (ЭПР), дифракция рентгеновских лучей (XRD), а также биохимический анализ. В результате которого авторы идентифицировали макромолекулярные структуры включающие белки в комплексе с билирубин-координируемым полимером. Они пришли к выводу, что билирубин и свободно-радикальные комплексы билирубината играют важную роль в образовании пигментных желчных камней [2].

Недавно, Черн и др. в 2016 году исследовали 35 (+1) пациентов из Тайваня. Показали, что у 30,6% кальций билирубиновые камни, холестериновые камни у 19,4% и смешанные у 47,2%., по мимо желчных камней изучили сладж у пациентки в состоянии острого холецистита. Было показано что ИК спектры, морфологические особенности и элементный состав отличался от такового при хронической болезни ЖКБ [4] (см. Таблица 3).

И совсем недавно Ха и Парк (2018) используя ИК-спектроскопию и фотографирование классифицировали желчные камни на 6 различных типов желчных камней, на основе ИК-Фурье спектроскопии. Получили и сравнили главные на их взгляд спектральные линии в ИК-спектроскопии [6] (см. Таблица 3). Ниже представлены наиболее типичные спектры типов желчных камней согласно исследованию Ха и Парк.

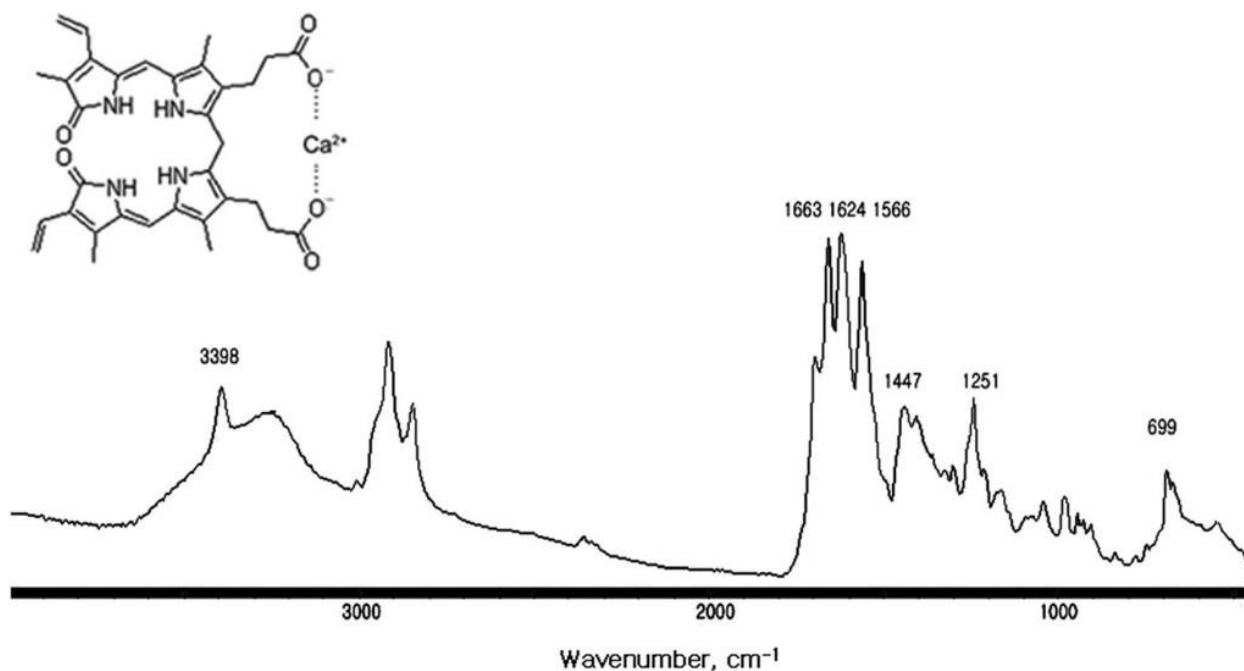


Рис. 3. Кальций билирубинатный желчный камень (пигментный) с формулой билирубината кальция (согласно Ха и Парк, 2018 [6]).

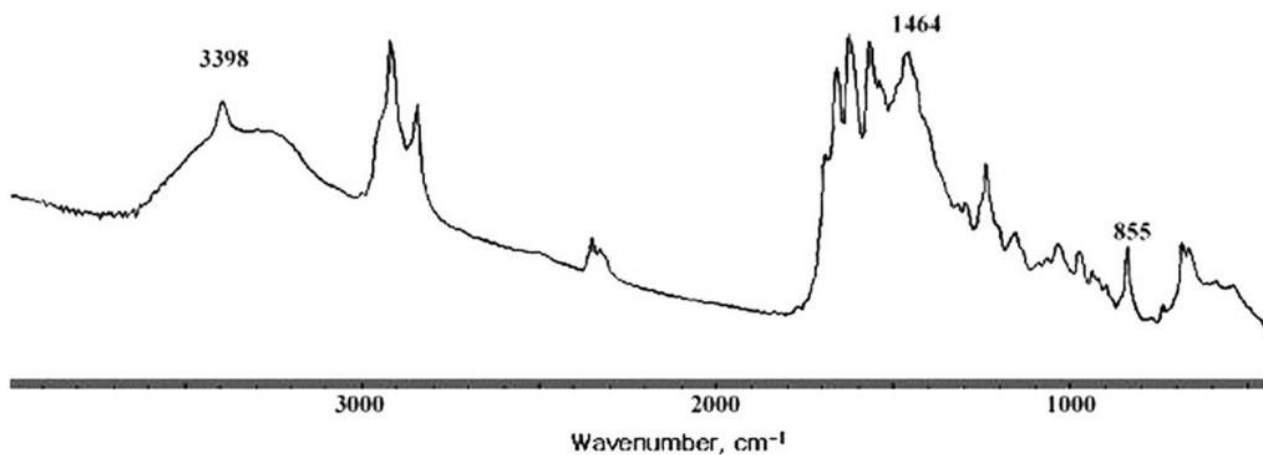


Рис. 4. Кальций билирубинатный камень смешанный с кальцием карбонатом (смешанный) (согласно Ха и Парк, 2018 [6]).

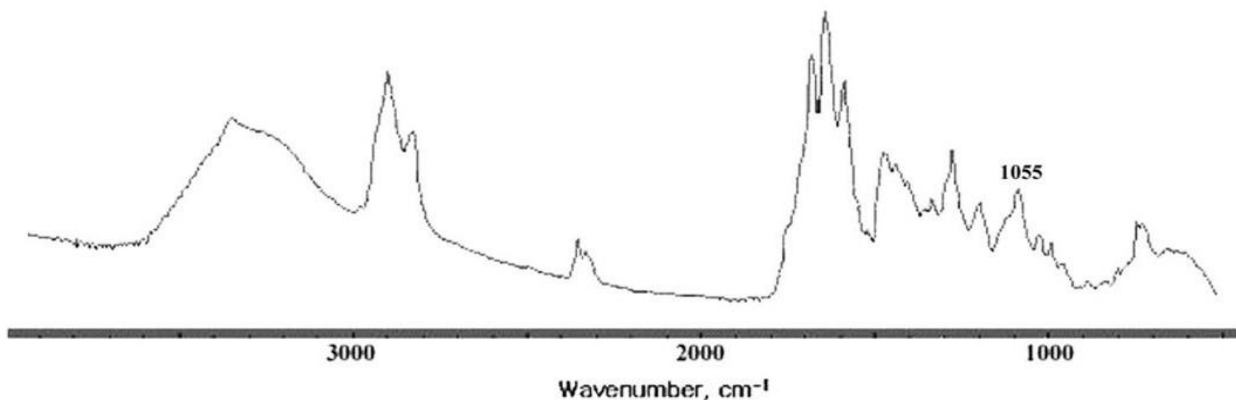


Рис. 5. Кальций билюрибиновый смешанный с холестерином (смешанный) (согласно Ха и Парк, 2018 [6]).

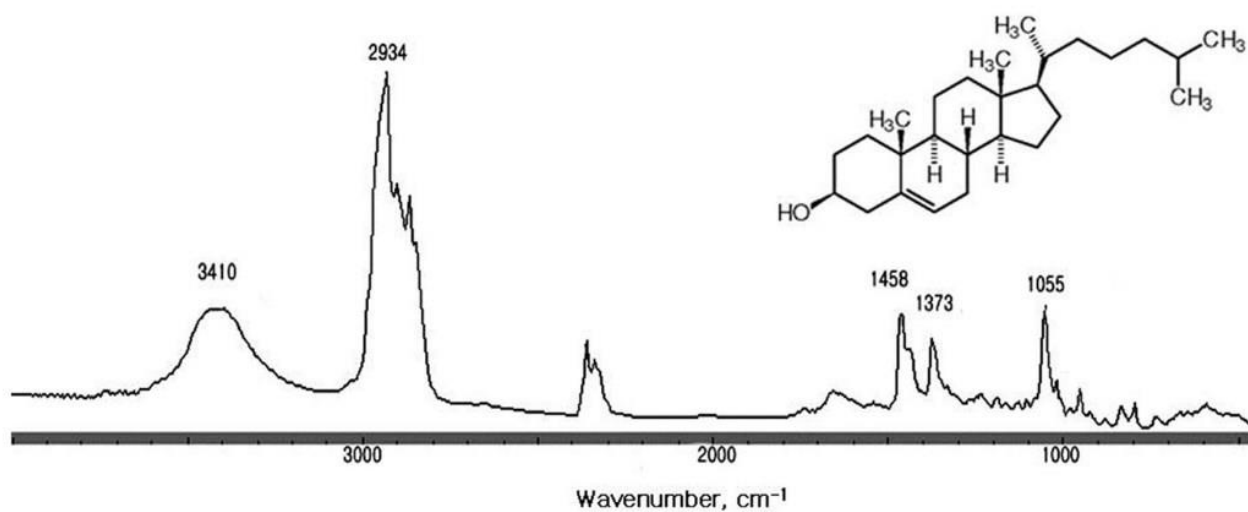


Рис. 6. Холестериновый желчный камень и формула холестерина, в районе 2400  $\text{cm}^{-1}$  видна полоса поглощения  $\text{CO}_2$  атмосферы (согласно Ха и Парк, 2018 [6]).

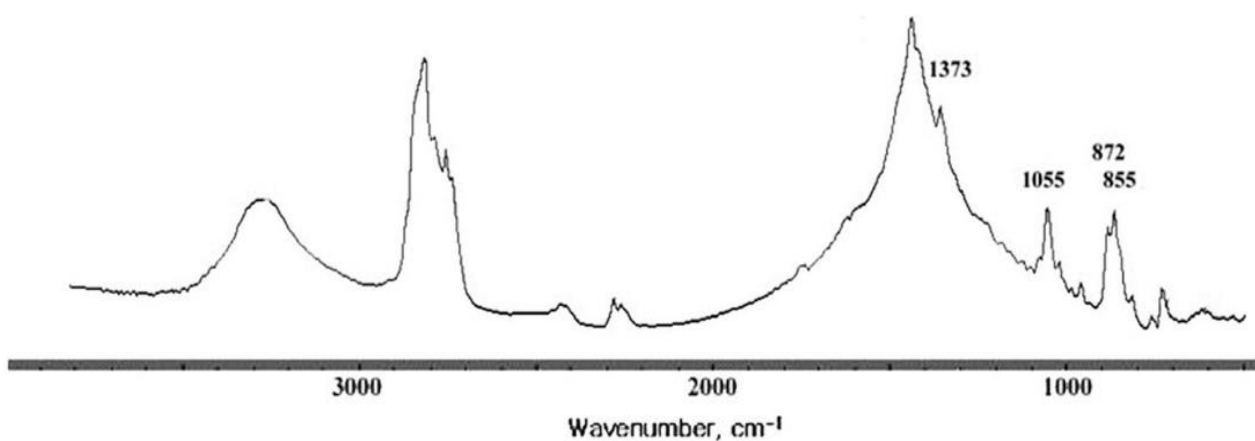


Рис. 7. Холестериновый-кальций карбонатный (смешанный) желчный камень (согласно Ха и Парк, 2018 [6]).



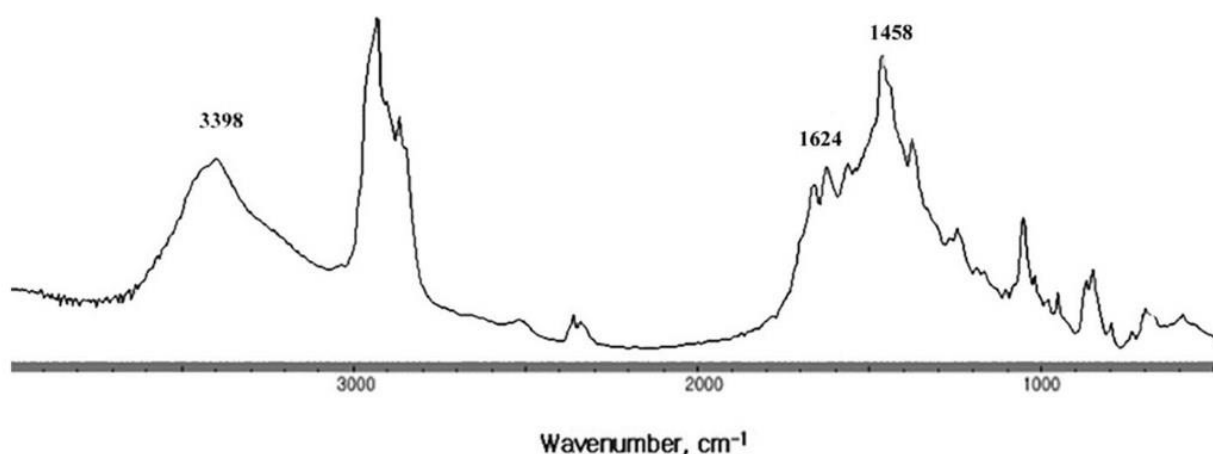


Рис. 8. Холестериновый-кальций карбонатный и кальций билурибинатный (смешанный) желчный камень (согласно Ха и Парк, 2018 [6]).

