

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.
СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Тимурзиева Алина Борисовна

**Изучение возможности применения раман-флюоресцентных медицинских
технологий в повышении эффективности диагностики и лечения
воспалительных заболеваний глотки**

14.01.03- Болезни уха, горла и носа

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор

Никифорова Галина Николаевна

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор

Александров Михаил Тимофеевич

Москва-2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАМАН- ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ДИАГНОСТИКЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЛОТКИ(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1. Воспалительные заболевания глотки: эпидемиология и вопросы терминологии.....	14
1.2. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний глотки.....	18
1.3. Проблемы диагностики воспалительных заболеваний глотки; характеристика существующих методов.....	23
1.4. Метод лазерно-флюоресцентной диагностики в сочетании с рамановским излучением (РФМТ) в клинической медицине.....	26
1.4.1. Принципы и физические основы метода РФС.....	26
1.4.2. Использование метода РФС в клинической медицине.....	31
 ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	 44
2.1. Общая характеристика больных	44
2.2. Методы обследования пациентов. Клинические характеристики и распределение больных по группам	50
2.3. Характеристики используемых аппаратно-программных комплексов и клиническое применение информативных показателей метода РФ.....	57
2.3.1. Алгоритмы и методы исследования при использовании РФМТ.....	59

2.3.2. Информативные показатели, используемые при оценке раман-флюоресцентных характеристик тканей ЛОР-органов, и их клиническое применение.....	63
2.4. Статистическая обработка результатов исследования.....	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	69
3.1. Определение диагностических возможностей метода РФС при воспалительных заболеваниях глотки.....	69
3.2. Флюоресцентные характеристики тканей глотки в норме и при воспалительных заболеваниях глотки. Расчет чувствительности и специфичности метода РФС.....	70
3.3. Рамановские характеристики тканей глотки в норме и при воспалительных заболеваниях глотки.....	79
3.4. Результаты статистической обработки спектральных данных тканей глотки у здоровых добровольцев и пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями глотки.....	86
3.5. Алгоритм диагностики воспалительных заболеваний глотки с использованием метода РФС.....	106
3.6. Перспективы применения метода раман-флюоресцентной спектроскопии в оториноларингологии.....	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
ВЫВОДЫ.....	121
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Воспалительные заболевания глотки являются одними из самых распространенных в человеческой популяции как среди взрослого населения, так и среди детей, что обуславливает частую обращаемость таких больных к врачам различных специальностей [Мальцева Г.С., 2006; Крюков А.И., 2013; Пальчун В.Т., 2016; Брин А.В., 2016; Spinks A., 2013, Hidayat Q.B., 2019]. Ежегодно в мире отмечается рост числа пациентов с фарингеальной патологией [Пальчун В. Т., 2016]. Острые воспалительные заболевания глотки объединяются термином «острый тонзиллофарингит», но в литературе используются и отдельные диагностические определения-«острый фарингит», «острый тонзиллит», «ангина» [Белов Б.С., 2002; Крюков А. И., Кунельская Н.Л., 2007; Кунельская Н. Л., 2010; Крюков А. И., Туровский А.Б., 2011; Финогеев Ю.П., 2011; Пальчун В.Т., 2014; Крюков А.И., 2015; Зайцева С.В., Застрожина А.К., 2019]. Хронические воспалительные заболевания глотки, в основном, представлены хроническим фарингитом и хроническим тонзиллитом [Плужников М.С., 2006; Крюков А.И., 2009, 2014; Отвагин И.В., 2011; Быкова В.П., 2014; Пальчун В.Т., 2014; Шульга И.А., 2014; Гострый А.В., 2019; Lundin M.S. et al., 2018].

По данным литературы, ежегодно около 16% взрослых и 41% детей переносят острый тонзиллофарингит (ОТФ), однако точных данных относительно распространенности данного заболевания нет [Черкасова Е.Н., 2015; Косяков С.Я., 2015; Шиленкова В.В., 2018; Danchin M.H., 2007; Önerci T.M. 2009; Nakhoul G.N., 2013; World Health Organization, 2013; Furuncuoglu Y., 2016; Mahajan G.D., 2017]. Распространенность хронического фарингита среди населения нашей страны составляет до 78% и ежегодно растет [Бочарова М.Б., 2006; Плужников М.С., 2006; Пальчун В.Т., 2016]. По данным литературы, хронический тонзиллит имеется у 10–63% детей и подростков и у около 37% взрослых, составляя 23,7% в общей структуре всех воспалительных заболеваний глотки [Педдер В.В., 2002;

Крюков А.И., 2009; Карнеева О.В., 2015; Пальчун В.Т., 2016; Бычкова М.В., 2017; Рязанцев С.В., 2017; Нестерова А. А., 2018].

Одним из ведущих факторов в развитии острых воспалительных процессов является инфицирование макроорганизма патогенной микрофлорой и/или активация условно-патогенных микроорганизмов [Пальчун В.Т., 2008; Карпищенко С.А., 2016]. При угнетении специфических и неспецифических факторов естественной реактивности макроорганизма возникает дисбиоз слизистой оболочки, нарушается мукоцилиарный барьер, развивается местная и общая иммуносупрессия, активируется условно патогенная микрофлора, микроорганизмы проникают в более глубокие слои ткани, в ряде случаев, впоследствии формируется хроническое воспаление, характеризующееся наличием патоморфологических изменений [Антонив В.Ф., 1999; Горбаносов И.В., 2002; Крюков А.И., 2005; Пальчун В.Т., 2016]. Развитие хронического воспалительного процесса в глотке, во многом, определяется состоянием макроорганизма и местного иммунитета, микробиотопа глотки, степенью вирулентности возбудителей, особенностями иннервации, кровообращения, наличием сопутствующей патологии (гастроэзофагеальной рефлюксной болезни) и внешних повреждающих факторов, пищевыми предпочтениями и некоторыми другими параметрами [Овчинников А.Ю., 1984; Овчинников А.Ю., 1999; Плужников М.С., 2006; Шпынев К. В., 2007; Еланчинцева А. С., Свистушкин В. М., 2010; Косяков С. Я. 2018; Renner В., 2012; Kalra M.G., 2016]. Для хронического фарингита характерно наличие диффузных катаральных, гипертрофических или атрофических изменений слизистой оболочки глотки и/или формирования гипертрофии лимфоидных гранул на задней стенке глотки [Бабияк В. И., 2012].

Известно, что в ткани небных миндалин при хроническом воспалении на фоне воспалительного нейтрофильного инфильтрата и усиления активности воспалительной реакции в межфолликулярной зоне развиваются некроз и изъязвление люминарного эпителия. При длительном течении хронического

процесса в межфолликулярной зоне и под эпителием формируется фиброз, возникают перестройка сосудистого русла, акантоз и лейкоплакия эпителия миндалин [Блоцкий А. А., 2013; Быкова В. П., 2014; Рыбак Н. А., 2015].

Своевременная диагностика воспалительных заболеваний глотки необходима для адекватного ведения пациентов. Диагностический поиск предполагает оценку жалоб пациента, данных анамнеза, результатов объективного осмотра ЛОР-органов и дополнительных методов исследования [Пальчун В.Т., 2013; Крюков А. И., 2016]. В качестве последних на современном этапе при патологии глотки используются бактериологический, биохимический, цитологический, гистологический и некоторые другие [Белов В.А., 2012; Быкова В.П., 2012; Блоцкий А.А., 2013; Воробьев А.В., 2003; Ильина Е.Н., 2013; Брин А.В., Токарь В.Б., Мирзоева Е.З. 2016; Charlier-Bret N, 2004; Mogoantă SA, 2008; Toledano-Sierra P., 2015]. Важным аспектом диагностики является экспрессность [Александров М.Т., 2008]. На современном этапе в арсенале врачей отсутствуют методы исследования больных с патологией глотки, сочетающие в себе доступность, малоинвазивность, высокую информативность, достоверность, специфичность, быстроту получения результатов.

Поиск, экспериментально-теоретическое и клиническое обоснование применения новых высокочувствительных, высокоспецифичных, неинвазивных, экспрессных медицинских диагностических технологий является актуальным для практического здравоохранения [Кукушкин В.И., Ваньков А.Б., 2013]. Вышеуказанным требованиям по данным литературы, отвечают оптические методы диагностики [Пашков Е.П., 2002; Серов В.В., Суин П.А., 2015; Uckermann O., Galli R., 2014; Ali Momenpour T., 2015; Singh S. P., 2015]. Определенный интерес в этом аспекте представляет метод раман-флюоресцентной спектроскопии (РФС). Метод РФС-комбинационного рассеяния света основан на эффекте флюоресценции и феномене неупругого рассеяния оптического излучения на молекулах вещества, сопровождающегося заметным изменением его частоты [Фабелинский И. Л., 2003].

Преимуществами данного метода являются возможность применения в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*; высокая специфичность и аналитическая и диагностическая чувствительность; получение результатов в максимально короткие сроки (минуты); высокая производительность, простота выполнения и доступность [E. Cordero, 2018]. На сегодняшний день эффект комбинационного рассеяния света широко применяется в различных направлениях медицины, таких как онкология, акушерство и гинекология, хирургия, иммунология и др. [Юденфренд С. 1965; Александров М.Т., 2008; Bhat S., Patil A., 2012; Bergholt, M. S., Zheng, W. et al., 2013].

Однако, применение медицинской РФС-технологии в оториноларингологии представлено в единичных работах и отражает экспериментальные данные [E.Widjaja, 2005].

В связи с вышеизложенным, актуальность исследования, а именно изучение возможности применения раман-флюоресцентной спектроскопии в диагностике воспалительных заболеваний глотки, не вызывает сомнений.

Целью нашего исследования явилось обоснование возможности, диапазона и эффективности применения метода раман-флюоресцентной спектроскопии в диагностике воспалительных заболеваний глотки.

В соответствии с целью были сформулированы задачи исследования:

1. определить характеристики флюоресцентных и рамановских спектров тканей глотки здоровых добровольцев и лиц, страдающих ВЗГ; изучить их диагностическую информативность;
2. изучить возможность и диапазон применения метода раман-флюоресцентной спектроскопии (флюоресцентной и рамановской составляющих) в диагностике воспалительных заболеваний глотки;
3. оценить чувствительность и специфичность метода раман-флюоресцентной спектроскопии при воспалительных заболеваниях глотки;

4. разработать алгоритм диагностики воспалительных заболеваний глотки с использованием раман- флюоресцентных медицинских технологий.

Научная новизна

- 1) Впервые получены и изучены флюоресцентные и рамановские спектры у здоровых лиц и у пациентов с хроническим тонзиллитом и хроническим фарингитом;
- 2) Впервые проведена оценка информативности флюоресцентных и рамановских спектров тканей глотки при хроническом тонзиллите и хроническом фарингите;
- 3) Впервые изучены возможность, диапазон и эффективность применения раман-флюоресцентных медицинских технологий (РФМТ) в диагностике воспалительных заболеваний глотки.

Практическая значимость работы

Разработан метод экспресс-диагностики хронического тонзиллита и хронического фарингита с использованием раман-флюоресцентной спектрометрии, позволяющий неинвазивно, в экспресс-режиме, с высокой чувствительностью и специфичностью проводить исследование характеристик тканей глотки в норме и при воспалительном процессе.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Метод раман-флюоресцентной спектрометрии (флюоресцентной и рамановской составляющих) является диагностически значимым при хроническом фарингите и хроническом тонзиллите;
2. метод раман-флюоресцентной спектрометрии информативен в дифференциации интактной ткани и ткани, вовлеченной в патологический процесс при воспалительных заболеваниях глотки;

3. метод раман-флюоресцентной спектроскопии обладает высокой чувствительностью и специфичностью при хронических воспалительных заболеваниях глотки;
4. разработанный алгоритм диагностики воспалительных заболеваний глотки на основе раман-флюоресцентной спектроскопии позволяет неинвазивно, с высокой чувствительностью и специфичностью проводить экспресс-индикацию фарингеального патологического процесса.

Реализация и использование метода

Метод раман-флюоресцентной диагностики используется в учебном процессе кафедры болезней уха, горла и носа ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Апробация научных результатов

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на

-V Петербургском форуме оториноларингологов России с международным участием; г. Санкт-Петербург, 21-23 сентября 2016 г.;

-Всероссийском форуме с международным участием «Междисциплинарный подход к лечению заболеваний головы и шеи», г. Москва, 15-16 декабря 2016;

-международной научной конференции «ECONOS-2017», г. Йена (Германия); 3-5 апреля 2017;

-международной научной конференции «ESOF-15», г. Дрезден (Германия), 17-19 июля 2017;

-XVI Российском конгрессе оториноларингологов «Наука и практика в оториноларингологии», г. Москва, 14-15 ноября 2017;

-научно-практической конференции «Современные проблемы оториноларингологии», г. Рязань, 16-17 ноября, 2017;

-Юбилейной научно-практической конференции «Актуальные вопросы оториноларингологии, посвященной 80-летию кафедры оториноларингологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова; г. Москва, 4 апреля 2018;

-VI Международном конгрессе по заболеваниям органов головы и шеи, г. Москва, 17-19 мая 2018;

-XVI Московской научно-практической конференции «Оториноларингология: традиции и современность» («Фармакологические и физические методы лечения в оториноларингологии»), посвященной 100-летию со дня рождения профессора Н. С. Благовещенской, г. Москва, 30-31 мая 2018;

-научно-практической конференции оториноларингологов ЦФО «Современные проблемы оториноларингологии»; г. Ярославль, 23-24 октября 2018.

Личный вклад автора

Автором был подготовлен обзор данных отечественных и зарубежных источников литературы по теме исследования, сформулированы цель и задачи исследования. Научные результаты, приведенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно на базе клиники болезней уха, горла и носа Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. Автору принадлежит ведущая роль в организации исследования, разработке алгоритма экспресс-диагностики воспалительных заболеваний глотки с использованием раман-флюоресцентных медицинских технологий; анализе и обобщении полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует шифру специальности 14. 01. 03 Болезни уха, горла и носа. Болезни уха, горла и носа (Оториноларингология, ЛОР) -область науки, занимающаяся методами профилактики, диагностики, терапевтического,

хирургического лечения заболеваний уха, горла и носа. Совершенствование методов ранней диагностики, профилактики и лечения ЛОР-заболеваний будет способствовать сохранению здоровья населения, сокращению сроков временной нетрудоспособности и восстановлению трудоспособности. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, а именно пункту 2 паспорта специальности «Болезни уха, горла и носа» - разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики ЛОР-заболеваний.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 2 глав исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, иллюстрирована 51 рисунком и содержит 19 таблиц. Библиографический указатель литературы содержит 302 источника, из них- 161 отечественный и 141- иностранный. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 6 в журналах, рецензируемых ВАК, 1- в базе данных Web of Science.

Публикации

1. Тимурзиева А. Б., Никифорова Г. Н., Александров М. Т. Оценка основных стадий патогенеза воспалительных заболеваний глотки с применением метода лазерно-конверсионной диагностики // V Петербургский форум оториноларингологов России, IV Всероссийский конгресс по слуховой имплантации с международным участием: сб. науч. докл. –С-П., 2016. - С. 228-229.
2. Тимурзиева А. Б., Никифорова Г. Н., Свистушкин В. М., Александров М. Т. Опыт применения лазерно-конверсионной диагностики при хроническом тонзиллите // Head and Neck. - 2017.- №2- С.16-20.
3. Timurzieva A. B., Aleksandrov M. T., Nikiforova G. N., Svistushkin V. M. Raman technologies in ENT-diagnostics // ECOF-15.- 2017.- p 75.

4. Timurzieva A. B., Aleksandrov M. T., Nikiforova G. N., Svistushkin V. M. Laser fluorescence method in diagnostics of chronic tonsillitis // ECONOS.-2017.-p.37.
5. Тимурзиева А. Б., Никифорова Г. Н., Свистушкин В. М., Александров М. Т. Перспективы использования раман-флюоресцентных медицинских технологий в диагностике заболеваний глотки // VI Международный конгресс по заболеваниям органов головы и шеи: сб. тезисов. -М.- 2018.- С.87
6. Тимурзиева А. Б., Никифорова Г. Н., Свистушкин В. М., Александров М. Т. Возможности и перспективы применения раман-флюоресцентных медицинских технологий в диагностике воспалительных заболеваний глотки // Юбилейная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы оториноларингологии»: сб. науч. докл.-М. - 2018.-С. 6
7. Тимурзиева А. Б., Никифорова Г. Н., Свистушкин В. М., Кукушкин В. И. Перспективы использования флюоресцентных медицинских технологий в диагностике воспалительных заболеваний в оториноларингологии // Медицинский алфавит. Современная поликлиника. -2018.-№ 21:2.-с. 41-45.
8. Тимурзиева А. Б., Кукушкин В. И., Артемьев Д. Н., Никифорова Г. Н., Свистушкин В. М., Чекуреева Л. В. Использование раман-флюоресцентной спектроскопии в диагностике воспалительных изменений в глотке при хроническом тонзиллите // Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratoriae.-2018.-24:3.- с. 30-39
9. Гергиев В. Ф., Свистушкин В. М., Никифорова Г. Н., Тимурзиева А. Б. Острые инфекционно-воспалительные заболевания глотки: некоторые аспекты диагностики и возможности медикаментозной коррекции // Медицинский Совет. -2018.- № 8.- с.20-23.
10. Тимурзиева А. Б., Никифорова Г. Н., Свистушкин В. М., Кукушкин В. И., Артемьев Д. Н. Возможности и перспективы использования раман-флюоресцентной спектроскопии в диагностике воспалительных и опухолевых заболеваний в глотки: данные обзора литературы и собственных исследований// Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratoriae.-2018.-24:4.- с. 49-61.

11. Тимурзиева А. Б., Герасимов А. Н., Шпитонков М. И. Оценка некоторых информативных параметров флюоресцентной диагностики воспалительных изменений в глотке при хроническом тонзиллите // Исследование операций (модели, системы, решения). -2018.- С. 58-66.
12. Timurzieva A. B., Aleksandrov M. T. Nikiforova G. N. Borisov V. V. Prospects of use of fluorescent medical technologies in diagnostics of inflammatory diseases in Otorhinolaryngology // Indo American journal of Pharmaceutical sciences.-2019.-06 (03), 6431-6437.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Возможности использования раман-флюоресцентных медицинских технологий в диагностике и перспективы применения метода при заболеваниях глотки

1.1 Воспалительные заболевания глотки: эпидемиология и вопросы терминологии

Воспалительные заболевания глотки (ВЗГ) широко распространены в человеческой популяции и являются одной из самых частых причин обращаемости как взрослых пациентов, так и детей к оториноларингологам и врачам других специальностей [6; 7-9; 12; 13; 15; 19; 20; 27; 36; 41; 46; 52; 53; 54; 56, 60; 61; 64; 65- 67; 77; 83; 92; 103-105; 107; 154; 156; 161; 231].

Точные цифры о распространённости воспалительной патологии глотки отсутствуют, так как нет единой терминологии: в отечественной литературе рассматриваются вопросы острого и хронического фарингита, острого и хронического тонзиллита, ангины, острого тонзиллофарингита [14; 45; 46; 60; 64; 79; 84; 98; 115; 117; 151; 206; 265]. В последние годы рекомендовано использовать термин «тонзиллофарингит», так как редко встречается изолированное поражение какой-либо одной структуры глотки [52; 57; 60; 69; 114]. Зарубежные авторы выделяют острый, хронический и рецидивирующий тонзиллофарингит [60; 161; 167; 289]. Также необходимо учитывать, что многие пациенты с патологией глотки не обращаются за медицинской помощью, отсутствует обязательная регистрация данных заболеваний, нет чётких диагностических критериев некоторых нозологических форм [92]. Нередко хронический тонзиллит и хронический фарингит выявляются только при проведении профилактических осмотров.

Согласно имеющимся в литературе эпидемиологическим исследованиям, ежегодно около 16% взрослых и 41% детей переносят острый тонзиллофарингит (ОТФ) [180; 252]. Боль в глотке является одной из наиболее частых причин

обращения пациентов с данной патологией к врачу [13; 57; 77; 118; 141; 281; 296].

Согласно данным литературы, до 70% амбулаторных пациентов, обращающихся к ЛОР-врачу, страдают хроническим фарингитом. Заболеваемость ХФ среди населения нашей страны составляет в среднем около 78% и неуклонно возрастает [21; 36; 51; 99; 100; 117; 187; 197; 235; 249; 259; 288]. Хронический фарингит относится к одним из наиболее распространенных хронических процессов верхних отделов дыхательных путей [28; 99].

На развитие хронического фарингита оказывают влияние такие факторы, как инфекционные возбудители; патология носа и околоносовых пазух; локальный статус лимфоидно-глоточного кольца; заболевания желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, нижних отделов респираторного тракта, почек; негативное влияние окружающей среды и др. [36; 43; 59; 93; 99; 100; 117; 217]. В результате длительного воздействия различных повреждающих агентов в тканях глотки происходит нарушение метаболизма, структуры слизистой оболочки глотки, что способствует развитию хронического воспаления [6; 34]. Хронический фарингит развивается либо как самостоятельное заболевание, либо как одно из проявлений хронической соматической патологии [34; 36; 62; 99]. В основе классификации хронического фарингита лежат патоморфологические изменения, в связи с чем в глотке отечественными авторами наиболее часто рассматриваются катаральный, атрофический и гипертрофический патологические процессы [36; 51].

Одну из ведущих позиций в структуре хронических ЛОР-заболеваний, особенно у детей и лиц молодого возраста, занимает хронический тонзиллит [7, 18; 53; 54; 103; 140; 194; 293]. По данным некоторых источников, хронический тонзиллит имеется у 10–63% детей и подростков и у около 37% взрослых, и составляет 23,7% всех воспалительных заболеваний глотки [65; 67; 69; 96; 103-109]. Ежегодно распространенность хронического тонзиллита нарастает [64; 65; 67; 82; 103; 111; 115]. Общеизвестно, что значительное число различных

патологических процессов в организме человека, в той или иной степени сопряжены с хроническим тонзиллитом [54; 74; 100; 109]. На фоне тонзиллярной патологии могут возникать острая ревматическая лихорадка, ревматическая болезнь сердца, полиартрит, гломерулонефрит, паратонзиллярный абсцесс [53; 100; 108; 135]. Доказано негативное влияние ХТ на возникновение и течение таких заболеваний, как псориаз, PANDAS- (Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal infections- «детские аутоиммунные нервно-психические расстройства, ассоциированные со стрептококковыми инфекциями»), PPP-синдром (Pustulosis palmaris et plantaris- ладонно-подошвенный пустулез) и PAO (pustulotic arthro-osteitis- пустулезный артроостеит) и ряд других [153; 203; 205; 248; 281, 291; 292].