## 1.4.2 Спектральные линии поглощения веществ

### Чистые холестериновые желчные камни

Как было сказано ранее, холестерин является основным веществом содержащийся в большинстве желчных камней. Химическая структура холестерина и характерный спектр поглощения в ИК-диапазоне представлена на Рис. 6. В Таблица 4 показано сравнение между FTIR пиками поглощения холестериновых камней в исследованиях представленных другими авторами согласно Ха и Парк 2018 г. [6].

Согласно тому же исследованию FTIR спектры холестерина в желчных камней состоят из ассиметричных растяжений связи  $-CH_2$  при  $2934\text{ см}^{-1}$ , симметричного растяжения при  $2860\text{ см}^{-1}$ , ассиметричной полосы поглощения при  $1458\text{ см}^{-1}$ , симметричная полоса поглощения при  $1373\text{ см}^{-1}$  и поглощение при растяжение связи C-C на  $1055\text{ см}^{-1}$ . Широкая полоса поглощения растяжения связи OH с пиком поглощения при  $3410\text{ см}^{-1}$ . Отсутствие других характерных пиков поглощения для других веществ говорит о том, что желчный камень является чистым холестериновым.

К тому же в этой же работе были сделаны фотографии камней, где поверхность чистых холестериновых камней была *желтой* у 3-х камней, поверхность 6 камней была *зеленой* или *коричневой*. Внутреннее строение показало, что два камня были многоядерными внутри, содержали различные включения. Три камня были полностью желтыми внутри и снаружи [6].

Таблица 4. Спектральные линии поглощения в ИК-спектроскопии 3-х основных веществ желчных камней (согласно [6])

	Laloum at al. [13]	Kleiner et al. [10]	Gang et al. [14]	Suo et al. [17]	Ha & Park [6]
Холестерин	1467, <b>1378</b> , <b>1058</b>	<b>3398</b> , <b>2933</b> , <b>2866</b> , <b>1463</b> , <b>1376</b> , <b>1056</b>	<b>3408</b> , <b>2934</b> , <b>2867</b> , <b>1446(?)</b> , <b>1367(?)</b> , <b>1057</b>	<b>3395</b> , <b>2930</b> , <b>2867</b> , <b>1464</b> , <b>1374</b> , <b>1056</b>	<b>3410</b> , <b>2934</b> , <b>2853</b> , <b>1458(?)</b> , <b>1373</b> , <b>1055</b>
Билирубинат кальция (пигм.)	<b>1666</b> , <b>1628</b> , <b>1571</b> , 1251	<b>1661</b> , 1640, <b>1575</b>	3402, 1696, <b>1663</b> , <b>1620</b> , <b>1572</b> , 1448, 1250, 700	1700, <b>1662</b> , <b>1628</b> , <b>1574</b> , 1460, 1253, 1054	3398, <b>1663</b> , <b>1624</b> , <b>1566(?)</b> , 1447, 1251, 699
Карбонат кальция (изв.)	1480, 1419, <b>875</b> , 855	1464, <b>875</b>		широкая полоса 1300- 1500, <b>875</b> , 711	1464, 1458, 1420, <b>872</b> , 855

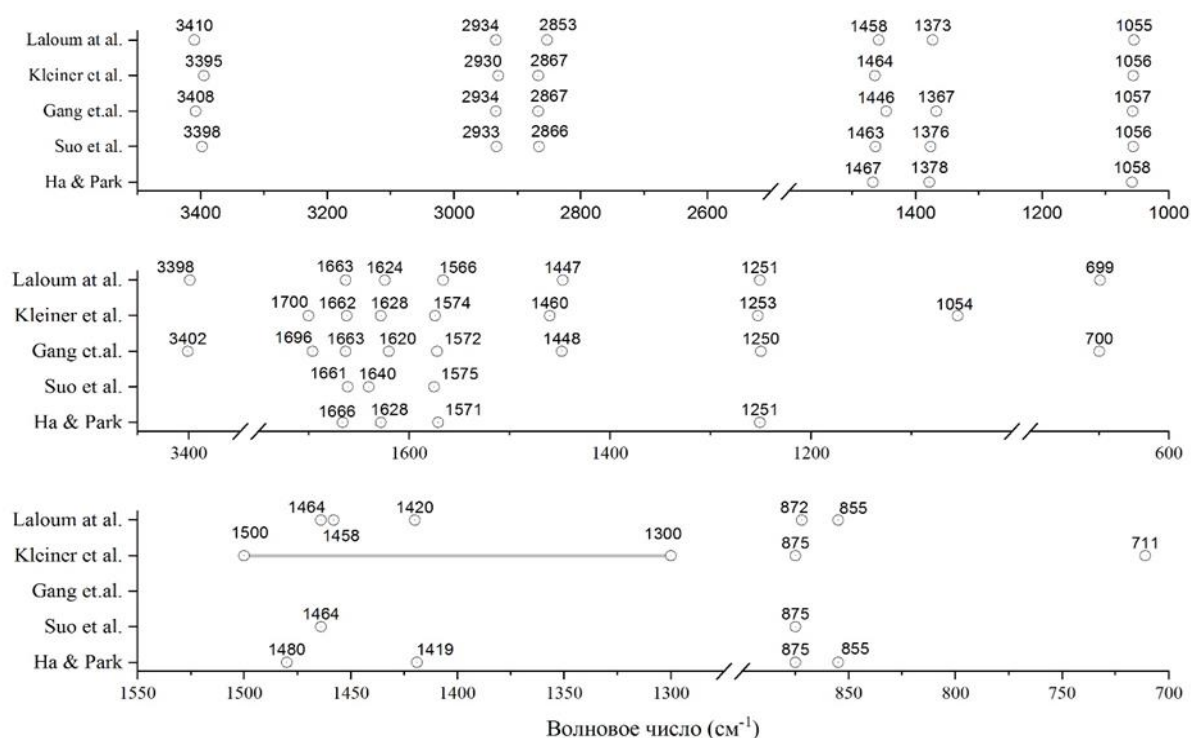


Рис. 9. Наглядное представление линий поглощения в ИК области разных веществ согласно исследованиям разных авторов. Сверху вниз – холестерин, билирубинат кальция и карбонат кальция, соответственно.

### **Желчные камни с билирубинатом кальция**

ИК-спектры кальций билирубиновых желчных камней из исследования Ха и Парк [6] представлены на Рис. 5. В частности данные спектры выглядят примерно также как и в исследовании Суо и др.[17]. Спектр имеет дублет пиков на  $3398\text{ см}^{-1}$  и  $3264\text{ см}^{-1}$ , а также триплет пиков при  $1663$ ,  $1624$  и  $1566\text{ см}^{-1}$ . Один из пиков дублета является острым  $3398\text{ см}^{-1}$  другой широким, которые находятся на широкой полосе поглощения при  $3600\text{-}2400\text{ см}^{-1}$ . Это является признаком поглощения группы N-H растягивающих колебаний пирольного кольца, а также широкая полоса поглощения при  $3264$  также является валентным колебанием лактама N-H. Известно, что широкая полоса при  $3600\text{-}2400\text{ см}^{-1}$  образуется в результате наличия связанной воды в соединении  $\text{Ca}(\text{HBR})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  или  $\text{Ca}(\text{BR})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , где HBR и BR обозначаются одновалентный и двухвалентный билирубин, соответственно. Триплетный пик поглощения билирубина при  $1663$ ,  $1624$  и  $1566\text{ см}^{-1}$  наблюдается когда карбоновая кислота билирубина конъюгирована с ионом металла, например, с кальцием, с образованием билирубината кальция. Пик поглощения при  $1703\text{ см}^{-1}$  связывают с наличием конъюгированной карбоновой кислоты. Полосы поглощения при  $1447\text{ см}^{-1}$  относят как к билирубину так и к билирубинату кальция. Кроме того, пик поглощения при  $1251\text{ см}^{-1}$  ранее был отнесён к растяжению связи N-H/C-O группы, а при  $699\text{ см}^{-1}$  к деформации лактамного кольца [6]. Считается, что желчные камни, которые содержат билирубинат кальция в основном темно-окрашенные (черные), но бывают исключения (желтоватая окраска внутри) [6].

### **Желчные камни с карбонатом кальция**

Характерный ИК-спектр поглощения смешанных желчных камней с содержанием холестерина и карбоната кальция представлены на Рис. 7. Так как соединение карбоната кальция обладает не большим разнообразием связей количество пиков, регистрируемая на ИК-спектрах, не такое большое. Известно, что карбонат кальция поглощает при  $1420\text{-}1480\text{ см}^{-1}$  (широкая полоса),  $872$  и  $855\text{ см}^{-1}$  (острые пики поглощения) [6].

### **Смешанные желчные камни**

В литературе достаточно хорошо освещена тема смешанных камней [6]. Но каких-то дополнительных пиков выделить не удалось при смешивании компонентов. В основном при смешивании наблюдались суммирование широких полос, повышение базовой линии кривой ИК-спектра, поэтому надо относиться к коррекции базовой линии достаточно осторожно, может случится так, что искажение базовой линии может быть и не искажением, а присутствием соединений воды с билирубином кальция или же карбоната кальция.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы исследования.** Образцы gall №1-54 взяты из коллекции кафедры Общая и экспериментальная физика ФТИ. Образцы желчных камней (gall №55-62) были любезно предоставлены Республиканской больницей №1 - Национального центра медицины с соблюдением всех этических стандартов и конфиденциальности пациентов, на основе договора о научно-исследовательском сотрудничестве с университетом. Всего исследовано 62 желчных камня.

**Пробоподготовка и фотографирование образцов.** Желчные камни перед проведением измерения сушили в сухом помещении при комнатной температуре не менее чем 30 дней. После завершения процесса сушки каждый желчный камень был сфотографирован, далее камни (от gall\_55 до gall\_62) были разрезаны пополам скальпелем, для цифровой фотографии внутреннего строения. Образцы отбирались с поверхности интересующего слоя желчного камня соскобом при помощи скальпеля. Затем полученный образец растирали пестиком на агатовой ступке. Получившийся порошок разбавляли бромидов калия (KBr) в примерной пропорции 1 к 100 (масса исл. образца/ масса KBr). С помощью специального 10 тонного пресса, порошок был сдавлен в полупрозрачную пленку толщиной 0,5 мм, которую впоследствии использовали для анализа с помощью ИК-Фурье спектрофотометра.

**ИК – спектроскопия соскобов с поверхности желчных камней.** Проводились на ИК-Фурье спектрометре Perkin–Elmer Spectrum two (Perkin Elmer Inc., США). Диапазон измерений 450-4000  $\text{см}^{-1}$  с шагом 4  $\text{см}^{-1}$ . Проведена обработка спектров с помощью метода базовой линии по 3 точкам: 4000  $\text{см}^{-1}$  (точка), 2400-1800  $\text{см}^{-1}$  и 800-400  $\text{см}^{-1}$  (минимальные точки в диапазоне). Нормирование спектров по максимуму коэффициента поглощения на 10 D на частотах от 450-4000  $\text{см}^{-1}$ , данное нормирование проводилось для сопоставимости спектров. Каждое измерение составляла среднее усредненное значение 4-х сканов, редко в зависимости от качества спектров количество сканов увеличивалось до 50. Коэффициенты поглощения локальных пиков уточнялись с помощью метода базовой линии для сложных пиков с наложением.

**ИК – спектроскопия разреза желчных камней.** Измерения проводили на ИК-Фурье микроскопе Perkin-Elmer Spotlight 200i (Perkin Elmer Inc., США), данный микроскоп снабжен МСТ (Ртутно-Кадмиевый Теллурид) детектором работающий при температуре кипения жидкого азота, обладает повышенной чувствительностью и способен работать с очень малыми сигналами с площади 100 на 100 мкм, без изменения апертуры. Возможно использование данного прибора в различных режимах, например, пропускание, отражение и в режиме нарушенного поверхностного отражения (НПВО). В наших исследованиях мы испробовали все режимы измерения и наиболее оптимальный по трудозатратам и качеству получаемых спектров, оказался

режим НПВО. Но следует отметить, что надо соблюдать осторожность при использовании данного режима измерения с камнями, так при контакте кристалла НПВО с образцом возможен сдвиг образца и повреждение кристалла НПВО. В связи с этим были выбраны наиболее интересны образцы с разными типами желчного камня.

Простая математическая обработка данных, а также структурирование спектральных матриц и часть рисунков была выполнена в среде MS Excel 2016 (Microsoft inc., США). Для обработки спектров использовалась программное обеспечение UV WinLab DPV (Perkin Elmer Inc., США). Статистическая обработка данных, построение части рисунков, и расчет метода главных компонент проводилась на программном обеспечении OriginPro 2021 (Origin Inc., США).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 ВНЕШНЯЯ И ВНУТРЕННЯЯ МОРФОЛОГИЯ ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ

Желчные камни с Gall\_1 по Gall\_54 были ранее получены с медицинских организаций Якутска и Жатая, к этой коллекции добавлены 8 камней обозначенные как Gall\_55-62 (см. Рис. 10). Данные желчные камни были получены с РБ№1 с соблюдением конфиденциальности пациентов, получена информация о поле и возрасте пациента.