Как известно, хронический тонзиллит (ХТ)- это инфекционно-воспалительное заболевание, которое может сопровождаться периодическими эпизодами обострения в виде ангин и характеризуется наличием локального очага хронической инфекции в небных миндалинах [27; 74; 82; 103-109]. В России наиболее распространены две классификации хронического тонзиллита-Б.С. Преображенского-В.Т. Пальчуна и И.Б. Солдатова [107; 109]. Первая предполагает наличие трёх форм ХТ- простой, токсико-аллергической первой и токсико-аллергической второй; вторая- компенсированной и декомпенсированной форм. Простая форма, согласно классификации Б.С. Преображенского-В.Т. Пальчуна, характеризуется только местными признаками- наличием казеозного отделяемого в лакунах небных миндалин; признаком Гизе-стойкой гиперемией краев передних дужек; признаком Зака- отечностью краев верхних отделов небных дужек; признаком Преображенского- инфильтрацией и гиперплазией краев передних дужек; иногда-сращением и спайками миндалин с дужками и треугольной складкой; наличием ангин стрептококковой этиологии в анамнезе- 1 раз в несколько лет. При токсико-аллергической форме I степени хронического тонзиллита (ТАФ I), помимо местных изменений, отмечаются периодически возникающая субфебрильная температура тела, слабость, общее

недомогание, утомляемость, пониженная работоспособность; преходящие изменения в суставах и сердце в виде боли, дискомфорта, нарушения сердечной деятельности; а также в лабораторных показателях; эпизоды ангин в анамнезе не чаще 1 раза в год. При токсико-аллергической форме II степени хронического тонзиллита (ТАФ II) отмечаются местные изменения и выраженные токсико-аллергические реакции. При данной форме тонзиллита могут дополнительно к проявлениям ХТ ТАФ I отмечаться более выраженное нарушение сердечной деятельности; длительная субфебрильная температура тела; стойкие изменения лабораторных показателей; более частые и выраженные эпизоды общего недомогания; развитие сопряженных заболеваний, имеющих единые с хроническим тонзиллитом этиологические и патогенетические факторы (группа ревматических заболеваний, патология мочевыделительной, сердечно-сосудистой и др. систем); ангины более 1 раза в год; наличие в анамнезе осложнений в результате ангин (местные и общие осложнения в виде развития паратонзиллярного абсцесса, флегмоны шеи, абсцессов глотки, медиастинита, инфекционно-токсического шока, сепсиса, острой ревматической лихорадки, гломерулонефрита, артрита и др.) [54; 56; 74; 100; 108; 132; 299].

Компенсированная форма ХТ (ХТ КФ) по Солдатову И. Б. характеризуется местными признаками, перечисленными в предыдущем абзаце; эпизодами ангин не чаще 1 раза в несколько лет. При декомпенсированной форме (ХТ ДФ), помимо местных проявлений, у пациента наблюдаются ежегодные ангины; регионарные и системные осложнения (паратонзиллит, паратонзиллярный абсцесс, отит, риносинусит); метатонзиллярные заболевания (эндокардиты, полиартрит, гломерулонефрит и др.) [53; 135, 271]. В некоторых клинических случаях на сегодняшний день достаточно сложно диагностировать ту или иную форму хронического тонзиллита, а также подтвердить или исключить наличие простой или компенсированной формы ХТ у пациента.

Этиопатогенетическая неоднородность, значительная распространенность воспалительных заболеваний глотки, сложности дифференциальной

диагностики, высокий риск развития осложнений и значимые экономические затраты при данной патологии обуславливают актуальность проблемы вышеуказанной патологии в клинической медицине в России и за рубежом [19; 103-109; 131; 194; 198; 245].

1.2 Этиология и патогенез воспалительных заболеваний глотки

Известно, что микробный фактор является значимым в этиологии воспалительных заболеваний глотки [42; 47; 49; 55; 63; 72; 96; 102; 113; 145; 268]. Микробиотоп глотки в норме характеризуется наличием сапрофитных и условно-патогенных аэробных и анаэробных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [61; 110]. В глотке различают индигенную (постоянную) и транзиторную микрофлору [107]. В частности, нормальную микрофлору полости рта представляют аэробные и анаэробные кокковые формы, непатогенные коринебактерии, спирохеты, молочнокислые бактерии, бактероиды и др. В качестве индигенной микрофлоры слизистой оболочки ротоглотки можно отметить α - и γ -гемолитические стрептококки; их концентрация составляет не более 10^2 - 10^3 КОЕ/мм². Многие из них относятся к анаэробным микроорганизмам. Транзиторная микрофлора представлена коагулазонегативными негемолитическими стафилококками, нейссериями, грибами рода *Candida* и др., концентрация которых зависит от многих факторов окружающей среды [85-88; 143]. При возникновении дисбиоза ротоглотки при персистенции перечисленных возбудителей возникают гнойно-воспалительные заболевания [37; 58; 68]. Существуют некоторые различия микробиотопа глотки в зависимости от профессиональных, возрастных и некоторых других факторов в норме и при патологии [20; 81; 122]. Помимо нормальной микрофлоры состояние глотки поддерживается благодаря наличию секреторных антител, неспецифических защитных факторов слюны: лактоферрина, лизоцима, интерферонов и др. [116; 144]. Под действием различных неблагоприятных факторов микробиотоп глотки претерпевает выраженные изменения, что

способствует повышению восприимчивости к воспалительным заболеваниям таких пациентов [38].

При остром, хроническом, а также рецидивирующем воспалительном заболевании глотки может встречаться одна и та же микрофлора, однако степень обсеменённости будет различной [55; 66; 107; 113; 198]. На течение воспалительного процесса в глотке оказывают влияние множество факторов: характер микрофлоры, состояние макроорганизма и непосредственно слизистой оболочки- ее иннервации, кровообращения, строения, влажности [89; 107]. При снижении реактивности организма, нарушении физиологического состояния полости рта и глотки происходит увеличение концентрации условно-патогенных микробов в ткани и интенсивности их жизнедеятельности, в результате чего может возникать патологический процесс [37; 47; 58; 68; 148]. Воспалительный процесс в глотке может возникать не только при активизации условно-патогенной микрофлоры, но и в результате инвазии патогенов [68]. Самыми частыми возбудителями острого тонзиллофарингита являются вирусы (около 70% случаев) [45; 57; 78; 151]. В качестве этиотропного фактора острого воспалительного процесса в глотке могут выступать различные, преимущественно, респираторные вирусы, такие как респираторный синцитиальный вирус, аденовирус, вирус Эпштейн-Барра, вирус простого герпеса, энтеровирус, цитомегаловирус, вирусы гриппа и парагриппа и другие [11; 29; 69; 171; 216]. При ВЗГ также могут встречаться стрептококки групп А, С и G [13; 14; 65; 69; 114; 133; 157; 163; 180]. Еще более редкие бактериальные возбудители острых тонзиллитов – спирохеты или симбиоз нескольких возбудителей (ангина Симановского-Плаута-Венсана) [79]. Кроме того, острый тонзиллит- один из основных симптомов многих инфекционных заболеваний- ряда детских инфекций, дифтерии, инфекционного мононуклеоза [57].

Если организм не справляется с вирусной инвазией, в глотке активируется условно-патогенная микрофлора или происходит инфицирование патогенными возбудителями [103]. Наиболее значимым бактериальным возбудителем острого тонзиллофарингита является БГСА- β -гемолитический стрептококк группы А,

который обуславливает 5-15% случаев острых тонзиллофарингитов во взрослой популяции и 20-30% у детей, и выявляется у 30-60% больных ХТ. Острый стрептококковый тонзиллофарингит развивается, как правило, без предшествующего вирусного процесса [12; 15; 20; 22; 38; 42; 52; 65; 66; 73; 78; 79; 85; 94; 95; 103-109; 133; 157; 217; 254]. У пациентов с воспалительной патологией глотки нередко выявляются ассоциации β -гемолитического стрептококка группы А с золотистым стафилококком, гемофильной палочкой, грибковой микрофлорой, вирусами (вирус Эпштейна-Барр, аденовирусы, вирус Коксаки, вирус герпеса и др.), микоплазмами, хламидиями [11; 42; 49; 63; 88; 97; 126; 134; 173; 217]. Согласно некоторым авторам, из 42 -110 таксономических видов микроорганизмов, встречающихся в микробиоте глотки, отмечаются также и *Haemophilus influenzae*, *Neisseria species*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*. Такие бактерии, как *Fusobacterium necrophorum*, *Streptococcus intermedius*, *Prevotella melaninogenica/histicola* встречаются чаще при рецидивирующем тонзиллите, в то время как при остром отмечаются *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* [212].

Определенную роль в развитии воспалительных заболеваний глотки играет атипичная флора - *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae* и др. [103-109; 124; 139; 251; 289]. Реже этиотропным фактором острых воспалительных заболеваний глотки являются дрожжеподобные грибы рода *Candida*, вызывающие заболевание у 93-97% больных фарингомикозом, среди которых наиболее распространен возбудитель *Candida albicans*. В ряде случаев в глотке на фоне воспаления выявляются плесневые грибы рода *Aspergillus* [55; 70-72; 80; 103; 117; 137].

Важную роль в развитии фарингеальных патологических процессов играют биоплёнки [39; 101; 149; 162]. Биопленки - микробные сообщества, которые образованы клетками, прикрепленными друг к другу и заключенными в матрикс (синтезированный ими полимерный каркас). Резистентность возбудителей в

составе биопленки возрастает во много раз по сравнению с планктонными формами [33; 128; 181]. Рецидивирующие эпизоды ангин, зачастую, связаны с образованием биопленок [162]. Некоторые авторы выявили биопленки в 85% образцов удаленных в результате хронических ВЗГ миндалин. Установлено, что биопленки в криптах миндалин способны создавать как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, а среди последних особенно часто - *Haemophilus influenzae* [165; 193]. В качестве этиотропного фактора при обострении хронических воспалительных заболеваний глотки, в большинстве случаев, выявляются те же патогены, что и при острых процессах.

Хронические воспалительные заболевания глотки, как правило, характеризуются полиэтиологичностью [88; 169]. В частности, хронический фарингит возникает в результате действия комплекса различных факторов. Данная патология может формироваться вследствие рецидивирующих острых воспалительных процессов в слизистой оболочке глотки или изначально носить хронический характер. Хронический фарингит (ХФ) часто возникает как вторичное заболевание при распространении воспалительного процесса на слизистую оболочку глотки из полости носа и околоносовых пазух, полости рта, лимфоидных структур глотки и т.д. Среди факторов, влияющих на развитие хронического воспаления в глотке различают экзогенные, действующие непосредственно на слизистую оболочку глотки (различные профессиональные вредности, особенности климатических условий и т.д.) и эндогенные, связанные с патологией внутренних органов. К развитию хронического фарингита предрасполагают некоторые заболевания желудочно-кишечного тракта, патология сердечно-сосудистой системы, женской половой сферы, шейный остеохондроз [36; 107].

Как известно, небные миндалины – основной функциональный элемент лимфоэпителиального кольца Вальдейра-Пирогова, - являются важным органом иммунной системы организма; находятся на стыке дыхательного и пищеварительного трактов, и выполняют роль «специфического иммунного

барьера» [24-26; 83; 95; 103-109; 128]. Лимфоидная ткань глотки, в том числе, и небные миндалины, формируют иммунный барьер слизистой оболочки. Развитие воспаления в тканях иммунорегулирующего отдела глотки сопровождается нарушением иммунологических процессов на клеточно-молекулярном уровне [25]. В тканях небных миндалин происходит активный фагоцитоз чужеродных агентов, также в специфической и неспецифической иммунной защите организма играют роль сигнальные рецепторы, дефенсины, лактоферрин, трансферрин, элементы системы комплемента, цитокины и др. [24].

В патогенезе хронического тонзиллита важную роль играет аллергически–гиперергическая реакция [160], в ответ на инвазию антигена в ткани после локального нарушения иммунного статуса в патологическом очаге [54], что в дальнейшем может приводить к осложнениям, таким как острый гломерулонефрит, системный васкулит, эндокардит и др. [103-109]. В природе данной реакции заложены инфекционно-аллергический механизм при внедрении в организм БГСА [87]. Инфекционно-аллергический процесс является многофакторным в отношении задействованных «органов-мишеней» и ведущим в патогенезе хронического тонзиллита [65; 67; 83-88, 95; 103-109; 153].

Инвазия возбудителя в ткани глотки при остром и хроническом процессах обуславливает функциональные и структурные изменения органа [5; 17; 65]. Гистологическое и цитологическое исследование тканей глотки при воспалительном процессе выявляют характерные особенности, в том числе, диффузную инфильтрацию лимфоцитами в поверхностном эпителии. Подобные изменения присутствуют в 97, 93% случаев при хроническом тонзиллите [168; 237; 278]. Данный факт можно использовать в спектральных методах диагностики.

В ткани небных миндалин при хроническом воспалении помимо продуктивного воспаления отмечается замещение паренхимы соединительной тканью за счет клеточной деятельности фибробластов, происходит образование инкапсулированных очагов некроза, а также вовлечение в патологический

процесс регионарных лимфатических узлов [134]. Затем мимикрирующие антигены микробного агента индуцируют иммунопатологические аутоиммунные реакции (гуморальные и клеточные) [100].

Важным аспектом в патогенезе ВЗГ является тип метаболизма и преобладание аэробной или анаэробной микрофлоры в патологическом очаге [3]. Как известно, аэробные микробы вырабатывают порфирины, а анаэробы используют их в качестве факторов роста. По данным литературы, при ВЗГ чаще всего встречается смешанный тип микрофлоры (аэробно-анаэробный). Таким образом, для диагностики ВЗГ в ряде случаев необходимо анализировать качественный и количественный состав микрофлоры и метаболические процессы в патологическом очаге в режиме реального времени [1].

При хроническом тонзиллите возникают не только местные изменения, но и происходит токсическое влияние антигенов на ткани организма, что приводит к множеству сопряженных заболеваний, а именно к заболеваниям сердца, почек, суставов, сосудов и др. [41; 54; 140]. Степень декомпенсации при хроническом тонзиллите может быть выражена в различной степени, немаловажную роль играет наследственный фактор, в частности, отмечена ассоциация С-аллеля полиморфизма (T280M) CX3CR1 с возможностью возникновения ХТ [48; 142; 152; 169].

Таким образом, в этиологии и патогенезе хронического тонзиллита необходимо учитывать многие аспекты, как внешние, так и внутренние, что и обуславливает столь сложные механизмы возникновения данного заболевания.

1.3 Проблемы диагностики воспалительных заболеваний глотки; характеристика существующих методов

Вопросы диагностики воспалительных заболеваний ЛОР-органов являются важной проблемой в оториноларингологии [103-109; 120; 121; 206].

Современная диагностика должна быть комплексной: точной, высокочувствительной, специфичной, экспрессной, позволяющей оценивать патологический процесс на всех этапах его течения [90; 91]. На сегодняшний день в клинической практике используется достаточно большой спектр диагностических мероприятий с целью диагностики заболеваний глотки: объективный осмотр, бактериологический, бактериоскопический, цитологический, гистологический и некоторые другие методы [5; 15; 17; 18; 31; 78; 89; 90; 91; 102; 118; 131; 176; 192; 211; 214; 215; 224; 234; 246; 252; 267; 274; 278; 294].

Жалобы и анамнестические сведения о повторных эпизодах острого воспалительного процесса в глотке, токсико-аллергических проявлениях, сопряженных и сопутствующих заболеваниях; данные объективного осмотра являются одними из основных составляющих диагностического поиска [84; 103-109; 120; 121; 140].

При оториноларингологическом осмотре у пациентов с патологией глотки могут быть выявлены местные признаки хронического тонзиллита, описанные в разделе 1. 1 [103-109]. Помимо местного воспаления, возникающего при заболеваниях глотки, важен вопрос системной реакции у пациентов с БГСА-этиологией [17; 30; 65]: повышение таких показателей, как антистрептолизин-О (АСЛО), С-реактивный белок (СРБ), ревматоидный фактор (РФ) свидетельствуют об общей реакции организма в ответ на воспаление в глотке [17; 60]. Результаты исследования локального статуса и системных изменений демонстрируют корреляцию между степенью тяжести патологического процесса и генерализованными проявлениями патологического процесса при ангине и ХТ [63-74; 83].

Оценка микрофлоры глотки при воспалительных заболеваниях глотки является важной составляющей диагностики с целью назначения рационального лечения и профилактики осложнений [19; 20; 129; 263]. На сегодняшний день одним из высокочувствительных (при соблюдении забора и транспортировки материала) является микробиологическое исследование отделяемого с

поверхности структур глотки [31; 102; 234]. При правильном использовании метода, чувствительность микробиологического исследования приближается к 90%. Однако рутинный бактериологический метод диагностики, основанный на идентификации чистой культуры бактерий, при всей его достоверности и информативности весьма трудоемок и экономически затратен, а также длителен [31; 50]. Несмотря на значительное количество микроорганизмов, обнаруживаемых при бактериологическом исследовании, полной картины микробного пейзажа глотки при ВЗГ в момент проведения диагностики мы получить не можем, так как выделение трудно культивируемых микроорганизмов- анаэробов, внутриклеточных паразитов, некультивируемых форм микробов, а также идентификация микроорганизмов в биоплёнках, представляет собой отдельную сложную задачу [125-128]. Кроме того, возможна неактуальность результатов исследования к моменту их получения, так как микрофлора глотки постоянно меняется, претерпевает мутации, приобретает антибиотикорезистентность и др. [128; 189].

Активно используемые на сегодняшний день в России экспресс-методы диагностики стрептококкового антигена, по данным некоторых исследователей [15; 62; 102; 139; 191; 195], являются высокоспецифичными и информативными, однако они не позволяют оценить наличие других значимых возбудителей, а также физиологические и метаболические, морфологические изменения, происходящие в тканях при воспалительных заболеваниях глотки.

Наиболее достоверным при постановке окончательного диагноза (при работе *in vitro*) является на сегодняшний день патогистологический метод диагностики [182]. Патогистологический метод при диагностике хронического тонзиллита в обычной ситуации не проводится, так как биопсия тканей является инвазивной манипуляцией, а после удаления патологического очага (небные миндалины), вопрос своевременной диагностики и профилактики хронического тонзиллита становится неактуальным. При хроническом фарингите гистологическое исследование тканей не показано в связи с инвазивностью и отсутствием

необходимости результатов данного исследования для назначения лечения и профилактики.

Так как в каждый конкретный промежуток времени качественные и количественные характеристики микробиотопа тканей глотки претерпевают изменения, необходимы такие методы, которые позволяют регистрировать состояние патологического очага в «режиме реального времени».

Таким образом, необходимость разработки и внедрения неинвазивных, доступных, быстрых, высокочувствительных и высокоспецифичных методов диагностики ВЗГ не вызывает сомнений [78]. Своевременная диагностика заболеваний глотки помогает выбрать рациональную, этиопатогенетически обоснованную терапию пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями глотки.

Для решения вышеперечисленных вопросов в настоящее время в клиническую практику активно внедряются оптические методы диагностики. Особый интерес представляет изучение возможности и эффективности применения экспресс- метода раман-флюоресцентной спектроскопии для диагностики заболеваний ЛОР-органов воспалительной природы.

1. 4 Метод лазерно-флюоресцентной диагностики в сочетании с рамановским излучением (раман-флюоресцентные медицинские технологии) в клинической медицине

1.4.1 Принципы и физические основы метода раман-флюоресцентной спектроскопии

Во многих направлениях медицины на различных этапах ее развития использовались оптические методы. Они разрабатывались как российскими, так и зарубежными учеными с целью диагностики [1; 2; 10; 36; 44; 119; 123; 150; 164; 171; 172; 174; 178; 242; 257; 283; 287; 297; 302].

Оптическая когерентная томография (ОКТ) – метод, основанный на получении изображений структуры биотканей с разрешением 15 мкм с

использованием в качестве зондирующего излучения света ближнего инфракрасного диапазона [155]. В литературе описывается, что глубина проникновения оптического излучения с использованием метода ОКТ составляет около 2–3 мм, а также тот факт, что инфракрасное излучение не проникает через кровь; таким образом отмечается неспособность ремоделирования всей толщины стенок сосудов в результате выраженного затухания сигнала на эритроцитах [32; 230; 261; 264; 300].

Также в клинической практике используют метод («Narrow-band imaging»)-систему «воспроизведения изображения в узком диапазоне спектра» или узкоспектральную эндоскопию, которая позволяет визуализировать изменения сосудистой структуры слизистой оболочки при диагностике новообразований. Основными недостатками метода является то, что его, чаще всего, используют при диагностике опухолей; при диагностике других заболеваний возникают определенные сложности, в частности, при отсутствии выраженной васкуляризации. Кроме того, зачастую необходимы определенные красители, что удлиняет время исследования; существует некоторая зависимость от опыта исследователя и др. [123].

Учитывая вышесказанное, среди прочих оптических методов диагностики, следует отдельно остановиться на методе раман-флюоресцентной спектроскопии, как на одном из наиболее высокочувствительных и быстрых [243; 256; 295]. Метод раман-флюоресцентной диагностики позволяет проводить исследование не только с высокой чувствительностью, но и специфичностью [277].

Метод раман-флюоресцентной спектроскопии основан на эффекте комбинационного рассеяния света, или Рамановском эффекте [146; 199]. Данный эффект был открыт в начале XX века независимо российскими исследователями Г. Ландсбергом и Л. Мандельштамом и индийским физиком Ч. Раманом [146]. Рамановская спектрометрия основана на эффекте рассеяния света и несет информацию о колебаниях молекул, получаемых при помощи излучения

видимой части спектра в ближнем инфракрасном диапазоне, вышеупомянутую информацию о состоянии тканей можно получить при помощи лазеров, работающих в данном диапазоне длин волн [175; 243].