Рис. 10. Внутреннее строение желчных камней Gall\_55-Gall\_62.

Желчные конкременты были высушены в течении 10 дней в сухом помещении при комнатной температуре, без воздействия прямым солнечными лучей. После проведения внешнего осмотра были произведены эксперименты по наиболее оптимальному распилю по центру, для определения внутренней структуры камней, предпринимались попытки разреза с помощью станка, но форма и размер не позволяли это сделать безопасно. В результате наименее трудозатратным и простым оказался разрез камней с помощью скальпеля, результаты которой вы видите сверху на фотографии. Желчные конкременты достаточно легко разрезались скальпелем по типу разлома, при должном умении можно достичь вполне неплохих результатов по ровности раскола камня. Причем дается информация в обзорной статье, что коричневые камни

более мягкие чем черные камни [15]. Что в целом не удалось подтвердить, из-за отсутствия абсолютно черных конкрементов.

*Размеры желчных конкрементов* варьировались от 9 мм до 15-16 мм, при этом надо упомянуть что у некоторых образцов были по несколько камней, где предпочтение давалось наибольшему по размеру.

*Цветность желчных камней.* Считается, что точно определить основной состав желчного конкремента по цвету сложно, часто применяется разделение желчных камней на 3 типа: Преимущественно холестериновые цвет от белых до разных оттенков желтого с зеленым, пигментные цвет от коричневого до черного, смешанные все что не входит в эти цвета. По фотографии видно, что желчные камни Gall\_55, Gall\_61, Gall\_62 имеют белый цвет с оттенками желтого и внутри, и снаружи. Образцы Gall\_56-57 имеют желтый цвет поверхности с темно-красными и белыми участками, а также Gall\_57 имеет зернистую поверхность, чего нельзя сказать про образец Gall\_56. Образцы Gall\_58-60 имели светло-коричневый и темно-коричневые цвета поверхностей, тогда как внутренняя цветность варьируется от желтого до темно-желтого.

При рассмотрении *внутренней структуры* некоторых камней, например, Gall\_58 и Gall\_60 можно увидеть в некоторых частях камня слоистую структуру, кольца с желтым и темно-желтыми слоями. Если учитывать, что желчные камни растут довольно долго внутри человека годами. В литературе дается скорость роста размера камня внутри человека 3 мм/год, встречались упоминания и о лабораторных испытаниях, где камень рост до средних размеров пару см за 3 месяца. Связи с этим можно предположить, что камень растет с разной скоростью в течении суточной активности пациента, в результате которой мы видим в некоторых частях слоистую цветность.

По форме структуры можно ещё упомянуть о том, что внутри желчных камней бывают кристаллические структуры разных размеров, с гладким покрытием снаружи камня (Gall\_56, 61, 62) или без (Gall\_55) и промежуточные виды на подобие (Gall\_57). По нашему мнению, камни с острыми поверхностями могут принести пациенту больше дискомфорта, чем гладкие. А также форма камней напрямую зависит от притертости камней к другим твердым поверхностям, например, к другим камням, что мы можем увидеть на Gall\_58 и Gall\_59.

### **3.2 ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ СОСКОБОВ С ПОВЕРХНОСТИ ЖЕЛЧНОГО КАМНЯ**

В мировой литературе известно много исследований состава желчных конкрементов, где одни из первых исследований с использование ИК-Фурье спектроскопии начинают встречаться

с 60-ых годов 20 века. До наших дней были сделаны многочисленные исследования желчных камней с помощью различных методов начиная от биохимических до рентгеноструктурного анализа, на данный момент ИК-спектроскопия является классической методикой определения основного состава желчных конкрементов [6, 15]. Основной линии некоторых исследований представлены в виде рисунка в Приложении 2.

На Таблица 5 представлено сравнение некоторых исследований состава желчных камней с нашими данными. В результате сравнения с эталонными спектрами и выявления качественных признаков (пиков) присутствия основных химических молекул, было определено, что 67,7% всех камней являются преимущественно холестериновыми. В сравнительной таблице видно, что у рассмотренных исследований чаще всего наблюдается смешанный либо пигментный тип камней.

Таблица 5. Сравнение соотношения желчных камней в разных исследованиях с нами исследованиями

	Weerakoon N. et al., 2015, Шри-Ланка [23]	Cheng C. L. et al., 2016, Тайвань [4]	Ha B. J., Park S., 2018, Соннам, Юж.К. [6].	Laloum E. et al., 1998, Вьетнам [13]	Laloum E. et al., 1998, Франция [13]	Наши данные Якутск. РС(Я)
N	102	36	26	67	62	62
Женщины, количество	80	17	-	-	-	48
Мужчины, количество	22	18	-	-	-	14
Средний возраст	46.1±11.6	-	-	-	-	39,1±9,0
Диапазон возраста, лет	-	ж (30-76) м (29-88)	-	-	-	ж (20-59) м (23-54)
Пигментный	54.53%	30.60%	42,3%	11,9%	22,6%	8,1%
смешанный	37%	47.20%	23,1%	86,6%	61,3%	24,4%
холестериновый	9%	19.40%	34,6%	1,5%	16%	67,7%
острый холецистит	-	1 (ж)	-	-	-	-

24,4% исследованных желчных камней являются смешанными, т.е. сюда включены все типы камней кроме чистых холестериновых и пигментных камней. Если рассмотреть эту группу более подробно, то общее соотношение камней представлено на Рис. 11, где видно, что эта группа подразделяется на подгруппы по составу камней:



Смешанные камни -2 (3%), все три основных компонента.

Известковый камень – 1 (2%), иногда в литературе относят к холестеринно-известковым.

Холестеринно-известковый – 9 (14%).

Холестеринно-пигментный – 3 (5%).



Рис. 11. Круговая диаграмма соотношения типов желчных камней согласно нашим исследованиям.

К пигментным камням отнесены пигментные и пигментно-холестериновые. Тогда как холестеринно-пигментные к смешанным, т.к. содержание билирубина в них достаточно малое. Wu и другие (1997) писал, что в Китае количество пигментных камней тоже является низким порядка 3% частота встречаемости среди населения [24]. Автор подтвердил, что смешивание пигментных камней с бромидом калия ( $KBr$ ) меняет кислую соль одновалентного билирубинат кальция ( $CaHBR$ ) на обычный билирубинат кальция ( $CaKBR$ ), в результате ионного обмена  $H^+/K^+$  [24]. В нашем случае мы тоже можем это подтвердить так как наличие спектров одновалентного билирубината кальция не было обнаружено.

Известно, что женщины в силу своих особенностей в изменении гормонального фона, в том числе и из-за беременности, чаще подвержены ЖКБ. В литературе встречаются разное соотношение [16], можно заключить что данное соотношение примерно 6-3 женщин на 1 мужчину. Тоже самое мы и обнаружили в своих исследованиях, так как количество конкрементов от женщин в исследовании 48, тогда как от мужчин 14, т.е. соотношение примерно на 7 женщин приходится 2-ое мужчин, соотношение 3,43 к 1. Разумеется выборка желчных камней была сделана число случайно, и возможно она, отличая от генеральной совокупности.

По типу содержания желчных камней для разных полов были построены круговые диаграммы, которые представлены ниже на Рис. 12 и Рис. 13. По этим диаграммам видно,

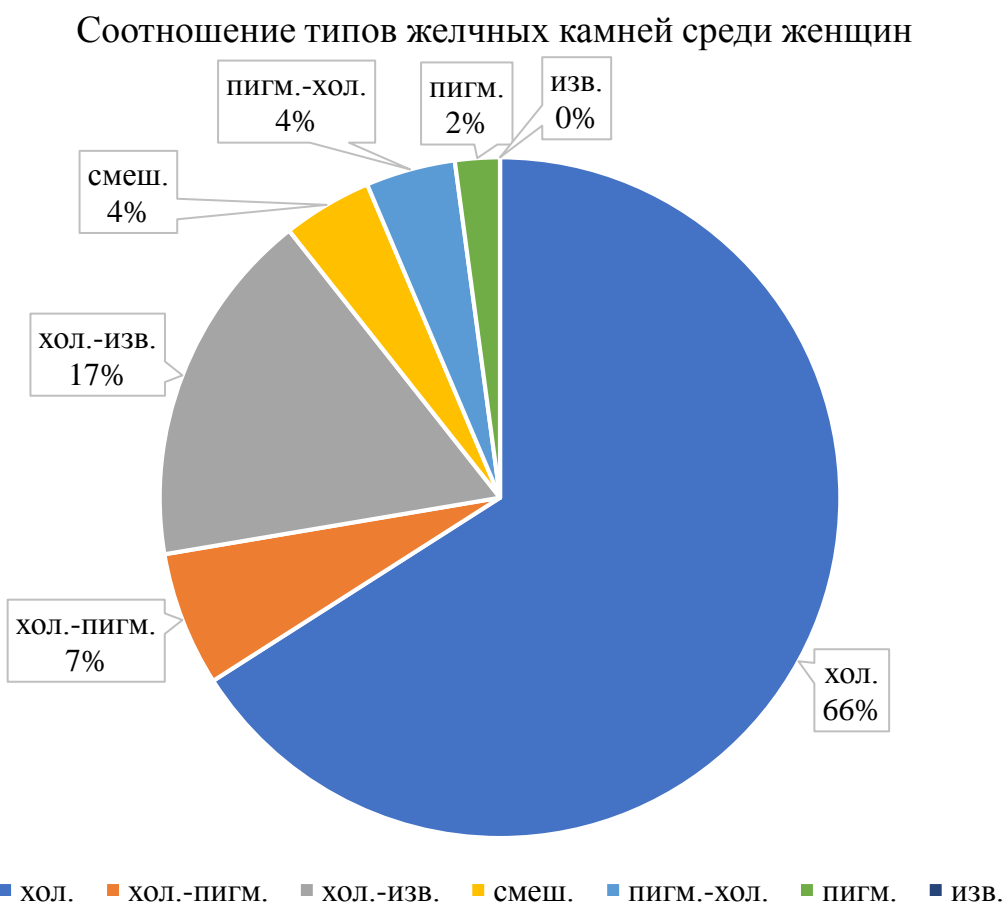


Рис. 12. Соотношение типов желчных камней у женщин.

что холестериновый тип камней все ещё остается преобладающим типом желчных камней. Для разных полов присутствуют все основные три типа вещества, холестерин, билирубин и карбонат. Так что мы предполагаем, что существенных отличий между полами в этом плане не существует, во всяком случае требуется выборка гораздо больше, чем рассмотрена нами.

### Соотношение типов желчных камней среди мужчин

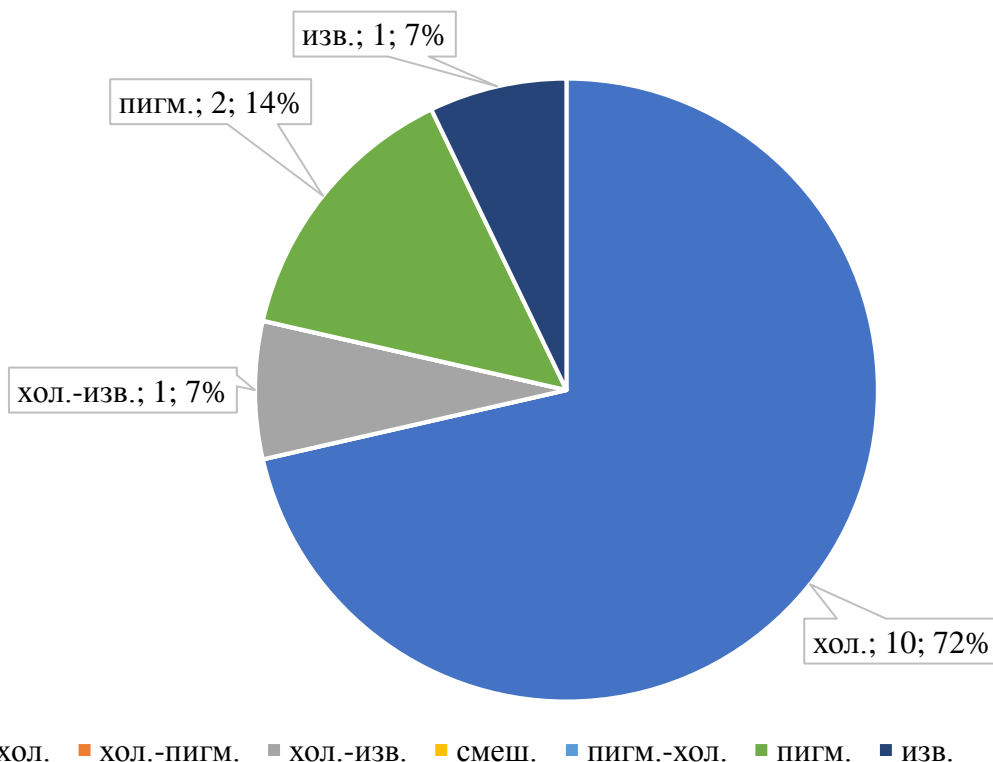


Рис. 13. Соотношение типов желчных камней у мужчин.

В литературе исследованы зависимость от возраста пациента (взрослое и дети) и состав желчного камня, но существенных отличий не было обнаружено [11].