Известно, что при облучении ткани светом определенной длины волны на молекулах вещества начинается процесс неупругого рассеяния оптического излучения, сопровождающийся заметным изменением частоты излучения. Наблюдаемое явление называют эффектом комбинационного рассеяния или эффектом Рамана [213], которое регистрируется в виде набора спектральных линий, отсутствующих в спектре первичного (возбуждающего) света [223]. Анализ такого спектра позволяет сделать вывод о структуре и идентичности образца в зависимости от значения частоты, интенсивности, формы, числа и расположения линий [204]. Поскольку не существует двух молекул с одинаковыми спектральными характеристиками, можно говорить об уникальном рамановском «отпечатке», который позволяет определять разнообразные вещества по спектрам неупругого (рамановского) рассеяния света [146]. Важными особенностями этого метода является возможность работы с нативным материалом и интракорпорально (непосредственно в тканях организма) [273], высокая специфичность и чувствительность (как аналитическая, так и диагностическая) [275], получение результатов в максимально короткие сроки (секунды) и их воспроизводимость, высокая производительность, простота выполнения и доступность. Информативной при использовании метода является, в том числе, и флюоресцентная составляющая [1; 44].

Лазерно-флюоресцентная составляющая метода (ЛФС) основана на регистрации сигнала флюоресценции с поверхности изучаемого биологического объекта при возбуждении излучением с определенной длиной волны. При инициации патологического процесса в организме в клетках может возрастать количество природных (эндогенных) флюорофоров. Данный эффект используется в медицине при изучении лазерно-флюоресцентных медицинских технологий [35; 159]. В частности, при воспалительном процессе, при

повышении кислотности среды в тканях увеличивается концентрация порфиринов, а также продуктов их обмена, что приводит к изменению рН и другим изменениям метаболического и морфометрического характера [35; 250; 266]. Одним из продуктов, необходимых для синтеза порфиринов, является сукцинил-КоА, который образуется при катаболизме белков, жиров и углеводов [136]. Спектроскопия комбинационного рассеяния основана на нелинейных эффектах увеличения скорости и пространственного разрешения рамановской спектроскопии, индуцированной когерентными волнами и колебаниями молекул, входящих в состав образца. Когерентная атистоксова рамановская спектроскопия имеет в своей основе т. н "лазерный насос" с определенной частотой для генерации когерентных колебаний молекул в исследуемом образце [174; 190; 269].

Эффект комбинационного рассеяния света широко применяется в различных направлениях медицины, таких как онкология, акушерство и гинекология, хирургия, иммунология и др. [1]. Некоторые авторы описывают возможности применения раман-флюоресцентных медицинских технологий в диагностике оториноларингологических воспалительных и опухолевых заболеваний [183; 184]. По данным литературы, спектроскопия комбинационного (рамановского) рассеяния света является одним из перспективных диагностических методов [1; 2].

Метод РФС основан как на регистрации собственной флюоресценции микроорганизмов, так и на рамановском эффекте. Феномен флюоресценции может быть использован в качестве метода диагностики, с учетом регистрации изменений, происходящих в тканях при увеличении или уменьшении количества порфиринов [44]. У каждого из флюорохромов имеется определенный диапазон длин волн, в котором спектрофотометрические данные, полученные от биообъекта, будут наиболее информативными (рис. 1).

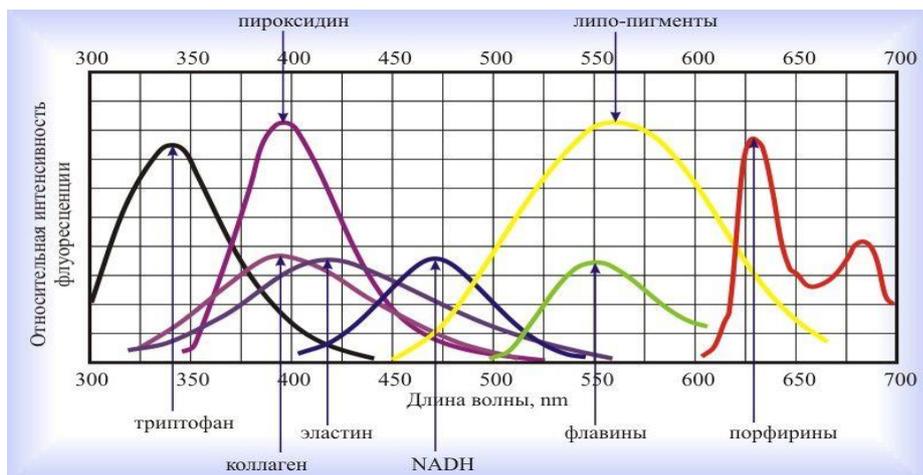


Рисунок 1. Характер распределения флуоресцентной эмиссии различных природных флуорохромов [119].

Одним из модификаций метода раман-флуоресцентной спектроскопии является метод SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy-поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия), суть которого заключается в использовании специальных металлических нанокристаллических подложек, позволяющих усилить слабый рамановский сигнал и способствующих появлению поверхностно-усиленного рамановского рассеяния. Данный эффект может быть применен в идентификации возбудителей воспалительных заболеваний глотки [75; 76].

Достаточно информативным методом является селективная рамановская микроспектрометрия. При селективном отборе информация о пространственных характеристиках образца, полученная с помощью альтернативной оптической методики измерения или оцененная в режиме реального времени при получении спектров, может быть использована для получения объективных данных относительно изучаемого образца, снизив более чем на два порядка количество получаемых спектров. Например, рамановская микроспектрометрия эффективно применяется после резекции обширного участка патологически измененной ткани, когда необходимо получить высокоспецифичные результаты характера изменения тканей на изучаемом участке (измерениям подвергаются довольно большие участки тканей: от 1 до 5 см) в экспресс-режиме [227-229; 232; 244].

Трансмиссионная рамановская спектроскопия представляет собой крайний вариант вышеописанной методики, когда происходит регистрация всех сигналов с противоположной стороны исследуемого образца. Такой анализ помогает получать сведения об исследуемом объекте на всей глубине. Существуют также комбинированные методы-повышенная пространственно-компенсированная спектроскопия комбинационного рассеяния, при помощи которых стало возможным анализировать практически любые составляющие образца, включая бисфосфонаты и глюкозу и другие химические вещества в составе живых биологических объектов [185].

Также существуют волоконно-оптические датчики различных комбинаций, что является идеальным воплощением метода рамановской спектроскопии для диагностики полых органов. Некоторые из них работают в широком диапазоне-2400-3800/см. Они позволяют исследовать биологический объект и получать наибольшее количество информации о нем за счет не только механических свойств, но и получения сигналов в большом диапазоне длин волн [226]. Все перечисленные методы широко используются в клинической практике.

Мультифокальные рамановские спектрометры, принцип действия которых основан на дифракционных оптических элементах или пространственных световых модуляторах, могут быть использованы для получения множественных спектров. Закрытые системы по типу оптоволоконных световодов позволяют получать серию спектральных параметров. Если используются рамановские спектрометры, работающие на одной длине волны, то скорость получения спектров может быть значительно увеличена при проведении рамановской микроскопии в белом свете: при помощи лазера освещается наибольшая часть исследуемого образца и возникающие сигналы рамановских линий трансформируются в изображения на CCD-носителях. Однако данный способ регистрации спектров может существенно перекрывать те комбинационные линии рамановских сигналов, позволяющих выявить небольшие различия в исследуемых образцах [275].

1.4.2. Использование метода РФС в клинической медицине

Раман-флюоресцентные медицинские технологии зарекомендовали себя, по данным литературы, как малоинвазивные, высокочувствительные, быстрые методы диагностики [183; 201; 202; 222; 276]. Метод лазерно-флюоресцентной диагностики (ЛФД) позволяет регистрировать все процессы, происходящие в биообъекте в данный конкретный промежуток времени. Оценить адекватность лечения *in vivo* - намного более сложная задача, выполняемая при соблюдении определенного алгоритма диагностики и оценки динамики проводимой терапии.

Лазерно-спектрофотометрические данные исследуемой ткани интерпретируются с использованием методов математического анализа, что позволяет получить объективные количественные параметры в реальном времени [1; 112].

Метод лазерно-флюоресцентной диагностики применялся неоднократно при идентификации аэробной и анаэробной микрофлоры, не только в фундаментальной, но и клинической медицине [184; 209]. В серии экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*, было доказано, что увеличение концентрации микроорганизмов приводит к повышению интенсивности флюоресценции, и наоборот [1; 2]. Результаты ранее проведенных исследований показали, что при анаэробном инфекционном процессе в ткани второй пик флюоресценции (на длине волны 700 нм) выше, чем первый, а при аэробном процессе выше-первый пик (на длине волны 665 нм). Кроме того, при увеличении концентрации микроорганизмов мощность флюоресценции усиливается (рис. 2, 3), и наоборот [1]. Отчетливо данная тенденция прослеживается при воздействии определенных антимикробных препаратов на возбудителей.

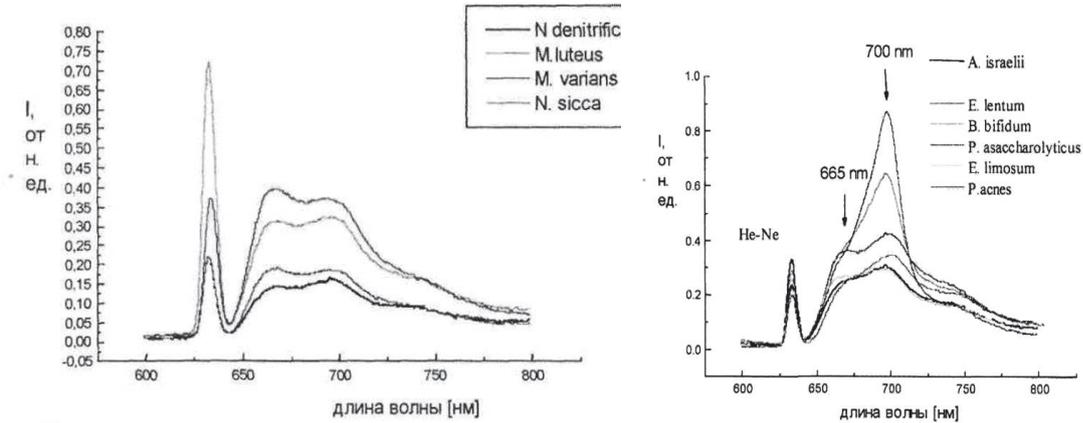


Рисунок 2. Спектры флюоресценции клеток анаэробных (справа) и аэробных бактерий (слева) [1].

Кроме того, существует определенная зависимость мощности сигнала флюоресценции от концентрации микроорганизмов в патологическом очаге, что, зачастую, еще более важно для клиницистов, чем определение вида возбудителя.

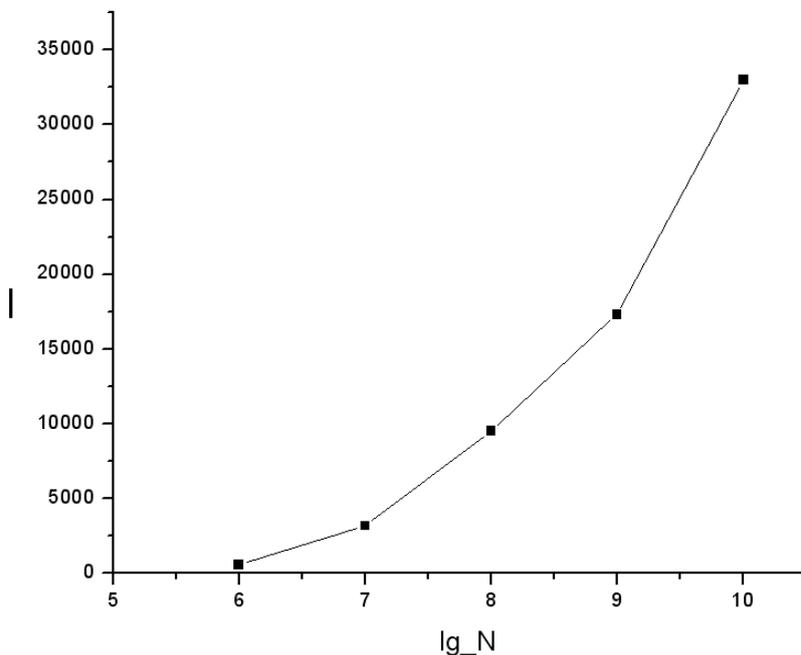


Рисунок 3. График зависимости интенсивности рамановского сигнала бактерий от их концентрации, где \lg_N = логарифм от числа бактерий 10^N (по оси абсцисс); по оси ординат - относительные единицы сигнала флюоресценции

На рисунке 3 представлены результаты, полученные при разведении концентрации микробов до эталона мутности 10^9 (число колоний в объеме 1 мл) и разбавлении с шагом в 10 раз до концентрации 10^6 . Представлена логарифмическая зависимость, при которой чем больше концентрации микроорганизмов, тем более выражен сигнал флюоресценции [1].

Усовершенствованные методы раман-флюоресцентной спектроскопии могут помочь в идентификации самых разнообразных видов возбудителей, однако большая часть таких методов тяжело осуществима на практике. Согласно некоторым авторам, существует метод определения бактерий, характеризующийся как высокой чувствительностью, так и высокой специфичностью. Данный эффект реализовался благодаря специфичности меченых антител и чувствительности раман-флюоресцентных технологий (РФТ) [184]. Представленное исследование демонстрирует возможность идентификации методом раман- флюоресцентной спектроскопии вида микроорганизма, что особенно важно в случае острого заболевания.

Лазерно-флюоресцентные медицинские технологии использовались ранее для определения эффективности антисептического и антимикробного препаратов *in vitro* [10]. Для повышения эффективности метода лазерно-флюоресцентной диагностики отечественными учеными был использован мирамистин. Мирамистин, как детергент, разрушает надмембранный слой и разрывает мембрану, что способствует повышению проницаемости для крупномолекулярных веществ, что способствует выходу порфиринов и большему свечению патологического биообъекта по сравнению с нормой.

Лазерно-флюоресцентный метод был апробирован в стоматологической практике для оценки состояния гигиены полости рта и твердых тканей зуба при лечении кариеса [1; 119], а также для проведения онлайн-мониторинга эффективности механической и медикаментозной обработки корневых каналов зубов, проведения коррекции применяемого антисептика. В научной литературе описан успешный опыт спектрального анализа тканей зуба при различных

заболеваниях и обоснована необходимость повышения эффективности патогенетической диагностики и лечения кариеса зубов с использованием экспресс-метода лазерно-флуоресцентной диагностики [1; 4], а также в области челюстно-лицевой хирургии при воспалительных заболеваниях одонтогенной природы [1; 119].

Характер спектрометрических данных ткани зависит от ее качественного и количественного состава и морфометрических и метаболических составляющих, что проиллюстрировано на рисунке 1.

Помимо порфиринов, вклад в общую мощность флуоресцентного сигнала вносят и другие метаболиты, такие как триптофан-, тирозин- и фенилаланин-содержащие белки, жирные кислоты, углеводы и множество других (некоторые из них представлены на рисунке 1). В частности, при дисплазиях методом рамановской спектроскопии был зарегистрирован более высокий процент содержания ДНК, актина, жирных кислот, по сравнению с интактными тканями, в которых больше содержалось гликогена [166; 221; 280; 298]. При каждой патологии отмечается свой набор морфометрических и метаболических характеристик, которые можно оценивать с использованием метода РФС.

Структура спектров флуоресценции и комбинационного рассеяния изучаемого биообъекта служит информативной характеристикой определенного вида ткани, как в норме, так и при патологии. Метод РФС отличается высокой скоростью получения информации об изучаемом биологическом объекте, отсутствием дополнительных расходных реагентов, простотой применения и высокой точностью измерений, что позволяет использовать метод в клинической медицине не только для экспресс-диагностики определения принадлежности микроорганизмов, их физиологического состояния, жизнеспособности, профиля антибиотикочувствительности, но и с целью идентификации природы патологического процесса, оценки его в динамике и др. [1; 2; 174; 190; 269].

Раман-флюоресцентные медицинские технологии (РФМТ) используются во многих направлениях медицины [1; 2; 185; 200; 208; 210; 226; 227-229; 232; 244; 275; 284; 290, 301]. Преимущество оптических методов диагностики заключается в возможности идентифицировать наличие опухолевых и вовлеченных в воспалительный процесс тканей в экспресс-режиме [179; 240; 279]. Возможность использования флюоресцентных методов в диагностике воспалительных и опухолевых заболеваний с высокой чувствительностью, специфичностью, точностью, эффективностью подтверждают многие исследования [201, 202; 222; 276].

Согласно данным литературы, рамановские спектры тканей со злокачественным перерождением и окружающей воспалительно-измененной стромой имеют низкую интенсивность, благодаря повышенному содержанию коллагена и высокую интенсивность при большом количестве нуклеиновых кислот по сравнению с нормальной тканью. Спектральные характеристики интактных тканей и тканей, подверженных воспалению, предопухоловому состоянию, а также опухоли, значительно варьируют между собой [258]. Эти характеристики помогают дифференцировать измененные ткани (опухоли, метаплазия, воспаление) от здоровых. Раман-флюоресцентная спектроскопия может использоваться для диагностики дисплазий и воспалительных изменений при предраке, раке различных органов, в частности, описаны методики диагностики рака предстательной железы, молочной железы, костей, кожи, пищевода, легких, прямой кишки [227-229]. Также при помощи метода рамановской спектроскопии, по данным литературы, можно диагностировать такие состояния, как наличие пищевода Барретта, различные виды дисплазий, переходные состояния между воспалительными заболеваниями и онкологическим процессом на ранней стадии. В частности, при дисплазиях методом рамановской спектроскопии был зарегистрирован более высокий процент содержания ДНК, актина, жирных кислот, по сравнению с интактными тканями, в которых больше содержалось гликогена [166; 220; 221; 271; 298].

Таким образом, различные модификации метода раман-флюоресцентной спектроскопии можно использовать для диагностики воспалительных изменений, проведения анализа веществ различной химической природы, содержащихся в определенной концентрации в нормальной и патологически измененной ткани.

Согласно работам ряда ученых, рамановская спектроскопия используется для определения рака молочной железы [200]. Мультивариативный спектральный анализ используется для дискриминации между нормальными протоками молочной железы и измененными при раке молочной железы [227-229; 284]. Для сравнения спектров, полученных от биологических объектов со злокачественным перерождением, протоков молочной железы, окруженных воспалительной стромой и здоровых тканей,- долек, протоков, стромы молочной железы,- используют рамановскую микроспектроскопию. Авторы показали, что рамановские спектры при карциноме протоков молочной железы имеют более интенсивные спектральные характеристики, благодаря повышенному содержанию нуклеиновых кислот (788/см, 1098/см) по сравнению с другими анатомическими структурами. Спектры, полученные от пациенток с раком молочной железы, показывают изменения количества каротиноидов и липидов. Также наблюдались изменения в углеводном и белковом составе (например, отсутствие некоторых аминокислот, изменения в концентрации аминокислот, структурные изменения) по сравнению с нормальными тканями молочной железы. Таким образом, спектроскопия комбинационного рассеяния света и ИК-спектроскопия являются информативными методами диагностики [183].

С использованием рамановской спектроскопии для определения опухолевых изменений и воспалительной реакции, было показано, что в патологически измененных тканях содержится больше нуклеиновых кислот, триптофана и фенилаланина и меньше (что дает менее интенсивный сигнал) фосфолипидов, пролина и валина, по сравнению с нормальными тканями. При

1445/см и 1655/см возможно, по мнению авторов, производить диагностику воспалительных и неопластических заболеваний с наибольшей точностью [210].

При исследовании ткани головного мозга с помощью рамановской спектроскопии было выявлено, что рамановские сигналы с поверхности серого вещества головного мозга характеризуется высокой интенсивностью, что связано с повышенным содержанием белков, ДНК и фосфатидилхолина, по сравнению с белым веществом, где в большем количестве содержатся холестерин, сфингомиелин и галактоцереброзид. Данный факт позволяет проводить дифференциальную диагностику новообразований, в том числе, злокачественных [170; 207; 208; 210; 225; 295; 301].

Ранее проводились работы, посвященные изучению морфологических и физиологических основ флюоресценции тканей женской репродуктивной системы при воспалительных и опухолевых заболеваниях, разработке принципов лазерной неинвазивной флюоресцентной диагностики заболеваний органов репродуктивной системы, которые продемонстрировали свою эффективность, в частности, в отношении органосберегающих методик хирургического лечения доброкачественных новообразований, пролиферативных и воспалительных процессов органов женской репродуктивной системы. Метод флюоресцентной диагностики и экспресс-оценки состояния тканей шейки матки и эндометрия в норме и при патологии с использованием лазерного излучения, основанный на морфологических и физиологических особенностях флюоресценции тканей женских половых органов, оказался высокоинформативным; высокоэффективным (95,2%), точным, щадящим и малотравматичным, что особенно важно для больных с бесплодием и невынашиванием [40]. Также имеются работы, посвященные разработке экспресс-диагностики с использованием лазерно-флюоресцентного метода; изучению клинической и морфологической картины гиперпластических процессов эндометрия (ГПЭ) и хронического эндометрита у женщин. Данная комплексная лечебно-диагностическая медицинская технология, основанная на применении лазерной

конверсионной экспресс-диагностики (флюоресцентная составляющая), позволяет объективно выявлять нарушение структурно-функциональных характеристик эндометрия при гиперпластических и воспалительных процессах (клеточная пролиферация, оксигенация тканей, нарушение структурированности и их морфо-метаболических характеристик) и их восстановление при использовании объемной фото-иммунной терапии (клиническая эффективность с использованием данного метода составила 86,7%) [112]. В данной работе проиллюстрированы основные характеристики тканей женской репродуктивной системы в норме и при патологии в динамике. Высокая специфичность при определении химических составляющих на молекулярном уровне без использования дополнительных манипуляций позволяет данному методу регистрировать малейшие изменения метаболизма [213; 233]. Рамановская спектрометрия может использоваться в качестве диагностики не только тканей, но и биологических жидкостей. Динамику молекулярного состава биожидкостей, регистрируемую при помощи рамановской спектрометрии, можно использовать для создания мультивариативных моделей для определения нормы и патологии [225].