#### 3.2.1 Метод главных компонент в ИК-Фурье Спектроскопии

Шестьдесят два ИК-спектра были получены с поверхностей желчных камней, стандартной методикой с использованием бромидных таблеток и ИК-Фурье спектрометра Spectrum Two, ручной анализ которых ранее выше описан. Все спектры были отгружены с формата ,sp в формат .CSV далее собраны в базу данных в в стандартном формате эксель таблицы, отсортированы по названию камня (с Gall\_1 до Gall\_62), добавлены комментарии к каждому столбцу (спектру) в виде типа желчного камня. Это матрица данных потом была перенесена в среду обработки и визуализации OriginPro 2021 (Origin inc., США).

В новых версиях программного обеспечения OriginPro появилась возможность добавлять бесплатные приложения (App) для различных способов обработки и отображения данных. Одна из которых специально предназначена для анализа спектральных данных *principal component analysis for spectroscopy v 1.3*. Данное приложение позволяет достаточно быстро и удобно анализировать данные без ручных изменений в данных, таких как нормирование или же другие методики на пример SIMCA, как для Uncrambler (CAMO Software).

Для нормирования доступны несколько способов нормирования данных это «Correlation matrix» и «Covariance matrix», где в данном случае наиболее предпочтительным является ковариантная матрица, так как она наименее искажает форму спектров на нагрузках компонентов. А также выбирается эталонный спектр из образцов и производятся расчеты.

Внизу на Рис. 14 представлены количество компонент и объяснённая изменчивость по отдельности и суммарная с предыдущими компонентами, где видно, что 1-ая компонента

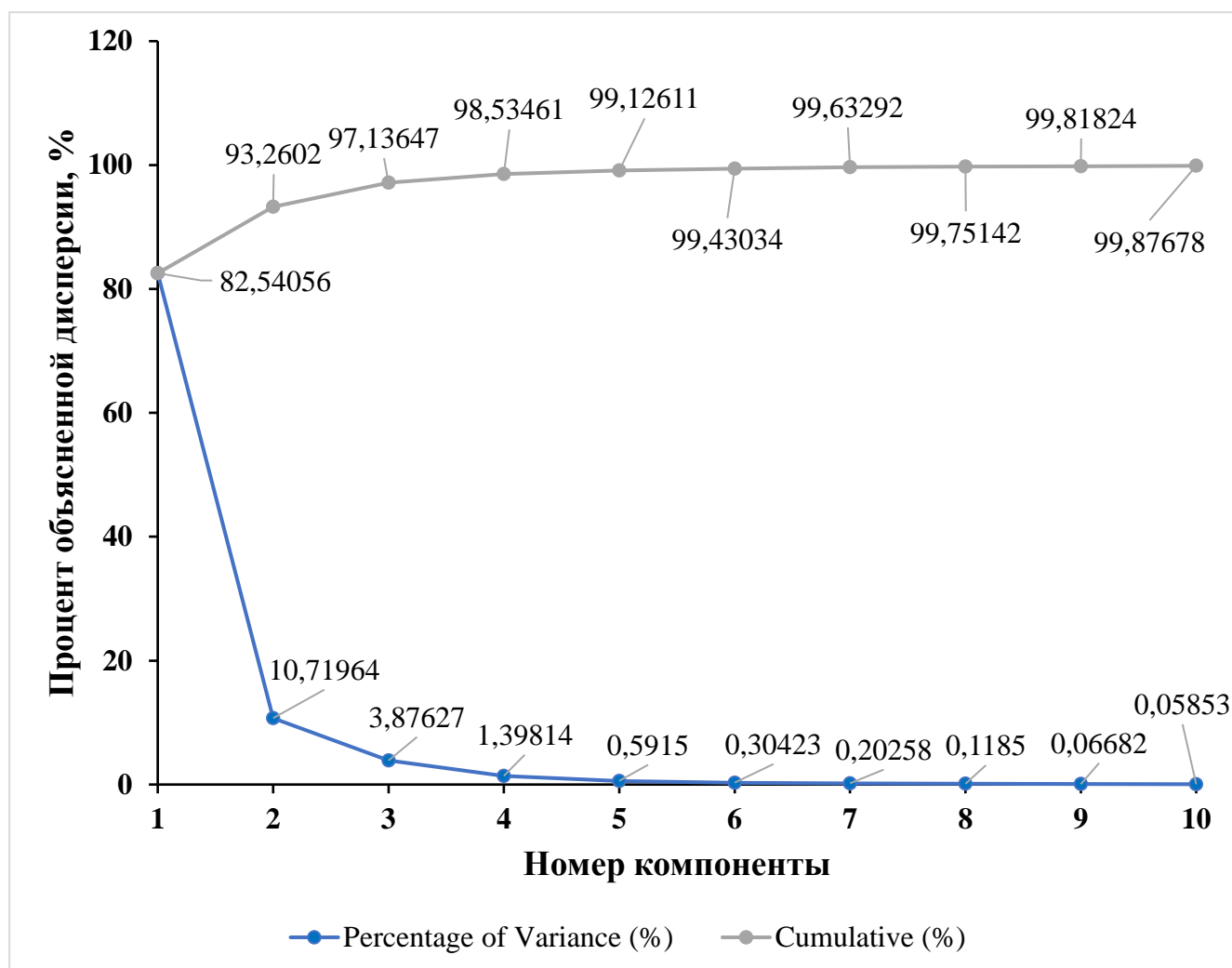


Рис. 14. Представлены проценты объясненной дисперсии для разных компонент по отдельности и в сумме.

является наиболее выраженной, она объясняет 82,5% изменчивости спектров, далее мы видим, что значения резко уменьшаются, до 10,7% это второй компонент и 3,87% третий компонент. Если мы посмотрим на сумму изменчивости трех первых компонент она будет равняться 97,1%, что вполне нас устраивает. Так как мы знаем количество главных веществ, которые следует отделить данным методом, оно равно 3.

Для выбора количества компонент также используют собственные значения факторов (eigenvalue) (см. Рис. 15). На данном рисунке видно, что у первой компоненты собственное значение равно 7,32, второй 0,95 и третьей 0,344. Предлагается брать значения выше единицы или

же там, где происходит резкий слом линии и переход на пологую ломанную (1-2 компоненты). Но все же эти рекомендации носят условный характер, чаще всего применяются если исследователь не знает точное количество факторов, в нашел случае известно, что есть 3 основных фактора (холестерин, билирубин и карбонат), а низкое значение собственных значений факторов объясняется меньшим количеством желчных камней определенного типа.

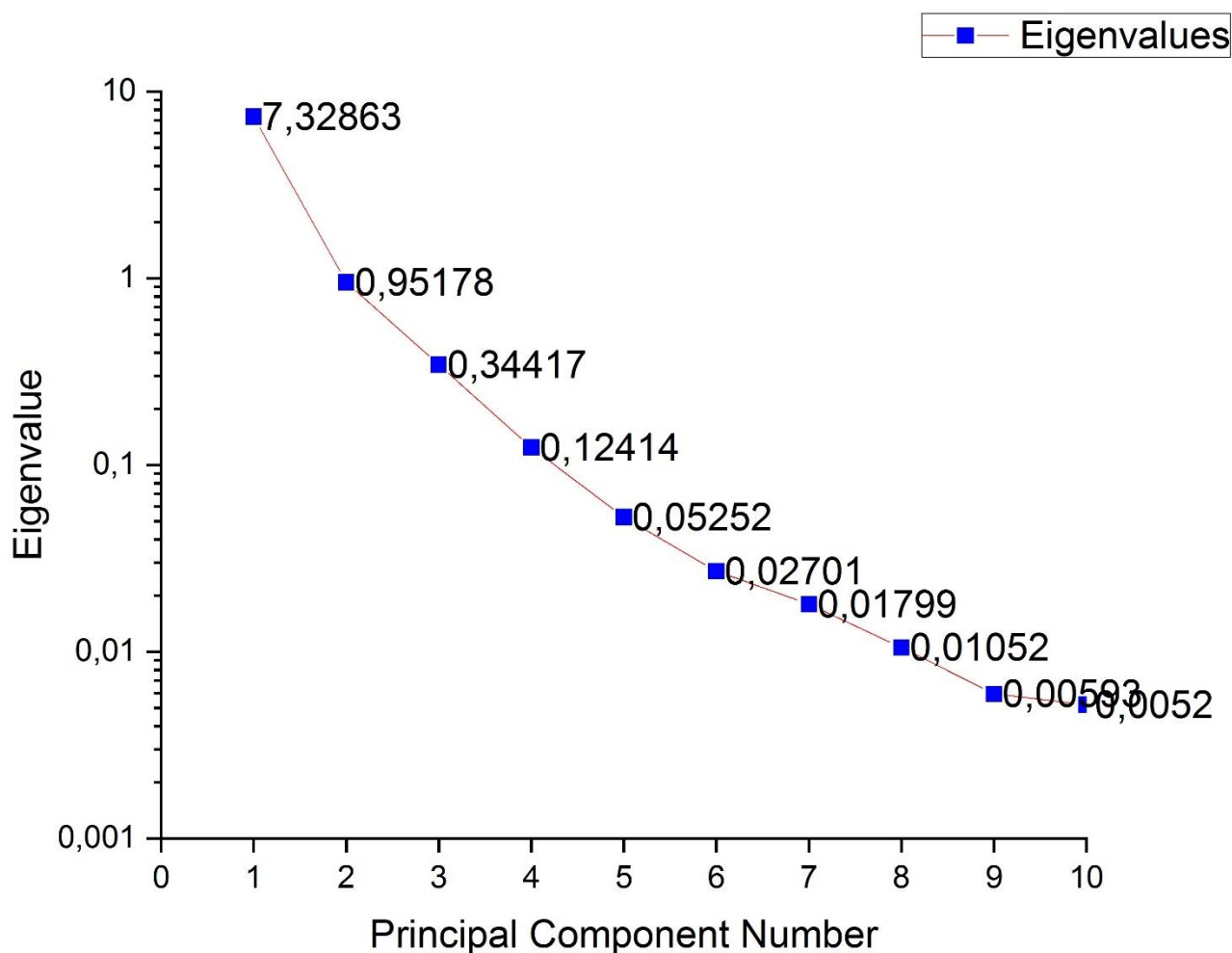


Рис. 15. Представлены значения собственные значения факторов (eigenvalue) в логарифмическом масштабе.

Интересно изучить влияние каждой полосы спектра на разные компоненты эти рисунки представлены ниже (см. рисунки ниже). На Рис. 16 представлены компоненты 1-3 и спектр желчного камня Gall\_60, который ранее был определен как холестериновый камень. Видно, что вклад разных волновых чисел разный у разных компонент. Следует обратить внимание на первую компоненту, где положительную нагрузку полностью несет рисунок холестеринового спектра. Из этого можно заключить, что первая компонента полностью соответствует

холестериновому типу камня, изменение данной компоненты в положительную сторону для данных является явным признаком присутствия холестерина в желчном камне.

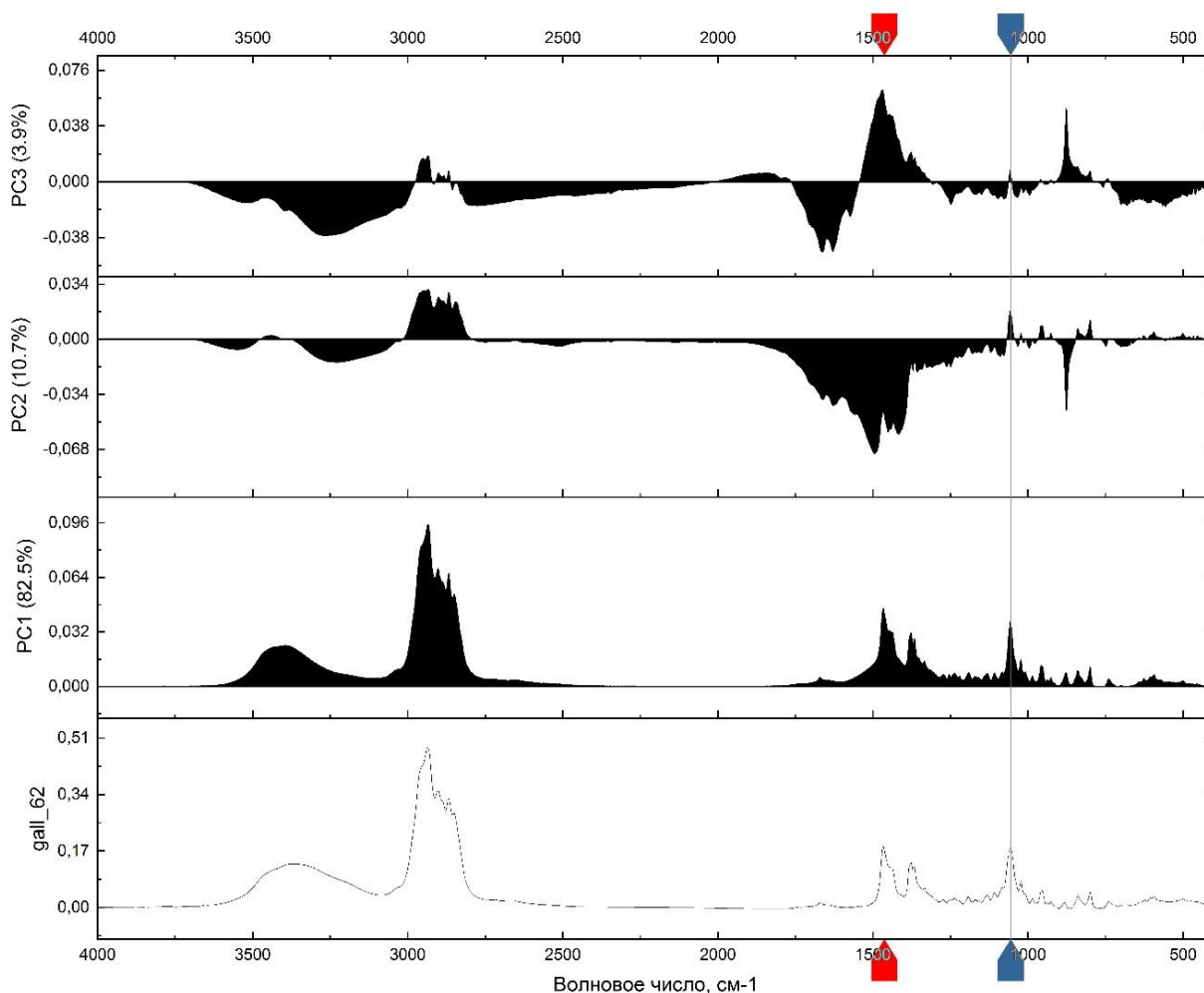


Рис. 16. Вклад волновых чисел на главные компоненты (PC1-3) в сравнении со ИК-спектром образца Gall\_60 (холестериновый тип).

На Рис. 17 представлен вклад волновых чисел компоненты №1-3 по сравнению со ИК-спектром образца Gall\_17, который также ранее был определен как пигментный камень. В данном случае совпадения по главным определяемым длинам мы видим в компоненте №3, виден триплет пиков в отрицательном значении этой компоненты. Данный триплет связывали с амидами 1 и 2, а также пик при  $1250\text{ см}^{-1}$ , который часто наблюдается в разных исследованиях согласно ПРИЛОЖЕНИЮ 2. По остальным пикам корреляции является не таким строгими, что действительности нами было выяснено ранее в литературе.

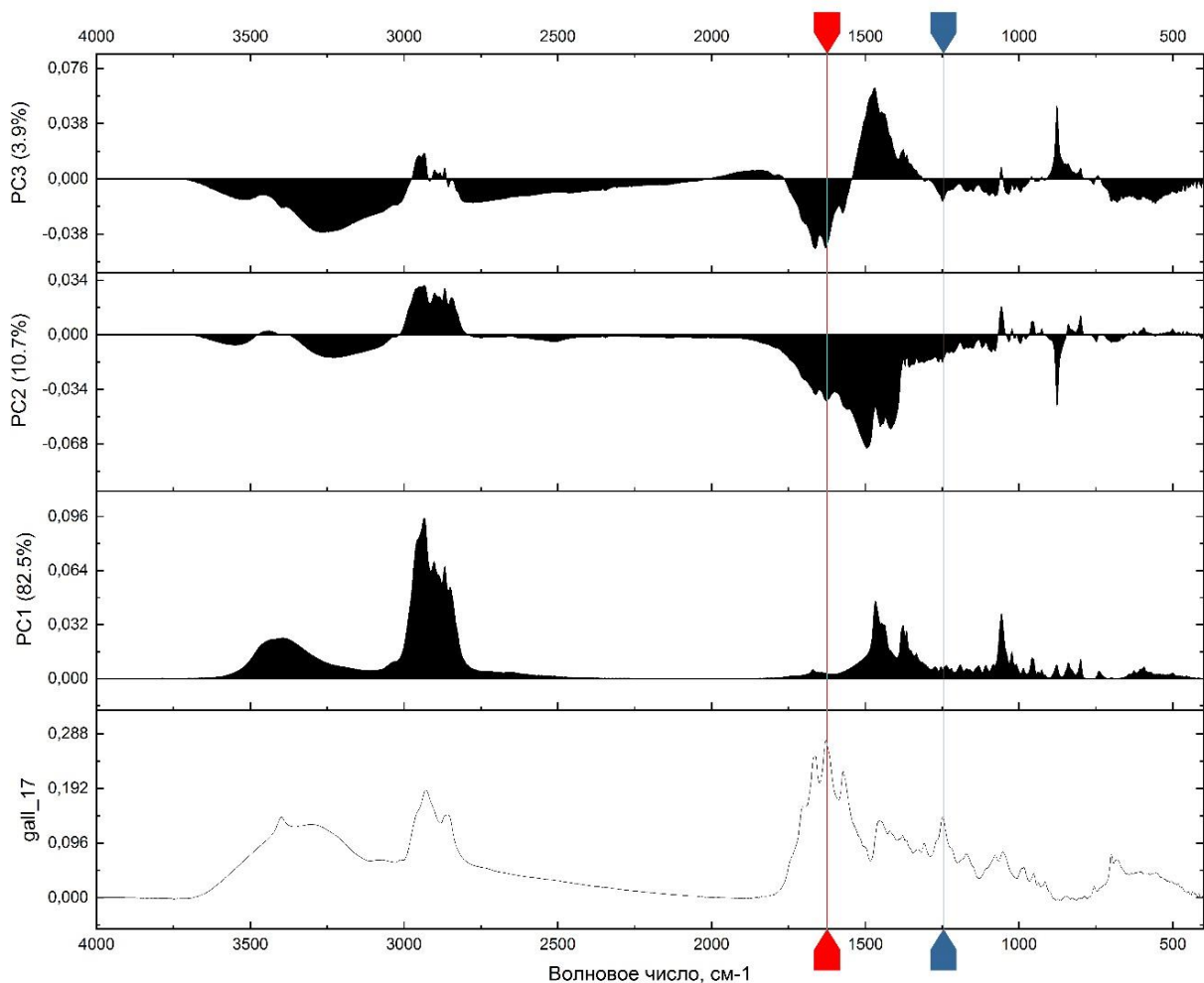


Рис. 17. Вклад волновых чисел на главные компоненты (PC1-3) в сравнении со ИК-спектром образца Gall\_17 (пигментный тип).

На Рис. 18 представлен вклад волновых чисел компоненты №1-3 по сравнению со ИК-спектром образца Gall\_62, который также ранее был определен как известковый камень. В итоге сравнения со спектром образца видно, что широкая полоса поглощения при 1200-1500  $\text{см}^{-1}$  наблюдаем для обратного значения компоненты №2 и для положительного значения компоненты №3. Следует отметить, что в обоих случаях присутствует полоса поглощения при 875  $\text{см}^{-1}$  для явно говорит о хорошей корреляции этих двух компонент с наличием в образце карбоната кальция.

Однако же следует отметить, что для образца Gall\_60 помимо карбоната кальция присутствует большое содержание холестерина и в действительности компонента №1 будет по большей части объяснять дисперсию для данного образца. К тому же наличие холестерина у всех карбонатных образцов оставляет слабые характерные пики на 1055  $\text{см}^{-1}$  и в области 1500-1450  $\text{см}^{-1}$  и в области до 3000  $\text{см}^{-1}$ , что мы видим на компонентах №2-3.

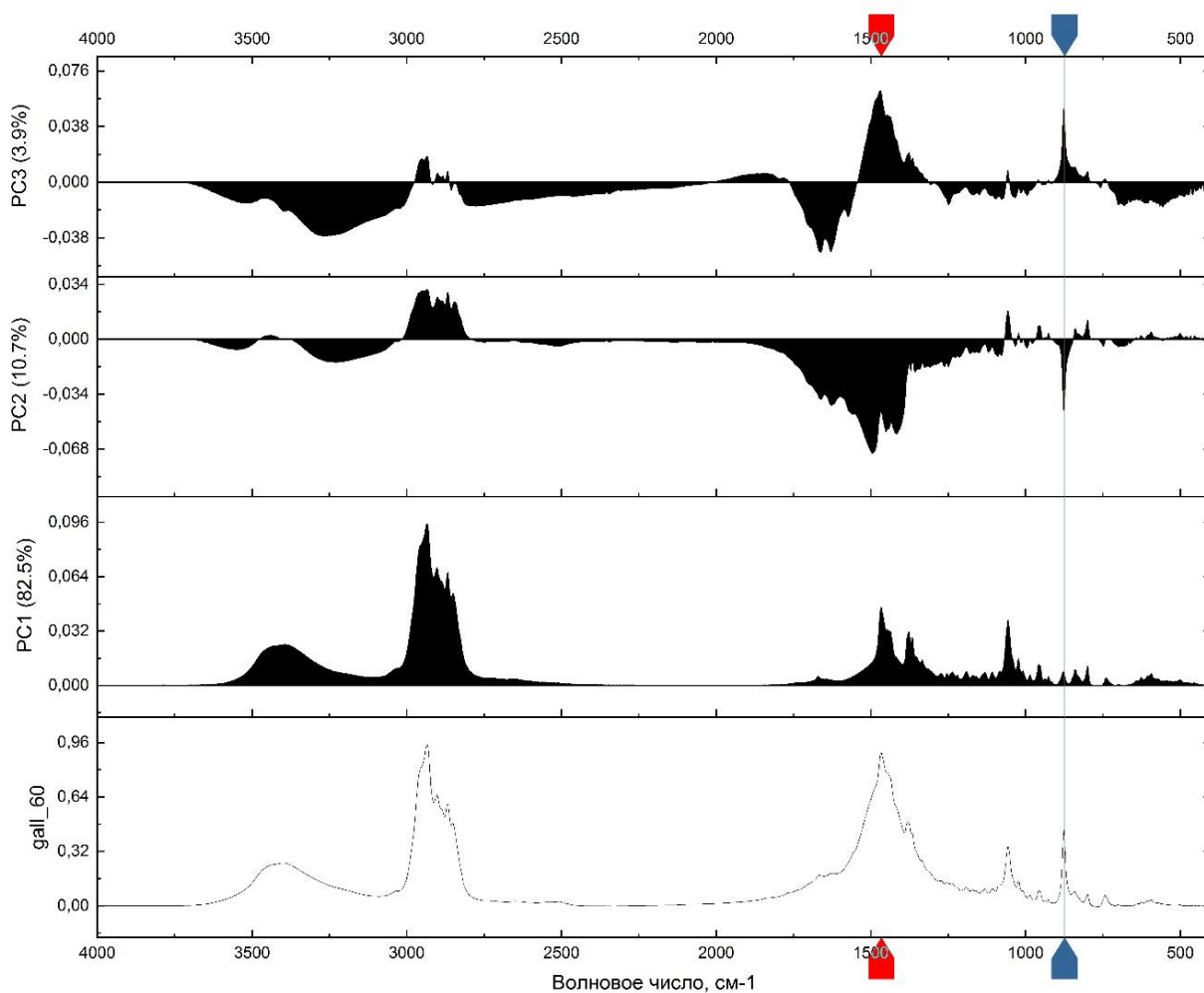


Рис. 18. Вклад волновых чисел на главные компоненты (PC1-3) в сравнении со ИК-спектром образца Gall\_62 (известковый тип).

Разобрав вклады разных волновых чисел на 3 основные факторные нагрузки (главные компоненты), можно отобразить это в виде трёхмерного пространственного распределения точек. Данный метод визуализации позволяет представить вышеописанные корреляционные закономерности более наглядно. На Рис. 19 представлено распределение точек, как было описано ранее ось компоненты №1 представляет собой по холестеринковые пики, и видно, что большая часть точек с холестеринковыми камнями распределены в небольшой области с этого ракурса, выбивается только одна точка. И можем предположить, что данная точка представляет собой выброс или ошибку в определении состава желчного камня.

Если мы обратим внимание на другие типы желчных камней, например, пигментные то распределение их окажется направлено с центра холестеринковых камней в верх с небольшим



углом в правую сторону, где в действительности мы видим это отрицательное направление для компоненты №3, которое мы охарактеризовали ранее, как описывающую камни содержащие билирубинат кальция. А также с этого же ракурса видно, что камни содержащие известковые включения правлены вниз от центра желчных камней и сильнее в правую сторону, то есть в положительную сторону компоненты №3 и в отрицательную сторону компоненты №2. И может утверждать, что это область обозначается известковыми камнями. И если мы обведем данные области, то увидим достаточно разделенные области распределения точек, которые очень хорошо соответствуют наших ранее полученным данным вручную (см.

Рис. 20).