По данным литературы, метод рамановской спектроскопии информативен в диагностике астмы. Проводится исследование сыворотки крови с определением содержания белков, ДНК, глюкозаминогликанов, уровень которых повышается при утяжелении симптомов заболевания [272]. При помощи рамановской спектроскопии также можно оценивать содержание в сыворотке крови С-реактивного белка, биомаркеров при воспалительных заболеваниях, в том числе, и при сепсисе [171; 219; 236; 253].

Некоторые авторы изучали возможности и преимущества аутофлуоресцентной эндоскопии в диагностике поражений гортани [297]. Было выявлено, что метод позволяет точно очертить границы предполагаемого патологического процесса и может помочь в выборе участков для взятия биопсии. Однако флюоресцентная составляющая вместе с рамановской дает

более высокие результаты для дифференциации тканей: как интактных, так и вовлеченных в воспалительный, предопухолевый и опухолевый процесс [270].

Часть исследований была посвящена изучению спектральных характеристик нормальных и предраковых тканей полости рта при эмиссии 350 нм. Метод зарекомендовал себя высокоэффективным при проведении диагностики: были отмечены специфичность 86.7% и чувствительность 93.3% [218].

На сегодняшний день широко используются рамановские спектрометры с оптоволоконными световодами и эндоскопы, снабженные специальными насадками и зондами, проникающими на всю глубину исследуемой ткани; их портативность позволяет диагностировать патологическое состояние в режиме реального времени [1; 2].

Современные методы диагностики, в том числе, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография и эндоскопическое ультразвуковое исследование, не всегда помогают установить точный диагноз в ранней стадии заболевания, а также часто не в состоянии выявить мелкие образования и точно дифференцировать доброкачественные и злокачественные новообразования. Совместное использование методов аутофлуоресценции, диффузного отражения и рассеяния света при спектроскопии дает дополнительную информацию, которая может быть использована для обнаружения даже предраковых состояний. В некоторых исследованиях оценивалась эффективность лазерной диагностики для обнаружения опухолей слизистой оболочки ротовой полости. Метод рамановской спектроскопии при идентификации некоторых злокачественных образований полости рта показал высокие чувствительность и специфичность - 86,1% и 94,4%, соответственно [177].

Как выяснилось, метод дает возможность точно диагностировать патологический процесс всего за несколько минут [196]. Целью одного из исследований было определение оптимальных периодов накопления ALA-индуцированного протопорфирина IX (PpIX) в здоровых участках ротовой полости человека и при различной патологии слизистой оболочки. Определение

оптимального времени накопления вещества в слизистой оболочке полости рта помогло улучшить контрастность и точность диагностики рака ротовой полости [241]. ЛФД-спектроскопия может использоваться для диагностики базальноклеточной карциномы, поскольку является быстрым и неинвазивным методом, обладающим высокой чувствительностью, а также отличается простотой выполнения [186; 199].

Часть исследований была посвящена использованию количественного метода отражения/флуоресценции для определения оптических свойств нормальной кожи и новообразований кожи немеланомной природы. В ходе исследования выявлено, что оптические свойства нормальной кожи и немеланомного рака кожи значительно отличаются друг от друга и хорошо коррелируют с видом патологии [262].

Существуют работы, посвященные изучению применения раман-флуоресцентных медицинских технологий в диагностике воспалительных и опухолевых заболеваний в оториноларингологии, хирургии головы и шеи [188; 282; 286].

Метод РФС используется для дифференциальной диагностики интактных тканей и тканей ЛОР-органов, вовлеченных в опухолевый процесс. Чувствительность метода, рассчитанная в одном из исследований и специфичность, приближались к 100%, после расчета с использованием методов главных компонент и линейного дискриминантного анализа [188].

Описаны работы с использованием метода рамановской спектроскопии в ранней диагностике опухолевых заболеваний головы и шеи [177; 204]. Метод рамановской спектроскопии ранее использовался для идентификации злокачественных образований полости рта (чувствительность: 86,1%; специфичность: 94,4%) [177].

Кроме того, метод раман-флуоресцентной спектрометрии можно использовать для определения соотношения нейтрофилов к лимфоцитам в

экспресс-режиме в конкретном локусе, что позволяет своевременно определить тактику лечения, не дожидаясь результатов микробиологического, цитологического, иммунологического и др. методов исследования. Методом мультивариативного анализа стало возможным определять концентрацию коагулирующих и антикоагулирующих факторов в сыворотке крови. В частности, в исследовании была определена концентрация фибриногена в крови. Нормальное его значение в сыворотке крови составляет 1,5-3 г/л [260]. Также при помощи рамановской спектроскопии можно оценивать уровень гепарина в крови во время хирургических вмешательств [247].

Определение содержания различных веществ методом рамановской спектроскопии и ее модифицированных аналогов как в нормальной ткани, так и в патологически измененной, а также в составе биологических жидкостей, делает возможным диагностировать воспалительные и неопластические заболевания с высокой точностью, специфичностью, чувствительностью. Понимая патоморфологические, метаболические, иммунологические, физиологические и патологические механизмы, приводящие к развитию воспалительных заболеваний глотки, в частности, к хроническому тонзиллиту, представляется возможным проводить экспресс-диагностику на основе изменения уровня различных биомаркеров. Метод раман-флюоресцентной спектроскопии позволяет регистрировать в динамике изменения кровотока, микроциркуляции, пролиферативной активности, что даёт возможность судить об активности процесса.

Таким образом, рамановское и люминесцентное (флюоресцентное) виды излучений помогают получить данные (количественно и качественно) об исследуемом органе, его морфометрические, морфологические особенности, поскольку принцип их действия основан на регистрации различных физических и биологических свойств исследуемого объекта [1, 2].

Применение метода РФС, согласно источникам научной литературы, является информативным, относительно простым в использовании, надежным и

экспрессным [1, 295]. Данный метод позволяет зарегистрировать различные локальные характеристики патологических процессов. Однако, в доступной нам литературе, обоснование применения представленной медицинской РФС-технологии в ЛОР-клинике и изучение возможности и диапазона ее применения при заболеваниях ЛОР-органов мы выявили лишь в единичных случаях, которые носят экспериментальный характер.

Успешное применение в различных направлениях медицины метода лазерно-флуоресцентной диагностики побудило интерес использовать данный метод в оториноларингологии, а именно при воспалительных заболеваниях глотки, что явилось темой настоящего диссертационного исследования.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика больных

Работа выполнена на базе клиники болезней уха, горла и носа Первого МГМУ им. И. М. Сеченова в период с ноября 2015 по июнь 2018 года.

Основными этапами работы для обоснования применения метода РФС (раман-флюоресцентной спектрометрии) в диагностике воспалительных заболеваний глотки были следующие:

1. изучение диагностических возможностей метода РФС;
2. регистрация спектральных характеристик интактной и патологически измененной ткани при воспалительных заболеваниях глотки - хроническом тонзиллите и хроническом фарингите; разработка референсных значений РФС-характеристик;
3. оценка чувствительности и специфичности метода РФС при воспалительных заболеваниях глотки;
4. проведение сравнительного анализа характеристик раман-флюоресцентных спектров тканей глотки здоровых добровольцев и лиц, страдающих ВЗГ;
5. анализ раман-флюоресцентных спектральных характеристик у пациентов с ВЗГ на примере хронического тонзиллита компенсированной формы в динамике (до и после курса консервативного лечения) для оценки диапазона применения метода;
6. обоснование возможности и перспектив применения РФС-технологии в экспресс-диагностике заболеваний ЛОР-органов.

На первом этапе для изучения диагностических возможностей и определения чувствительности и специфичности метода РФС в идентификации воспалительных заболеваний глотки, нами были проведены исследования *in vivo*

и *in vitro* спектральных данных тканей глотки, а также гистологическое исследование образцов, полученных непосредственно после операции-тонзиллэктомии. Объектом исследования были небные миндалины пациентов с хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы (ХТ ДФ) до и после тонзиллэктомии (N=152). Регистрация спектров ткани небных миндалин пациентов с ХТ ДФ проводилась сначала *in vivo* (накануне операции), затем *in vitro*, в течение 1 минуты после удаления. После регистрации спектров удалённые небные миндалины помещались в 5%-ный раствор формалина и доставлялись в лабораторию кафедры патологической анатомии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова для проведения гистологического исследования. Полученные результаты были обработаны с использованием статистических методов.

Всего было проанализировано 6080 спектров ткани небных миндалин, полученных с помощью метода РФС (80 небных миндалин женщин и 72-мужчин): по 3040 спектров до и после операции. Измерения *in vitro* и *in vivo* проводились в 4 точках, подробно описанных ниже. Число усреднений было равно 20, то есть проводилось 20 измерений в одной точке и рассчитывалось среднее значение в автоматическом режиме. Средний возраст пациентов с ХТ ДФ, миндалины которых были исследованы описанным выше способом, составил $28 \pm 1,5$ лет. Для оценки информативности применения раман-флюоресцентных медицинских технологий *in vitro* и *in vivo* были продемонстрированы основные спектральные особенности тканей глотки.

На втором этапе проводился набор клинического материала. В исследовании принимали участие добровольцы без патологии глотки (N=70), пациенты с хроническим тонзиллитом компенсированной формы (N=131), хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы (N=76) и гранулёзным фарингитом (ГФ) (N=58). В отношении перечисленных групп было выполнено наблюдательное (обсервационное) сплошное исследование, то есть все обследованные (описано ниже), соответствующие критериям включения и невключения, были набраны в соответствующие группы.

На третьем этапе пациентам с хроническим тонзиллитом компенсированной формы (N=16 пациентов) нами был проведен мониторинг состояния небных миндалин после курса консервативного лечения с использованием метода раман-флюоресцентной спектроскопии. В представленной работе мы оценивали спектры ткани небных миндалин до и после лечения для обоснования диагностической ценности метода РФС.

Набор пациентов во все группы прекращался после получения статистически значимых результатов (Герасимов А. Н., 2007).