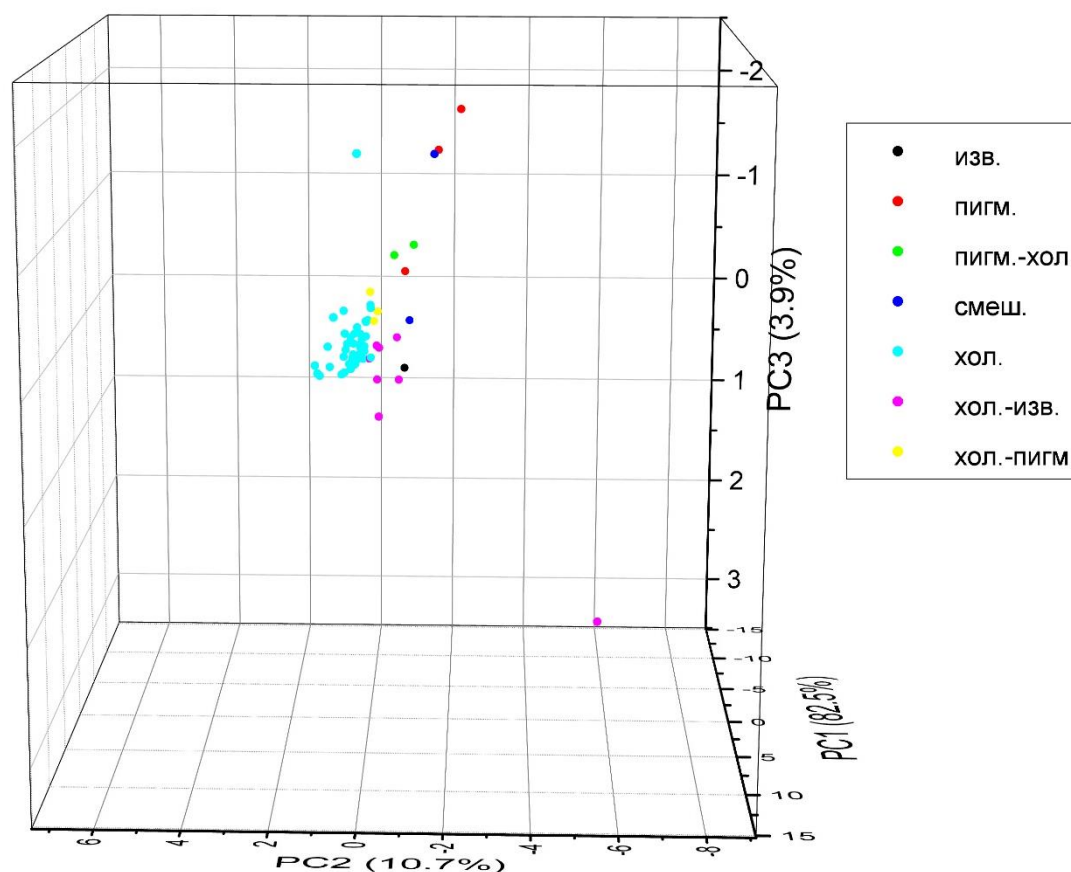


Рис. 19. Распределение образцов в 3-х мерном факторном пространстве.

По итогу можно сказать, что метод главных компонент (МГК) является часто применяемым математическим поиском корреляционных зависимостей у большого количества исследуемых параметров, а также в частности для спектральных данных [13]. МГК позволяет сократить число степеней свободы внутри данных и оставить только те факторы (компоненты), которые характеризуют наибольшее количество информации, в нашем случае данная модель

описывает 97% характеристических изменений ИК-спектров желчных камней. Дальнейшем использование МГК позволит наиболее точно разделять типы желчных камней, так как при ручном анализе возможны ошибки (человеческий фактор) особенно это связано с тем, что при слабых сигналах примеси можно ошибочно распределить желчный камень тот или иной тип желчного камня. А также такая методика обработки данных может помочь в установке пограничных значений содержания веществ в желчных камнях, а также убыстрит анализ большого количества ИК-спектров, которые в дальнейшем будут иметь место в будущих исследованиях слоев желчного камня. Где ручной анализ каждого спектра иначе займет значительное время.

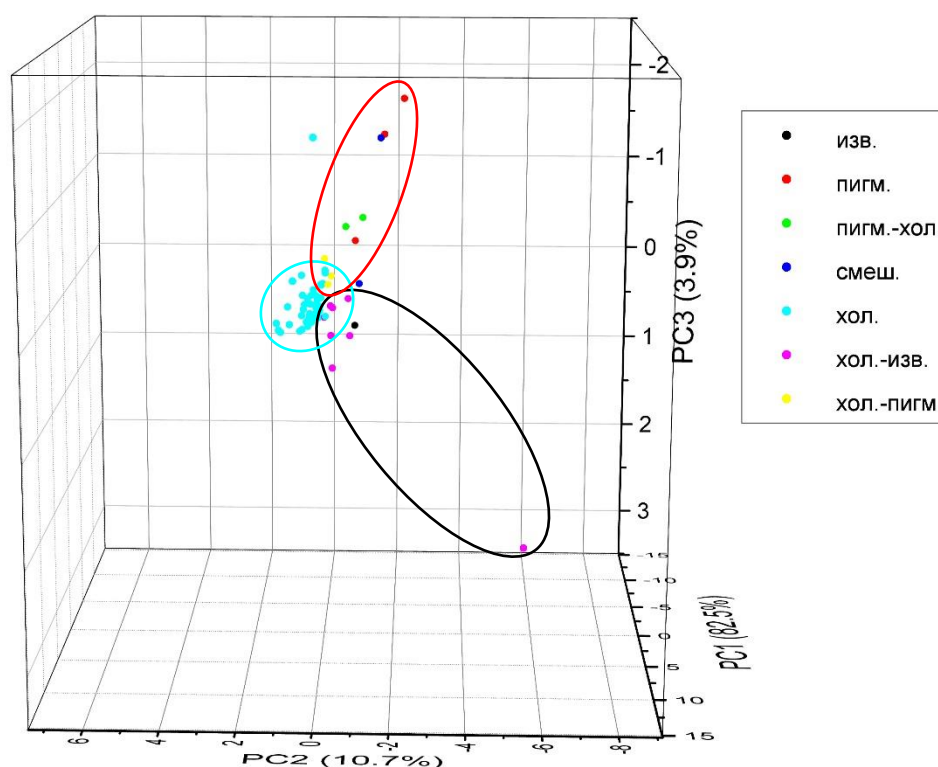


Рис. 20. Распределение образцов в 3-х мерном факторном пространстве. Окружностями представлены области распределения содержания разных составов желчного камня: сиреневая окружность — это холестериновые камни, красная окружность — это пигментные камни и черная окружность — это известковые камни. Выброс представлен желчным камнем Gall №58.

### 3.3 ВНУТРЕННИЙ СОСТАВ ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ НА ИК-ФУРЬЕ МИКРОСКОПЕ

Многие авторы исследовали внутреннее строение и химический состав желчных камней, ими было показано, что внутренняя структура, цвет и химический состав желчных камней может отличаться от поверхности желчного конкремента [6, 9, 16]. Недавней обзорной работе утверждали, что исследований с изучением микроструктуры с помощью ИК-спектроскопии на основе современных инструментальных решений не было представлено [15]. По настоящее время таких работ мою тоже не было обнаружено.

В данной части диссертации представлены результаты по исследованию нескольких желчных камней №58-62 с помощью ИК-Фурье микроскопа Spotlight 200i (Perkin Elmer). Измерение проводились на специальной подставке, изготовленной мною для образцов высотой до 12 мм, с углублением по середине. Образец закреплялся неподвижно на ней, между двумя брусками мягкого материала (пластилина) и с подкладкой из бумаги, чтобы не загрязнить образец. Большое внимание было уделено надежности закрепления образца на подставке, иначе во время прижима образца кристаллом НПВО, образец может сместиться, что крайне нежелательно.

Внизу представлены микрофотографии поверхности (картирование), снимки поверхности сделаны на ИК-Фурье микроскопе. Видно, что присутствуют прямоугольные области – это метки-области для измерения. На некоторых фотографиях видны определенные программным обеспечением тонкие вытянутые метки, данный режим измерения наиболее подходит для поверхностного диффузного отражения, т.к. в этом режиме практически нет ограничений в меньшем размере области измерения, обусловленное изменением апертуры луча. Тогда как для режима НПВО ограничения в размере метки 100x100 мкм связаны с размером поверхности соприкосновения кристалла НПВО и линейными размерами отражающегося луча, примечание, отражение происходит только 1 раз.

На рис. 22 Рис. 21 видно, что это холестериновый камень Gall\_62. На общей фотографии видно примерное место расположения микрофотографии – это ближе к внешнему слою. На микрофотографии видны места расположения меток(маркеров) для областей измерения спектров. Всего было измерено из данного слоя 4 ИК-спектра. Спектры №3-4 имели хорошо отличимые билирубиновые пики поглощения, что выделено на рисунке. Что показывает небольшое количество в составе камня билирубина кальция, что видно по характерному триплету пиков появляющимся в области 1700-1550 см<sup>-1</sup>. По остальным частотам пики практически не меняются, что видно при сравнении ИК-спектров.

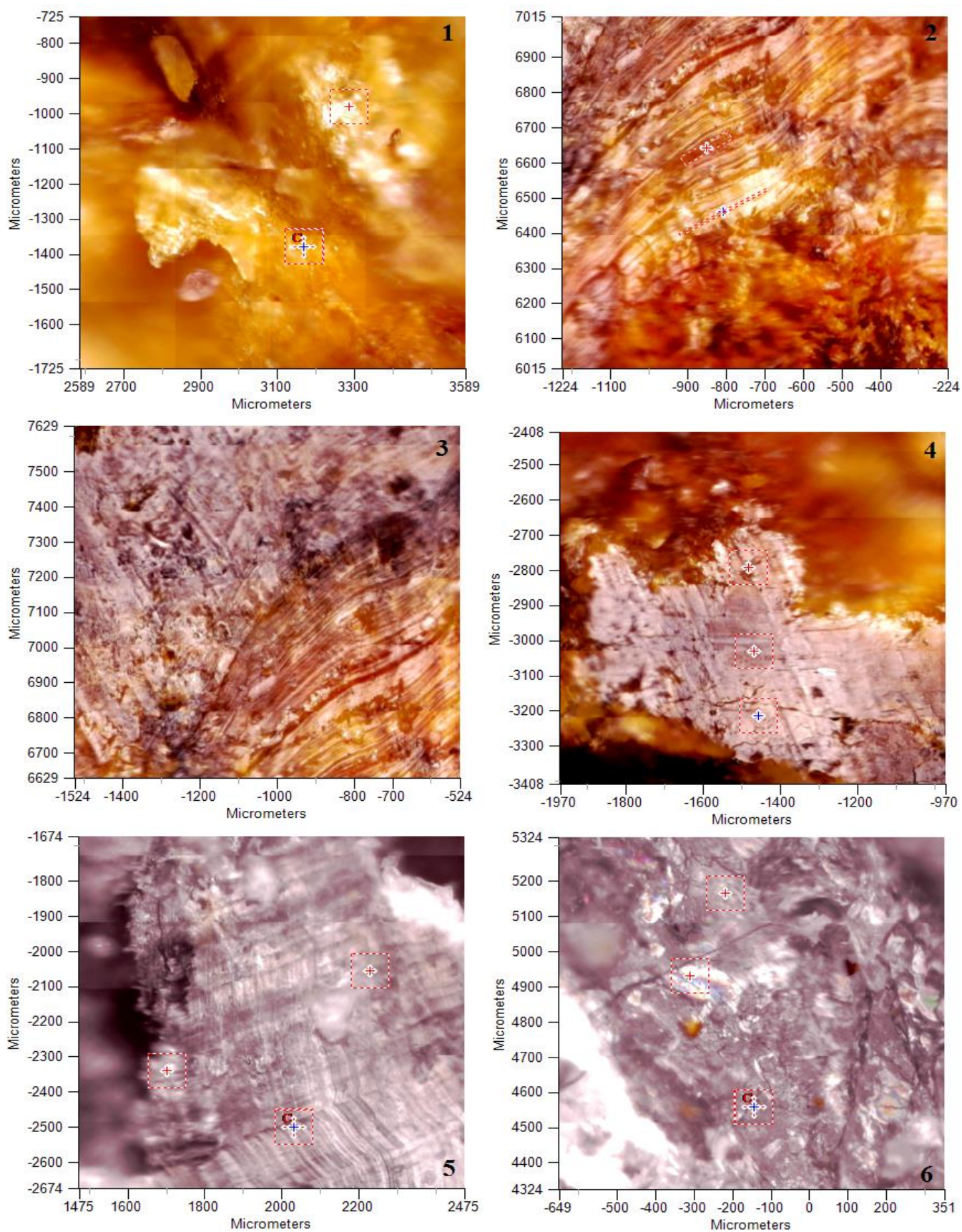


Рис. 21. Микрофотографии внутренних поверхностей желчных камней, полученных на ИК-Фурье микроскопе Spotlight 200i. Представлены поверхности желчных камней Gall №58 (№1), Gall\_60 (№2-4), Gall\_61 (№5-6).

На Рис. 23 представлены ИК-спектры холестерина камня Gall\_62. На общей фотографии желчного камня видно примерное место микрофотографии – это центральная область камня. Были сделаны 3 снимка ИК-спектров в этой области, в результате которого мы видим наличие небольших артефактов в области поглощения диоксида углерода атмосферы. Это связано с недостаточным прижатием поверхности кристалла НПВО с образцом, из-за неровной поверхности. Но тем не менее получены достаточно качественные спектры, которые позволяют определить содержание данного слоя камня. Видно, что для спектра №1 в области поглощения триплета билирубината кальция наблюдается небольшой подъем пиков и очертания данных пиков. В действительности это может служить признаком того, что внутри камня тоже содержится билирубината кальция обнаруживается, тогда как для спектра №2-3 данные пики исчезают и можно судить о том, что в данном слое чистый холестерин без билирубината кальция.

А также были исследованы желчные камни Gall\_58-61, но существенных отличий не было найдено, в некоторых случаях был опробован режим диффузного отражения для Gall\_60

Пришли к выводу, что для определения интегрального (среднего) содержания желчного камня желателен соскоб образца со всех слоев желчного камня или же послойное просверливание образца как это делают при отборе проб твердых пород. Есть ещё идеи по просверливанию желчного камня полый тонкой трубкой. но это сопряжено с трудностями, твердость и хрупкость желчного камня скорее всего не позволит получить не разрушенный цилиндр с образцом. А также неминуемый нагрев образца в области сверления вполне может исказить начальный химический состав образца, что крайне нежелательно. Но, с другой стороны, использование режима НПВО и с раскалыванием образца с помощью скальпеля вполне может быть достаточным для внутреннего структурно-химического анализа.

В целом, можно заключить, что исследование ИК-Фурье микроскопом имеет достаточно весомые положительные стороны как высокое разрешение по площади измерения в обоих режимах. Давая ценную информацию о послойном литогенезе конкремента, что в будущем позволит понять более детально причины образования желчного камня в каждом конкретном случае. В перспективе может помочь врачам с составлением более точно установить причины образования желчных камней в данном конкретном случае и выборе более эффективных методов лечения пациента.

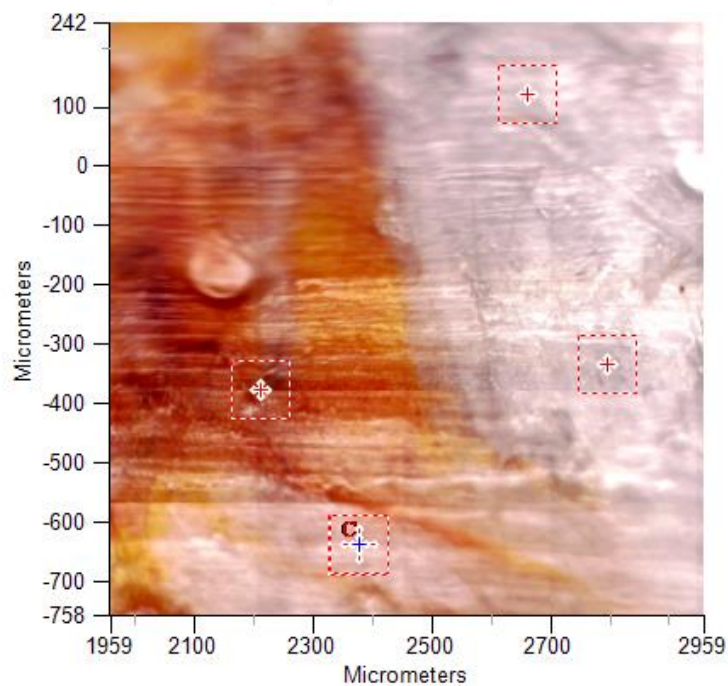
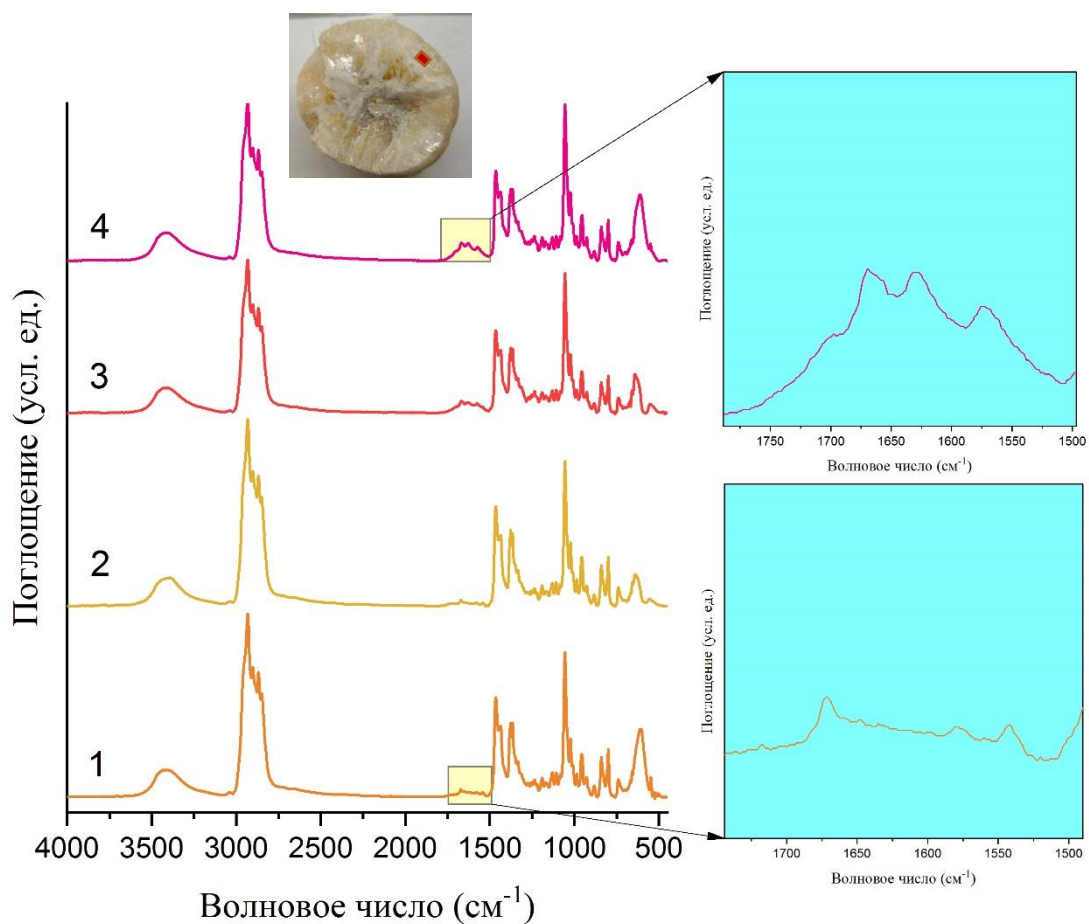


Рис. 22. Представлен комбинированный рисунок с ИК-спектрами сверху (спектры от №1-4) и областью снимка на желчном камне Gall\_62 (ближе к краю конкремента), а также снизу карта снимка с расположением маркеров по которым измерены ИК-спектры. Нумерация ИК-спектров соответствует порядку измерений на карте с маркерами сверху-вниз (1-4). Размеры квадратов маркеров равняются 100x100 мкм.

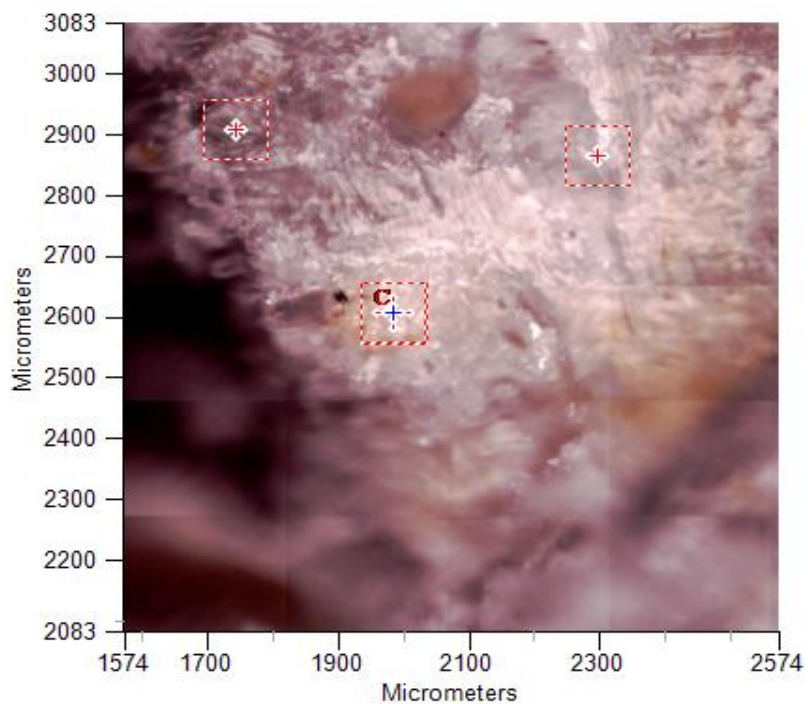
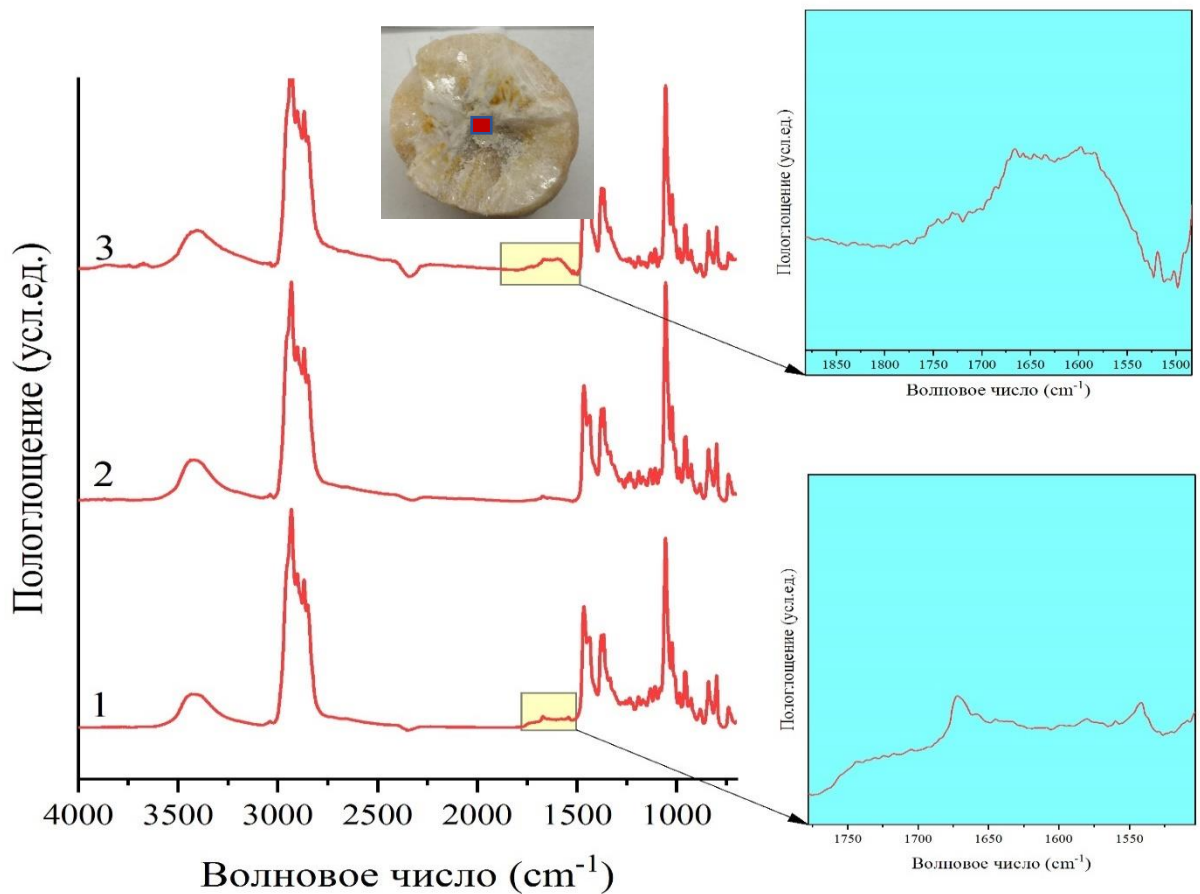


Рис. 23. Представлен комбинированный рисунок с ИК-спектрами сверху (спектры от №1-3) и областью снимка на желчном камне Gall\_62 (середина), а также снизу карта снимка с расположениями маркеров по которым измерены ИК-спектры. Нумерация ИК-спектров соответствует порядку измерений на карте с маркерами сверху-вниз (1-3). Размеры квадратов маркеров равняются 100x100 мкм.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение хотелось бы сказать об уникальности полученных данных на ИК-Фурье микроскопе. В действительности таких работ в мире ещё не представлялось широкой публике, о чем свидетельствует обзор литературы 2020 года [16], где ясно пишется, что нет таких данных, а также подтверждается моими поисками подобных работ. И можно сказать, что впервые мире на ИК-Фурье микроскопе были получены ИК-спектры различных микро-участков внутренней структуры желчных камней.

А также хотелось бы сказать про выявленные преимущества и ограничения данного метода

### Преимущества:

- Высокое разрешение по площади измерения до 100x100 мкм, для метода НПВО.
- По диффузному отражению ограничений по нижней границе площади практически нет (благодаря изменению апертуры и фокусировки), кроме как длины волны.
- Возможность послойно исследовать образец.
- Нет взаимодействия исследуемых веществ с вспомогательным веществом (бромидом калия), как при изготовлении бромидных таблеток.

### Ограничения:

- *НПВО*
  - Наличие артефактов при недостаточном прижиге образца/кристалла НПВО, из-за сложной поверхности образца.
  - Порой не удается автоматически опустить кристалл НПВО для темноокрашенных образцов.
  - Сложность в точной оценке всего образца (интегральный снимок), из-за низкой производительности измерений.
- *Диффузное отражение*
  - Наличие артефактов при диффузном отражении.
  - Высокая зависимость от отражающей способности образца.
  - Слабый сигнал, большое время накопления не дает полностью избавиться от артефактов и искажения базовой линии ИК-спектров.
- Довольно низкая производительность исследования.
- Необходимость в охлаждении МСТ-детектора при помощи жидкого азота.

Как мы видим, есть и сильные и слабые стороны данного метода, конечно, часть из них можно решить усовершенствованием протоколов измерения или же покупкой дополнительной приставки для интегральной съемки всей поверхности образца.



## ВЫВОДЫ

- Для определения типа желчных камней рекомендуем ориентироваться на полосы поглощения в ИК-спектрах среднего диапазона:
  - Для холестерина это следующие диапазоны  $2930-2934\text{ см}^{-1}$ ,  $2867-2866\text{ см}^{-1}$ ,  $1467-1464\text{ см}^{-1}$ ,  $1378-1367\text{ см}^{-1}$ ,  $1055-1057\text{ см}^{-1}$ .
  - Для билирубината кальция это триплет пиков при  $1666-1661\text{ см}^{-1}$ ,  $1640-1620\text{ см}^{-1}$ ,  $1575-1566\text{ см}^{-1}$  и пик поглощения при  $1253-1250\text{ см}^{-1}$ .
  - Для карбоната кальция – широкая полоса поглощения  $1500-1300\text{ см}^{-1}$ , а также полоса поглощения при  $875-872\text{ см}^{-1}$ .
- Присутствие в образце связанной воды может сдвигать и расширять некоторые линии поглощения, связанные с колебаниями ОН-группы, и добавлять нежелательные артефакты в спектрах в важных для определения состава частотах ( $1500-1200\text{ см}^{-1}$ ).
- По результатам анализа 62 желчных камней можно заключить, что преимущественно преобладающим типом желчных камней в Якутии является холестерин - 67,7%, затем следует холестериново-известковый -14,5%, на остальные 5 типов камней приходится 17,8%, от 1,6% до 4,8% на каждый тип камней.
- Метод главных компонент можно рекомендовать для более точного определения типа желчного камня, при наличии достаточной базы данных или эталонных образцов.
- Использование ИК-Фурье микроскопии можно рекомендовать как дополнительный метод исследования состава микроструктуры желчного камня.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balan V. et al. Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: From molecular to clinical practice // *Materials*. 2019. Т. 12. № 18. С. 2884.
2. Cavalu S. et al. New Evidences of Key Factors Involved in “Silent Stones” Etiopathogenesis and Trace Elements: Microscopic, Spectroscopic, and Biochemical Approach // *Biological Trace Element Research*. 2015. № 2 (168). С. 311–320.
3. Chandran P. et al. An extended chemical analysis of gallstone // *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2007. № 2 (22). С. 145–150.
4. Cheng C. L. et al. Spectral and morphological classification of different chronic and acute Taiwanese gallstones via FTIR, SEM and ESEM-EDX microanalyses // *Digestive and Liver Disease*. 2016. № 5 (48). С. 519–527.
5. Gokulakrishnan S. et al. Predicting the composition of gallstones by infrared spectroscopy. // *Tropical gastroenterology : official journal of the Digestive Diseases Foundation*. 2001. № 2 (22). С. 87–89.
6. Ha B. J., Park S. Classification of gallstones using Fourier-transform infrared spectroscopy and photography // *Biomaterials Research*. 2018. № 1 (22). С. 1–8.
7. Hofmann A. F. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug // *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1994. № S204 (29). С. 15.
8. Kaufman H. S. et al. The role of bacteria in gallbladder and common duct stone formation // *Annals of Surgery*. 1989. № 5 (209). С. 584–592.
9. Kaufman H. S. et al. The distribution of calcium salt precipitates in the core, periphery and shell of cholesterol, black pigment and brown pigment gallstones // *Hepatology*. 1994. № 5 (19). С. 1124–1132.
10. Kleiner O. et al. A comparative study of gallstones from children and adults using FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy // *BMC Gastroenterology*. 2002. № 1 (2). С. 1–14.
11. Kleiner O. et al. A comparative study of gallstones from children and adults using FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy // *BMC Gastroenterology*. 2002. № 1 (2). С. 1–14.
12. Kriegermeier A., Green R. Pediatric cholestatic liver disease: Review of bile acid metabolism and discussion of current and emerging therapies // *Frontiers in Medicine*. 2020. (7).
13. Laloum E., Dao N. Q., Daudon M. Cluster analysis of gallstone FT-IR spectra: Tests on simulated mixture spectra and comparison between spectral and morphological classification of human gallstones // *Applied Spectroscopy*. 1998. Т. 52. № 9. С. 1210–1220.
14. Liu G., Xing D., Wang H. Vibrational spectroscopic study of human pigment gallstones and their insoluble materials // *Journal of molecular structure*. 2002. № 1–3 (616). С. 187–191.

15. Singh V. K. et al. Analysis of stones formed in the human gall bladder and kidney using advanced spectroscopic techniques // *Biophysical Reviews*. 2020. Т. 12. № 3. С. 647–668.
16. Singh V. K. et al. Analysis of stones formed in the human gall bladder and kidney using advanced spectroscopic techniques // *Biophysical Reviews*. 2020.
17. Suo T. et al. Fixed-point and stratified analysis of the fine structure and composition of five gallstones with Fourier transform infrared (FT-IR) specular reflection spectroscopy // *Microscopy Research and Technique*. 2012. № 3 (75). С. 294–299.
18. Tandon R. K. Pathogenesis of gallstones in India. // *Tropical gastroenterology: official journal of the Digestive Diseases Foundation*. 1988. № 2 (9). С. 83–93.
19. Toyoda M. Quantitative Determination of Calcium Bilirubinate in Gallstone by Infrared Spectroscopy // *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1966. № 4 (90). С. 303–316.
20. Trotman B. W. et al. Pigment Versus Cholesterol Cholelithiasis: Identification and Quantification by Infrared Spectroscopy // *Gastroenterology*. 1977. № 3 (72). С. 495–498.
21. Trotman B. W. Pigment gallstone disease // *Gastroenterology Clinics of North America*. 1991. № 1 (20). С. 111–126.
22. Wang J. Y., Wu S. D. Ursodeoxycholic Acid for the Treatment of Liver Diseases // *Liver Pathophysiology*. – Academic Press. 2017. С. 767–779.
23. Weerakoon H. et al. Chemical characterization of gallstones: An approach to explore the aetiopathogenesis of gallstone disease in Sri Lanka // *PLoS ONE*. 2015. № 4 (10). С. e0121537.
24. Wu J. G. et al. A spectroscopic investigation of the formation mechanism of pigment gallstones // *Biospectroscopy*. 1997. № 5 (3). С. 381–391.
25. Бакулин И. et al. Билиарный сладж: патогенез, этиология и лекарственная терапия // [omnidocor.ru](http://omnidocor.ru).
26. 10 лет классификации желчнокаменной болезни (ЦНИИГ): основные итоги научно-практического применения [Электронный ресурс]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/10-let-klassifikatsii-zhelchnokamennoy-bolezni-tsniiig-osnovnye-itogi-nauchno-prakticheskogo-primeneniya/viewer> (accessed: 17.05.2021).

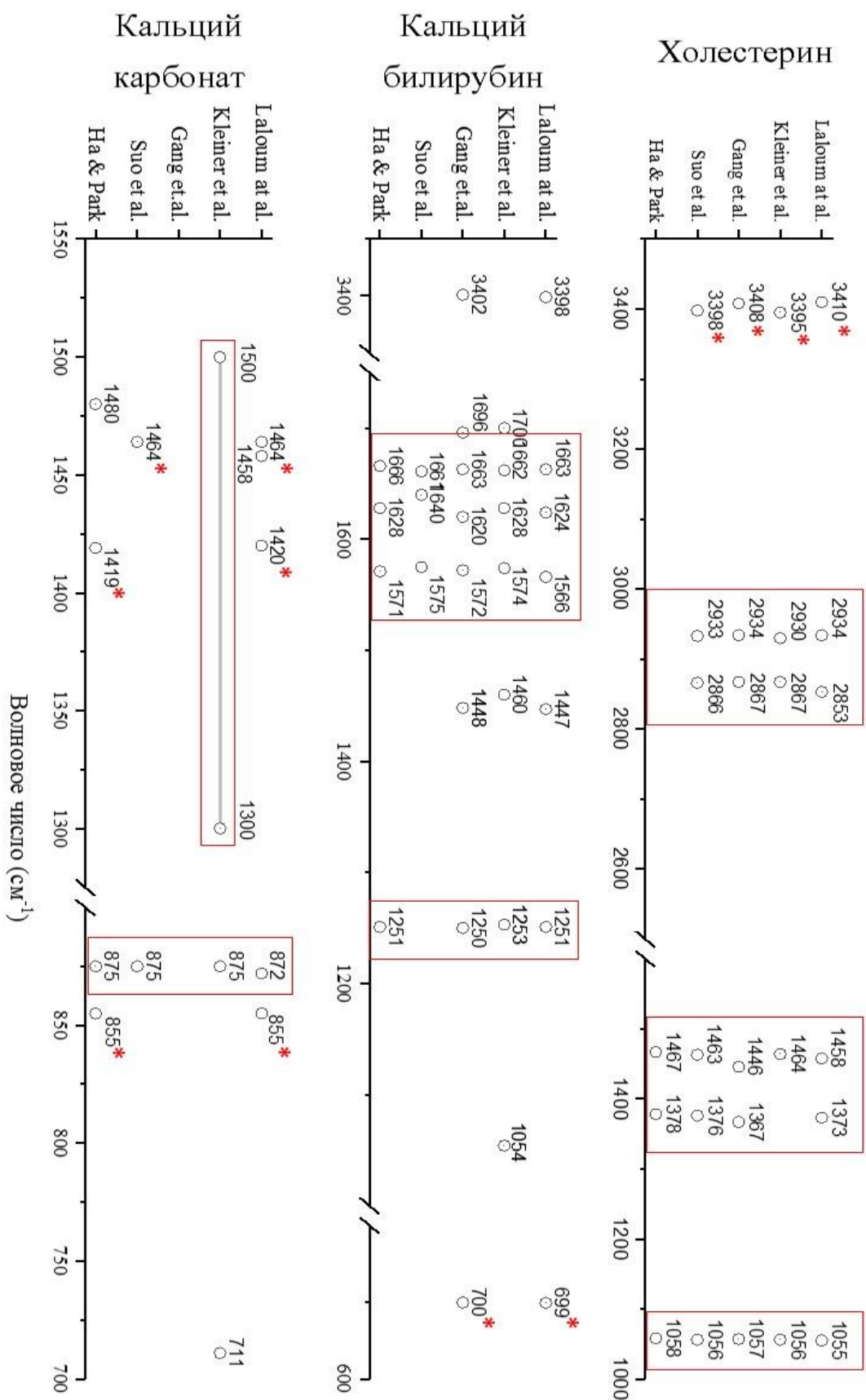
## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 6. Список желчных камней с коротким обозначением и с их характеристиками

№	Наименование	Возраст, г	Пол	тип камня
1	Gall_1	24	Ж	ХОЛ.
2	Gall_2	29	Ж	ПИГМ.-ХОЛ.
3	Gall_3	23	М	ХОЛ.
4	Gall_4	25	Ж	ХОЛ.
5	Gall_5	28	Ж	ХОЛ.
6	Gall_6	20	Ж	ХОЛ.
7	Gall_7	22	Ж	ХОЛ.
8	Gall_8	28	Ж	ХОЛ.
9	Gall_9	29	Ж	ХОЛ.
10	Gall_10	28	Ж	ХОЛ.
11	Gall_11	37	Ж	ХОЛ.
12	Gall_12	33	М	ХОЛ.
13	Gall_13	36	Ж	ХОЛ.
14	Gall_14	38	М	ХОЛ.
15	Gall_15	33	Ж	ХОЛ.
16	Gall_16	37	Ж	ХОЛ.
17	Gall_17	33	Ж	ПИГМ.
18	Gall_18	31	Ж	ХОЛ.
19	Gall_19	30	Ж	ХОЛ.
20	Gall_20	39	М	ХОЛ.-ИЗВ.
21	Gall_21	30	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
22	Gall_22	36	Ж	ХОЛ.
23	Gall_23	39	М	ИЗВ.
24	Gall_24	32	М	ХОЛ.
25	Gall_25	33	М	ХОЛ.
26	Gall_26	39	Ж	ХОЛ.
27	Gall_27	33	Ж	ХОЛ.
28	Gall_28	44	Ж	ХОЛ.
29	Gall_29	40	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
30	Gall_30	40	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
31	Gall_31	43	Ж	ХОЛ.-ПИГМ.
32	Gall_32	45	Ж	ХОЛ.
33	Gall_33	42	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
34	Gall_34	41	Ж	ХОЛ.
35	Gall_35	48	М	ПИГМ.
36	Gall_36	45	Ж	ХОЛ.
37	Gall_37	40	Ж	СМЕШ.
38	Gall_38	44	Ж	ХОЛ.
39	Gall_39	41	Ж	ХОЛ.

40	Gall_40	49	Ж	ПИГМ.-ХОЛ.
41	Gall_41	49	Ж	ХОЛ.
42	Gall_42	42	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
43	Gall_43	48	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
44	Gall_44	48	Ж	ХОЛ.
45	Gall_45	44	М	ПИГМ.
46	Gall_46	41	М	ХОЛ.
47	Gall_47	47	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
48	Gall_48	48	М	ХОЛ.
49	Gall_49	49	Ж	ХОЛ.-ПИГМ.
50	Gall_50	50	Ж	ХОЛ.
51	Gall_51	51	Ж	СМЕШ.
52	Gall_52	52	Ж	ХОЛ.
53	Gall_53	53	Ж	ХОЛ.-ПИГМ.
54	Gall_54	54	М	ХОЛ.
55	Gall_55	42	Ж	ХОЛ.
56	Gall_56	-	Ж	ХОЛ.
57	Gall_57	-	М	ХОЛ.
58	Gall_58	-	Ж	ХОЛ.
59	Gall_59	59	Ж	ХОЛ.
60	Gall_60	47	Ж	ХОЛ.-ИЗВ.
61	Gall_61	-	М	ХОЛ.
62	Gall_62	-	Ж	ХОЛ.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2



### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