Дизайн исследования

Осмотр, исследование

Дизайн исследования представлен на рисунке 4:



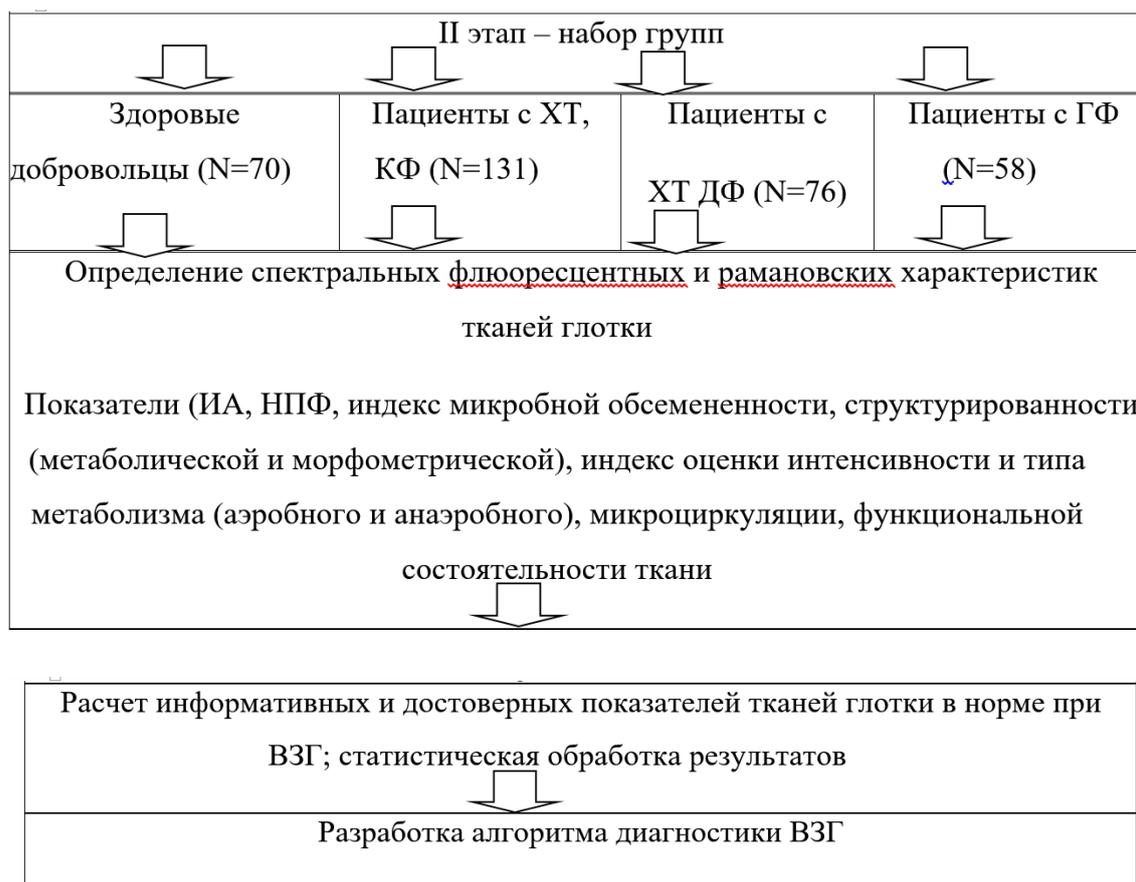


Рисунок 4. Дизайн исследования (N-количество обследованных). ИА-индекс аэробности, НПФ-нормированный показатель флюоресценции.

В нашем исследовании была использована классификация неспецифического хронического тонзиллита И.Б. Солдатова (1975г), которая рассматривает компенсированную и декомпенсированную форму заболевания. Данный выбор был обусловлен наличием бо́льшего количества дифференциальных признаков между двумя формами заболевания, по сравнению с тремя формами хронического тонзиллита (простой, ТАФ I и ТАФ II), согласно классификации, Б.С. Преображенского и В.Т. Пальчуна (1964г. с последующим уточнением).

Известно, что патогномичные симптомы ХТ отсутствуют, диагноз ставится на основании наличия комплекса (не менее 2х) патологических признаков. Согласно классификации И. Б. Солдатова для пациентов с ХТ КФ характерно наличие более одного местного симптома заболевания - стойкая гиперемия и валикообразное утолщение краёв нёбных дужек (признаки Гизе и Преображенского), отёчность верхних отделов краёв нёбных дужек (признак

Зака), наличие спаек нёбных миндалин с дужками, скопление значительного количества гнойно-казеозного детрита и/или жидкого гнойного отделяемого в лакунах нёбных миндалин, регионарный (зачелюстной) лимфаденит, ангины – не чаще одного раза в несколько лет; общая реакция организма при данной форме заболевания отсутствует. При ХТ ДФ имеются не только местные признаки хронического воспаления, характерны частые ангины (1 раз в год и более), наличие в анамнезе регионарных гнойных осложнений, признаков тонзиллогенной интоксикации (субфебрильная температура тела, слабость, быстрая утомляемость, потливость, различного рода дискомфорт в области сердца и суставов) и сопряжённых с тонзиллитом заболеваний других органов и систем организма (гломерулонефрита, ревматических заболеваний и др.) [140].

Критерии включения здоровых лиц в исследование:

1. возраст с 18 до 45 лет;
2. согласие на участие в исследовании;
3. отсутствие хронических заболеваний глотки и других ЛОР-органов в анамнезе и на момент осмотра;
4. отсутствие хирургических вмешательств на структурах глотки в анамнезе.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. возраст с 20 до 45 лет;
2. согласие на участие в исследовании;
3. наличие хронических воспалительных заболеваний глотки - хронического тонзиллита компенсированной формы, хронического тонзиллита декомпенсированной формы; гранулезного фарингита

Критерии невключения для здоровых добровольцев:

1. возраст моложе 18 и старше 45 лет;
2. отказ от участия в исследовании;
3. наличие острых воспалительных заболеваний глотки и других ЛОР-органов на момент осмотра;

4. наличие сопутствующих любых заболеваний желудочно-кишечного тракта и других соматических заболеваний среднетяжёлого и тяжёлого течения.

Критерии невключения для пациентов:

1. возраст моложе 18 и старше 45 лет;
2. отказ от участия в исследовании;
3. наличие острых воспалительных заболеваний глотки и других ЛОР-органов на момент осмотра;
4. наличие хирургических вмешательств на структурах глотки в анамнезе;
5. наличие сопутствующих любых заболеваний желудочно-кишечного тракта (кроме пациентов с ГФ) и других соматических заболеваний среднетяжёлого и тяжёлого течения.

Общая характеристика исследуемых

Группа здоровых добровольцев была сформирована на основе сплошной выборки на базе университетской клиники болезней уха, горла и носа Первого МГМУ им. И. М. Сеченова из студентов женского и мужского пола, без каких-либо хронических соматических, в том числе, оториноларингологических, заболеваний в анамнезе. Группа набиралась методом сплошной выборки из студентов 4 курса лечебного, медико-профилактического и педиатрического факультетов, соответствующих критериям включения и исключения в период с ноября по июнь 2015 - 2016 учебного года. Пациенты с хроническим тонзиллитом компенсированной и декомпенсированной форм, а также гранулезным фарингитом набирались на основе сплошной выборки поступающих на лечение в клинику болезней уха, горла и носа и студентов 4 курса лечебного, медико-профилактического и педиатрического факультетов университета, соответствующие критериям включения и исключения в период с ноября 2015 по июнь 2018 гг. Набор пациентов был окончен после

формирования объёма групп, достаточного для получения достоверных результатов (Герасимов А. Н., 2007).

Распределение всех пациентов, включённых в исследование, по полу и возрасту представлено в таблице 1. Всего было обследовано 335 пациентов, из них женщин - 173 человека (52%), мужчин - 162 (48 %). Средний возраст в группах составил $28 \pm 1,5$ лет; распределение пациентов по возрасту и полу во всех группах было сопоставимым. Средний возраст в группе здоровых добровольцев составил $21 \pm 0,5$ лет.

Таблица 1 – Распределение пациентов по полу и группам

№ группы	Количество пациентов	Пол			
		Женщины		Мужчины	
		абс.	%	абс.	%
Группа сравнения (здоровые добровольцы)	70	38	54	32	46
Основная I группа-пациенты с ХТ КФ	131	62	47	69	53
Основная II группа-пациенты с ХТ ДФ	76	40	53	36	47
Основная III группа-пациенты с ГФ	58	33	57	25	43
Всего	335 (100%)	173 (52%)	-	162 (48%)	-

2.2. Методы обследования пациентов. Клинические характеристики и распределение больных по группам

Всем включённым в настоящее исследование мы проводили сбор жалоб, анамнеза, общий осмотр, стандартный оториноларингологический осмотр; пациентам с патологией глотки в ряде случаев использовались дополнительные методы исследования.

Стандартный оториноларингологический осмотр предполагал выполнение фарингоскопии, передней и задней риноскопии, непрямой ларингоскопии, отоскопии. Госпитализированным больным проводилось общеклиническое обследование, некоторым пациентам по показаниям выполнялись микробиологическое исследование, биохимическое исследование крови (определение антистрептолизина-О, ревматоидного фактора, С-реактивного белка в плазме крови), электрокардиограмма, общий анализ крови, общий анализ мочи, консультация терапевта и др.; гистологическое исследование небных миндалин после тонзиллэктомии.

В основной группе (N=70) пациенты жалоб не предъявляли.

Пациенты с хроническим тонзиллитом, компенсированной формой (N=131) наиболее часто предъявляли жалобы на частый дискомфорт в горле, наличие «гнойных пробок в миндалинах», нечастые ангины в анамнезе (1 раз в несколько лет) (таблица 2).

Таблица 2 – Жалобы и анамнестические данные пациентов с ХТКФ (N=131)

Жалобы	Количество пациентов
Эпизоды дискомфорта, неприятных ощущений, першения в горле	129
Наличие и периодическое отхождение «казеозных и гнойных пробок» из лакун небных миндалин	42
Ангины 1 раз в 2-3 года	86

Частые ангины (1-2 раза в год) в детстве	34
Эпизоды или постоянный неприятный запах изо рта	9
Частые простудные заболевания (более 3х раз в год в анамнезе)	16

Ряду пациентов с хроническим тонзиллитом компенсированной формы (N=67) ранее проводились курсы стандартного консервативного лечения 1-2 раза в год (промывание лакун небных миндалин растворами антисептиков № 5-10 с медикаментозной поддержкой) с временным положительным эффектом. После проведенного курса лечения пациенты отмечали уменьшение ощущения дискомфорта в горле; наличие казеозного отделяемого в лакунах небных миндалин не беспокоило больных в среднем 4 - 6 месяцев.

Пациенты с ХТДФ предъявляли аналогичные жалобы, что и с ХТКФ, однако частота ангин была выше и у некоторых пациентов отмечались нарушение общего самочувствия, периодически – наличие субфебрильной температуры тела, также имелись сопутствующие сопряжённые с ХТ заболевания (таблицы 3, 10).

Таблица 3 –Жалобы и анамнестические данные пациентов с ХТДФ (N=76)

Жалобы	Количество пациентов
Эпизоды дискомфорта, неприятных ощущений, першения в глотке	73
Наличие и периодическое отхождение «казеозных и гнойных пробок» из лакун небных миндалин	45
Ангины 1 раз и более в год в настоящее время	62
Частые ангины (1-2 раза и более в год) в детстве	72
Эпизоды или постоянный неприятный запах изо рта	6
Постоянная или периодически	58

возникающая субфебрильная температура тела 37,0°C – 37,3°C	
Частые простудные заболевания (более 3х раз в год в анамнезе)	67
Повышенная утомляемость, слабость, потливость	12
Периодический или постоянный дискомфорт в области сердца	16
Периодический или постоянный дискомфорт в области суставов	37
Увеличение зачелюстных лимфоузлов	37

Как видно из таблицы 4, пациенты с гранулезным фарингитом наиболее часто предъявляли жалобы на эпизодически возникающие боль и дискомфорт в горле.

Таблица 4 – Жалобы, предъявляемые пациентами с гранулезным фарингитом (N=58)

Жалобы	Количество пациентов (N)
Эпизодическая или практически постоянная боль в глотке	53
Эпизоды дискомфорта, неприятных ощущений, першения в глотке	44
Эпизоды сухого кашля в отсутствие острой респираторной патологии	12
Частые простудные заболевания (более 3х раз в год в анамнезе)	25
Жалобы, обусловленные патологией ЖКТ (изжога, отрыжка, тяжесть в эпигастральной области, метеоризм и т. п)	18

В группе больных ГФ было 18 пациентов, наблюдавшихся у гастроэнтерологов по поводу заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ), хронический гастрит, хронический холецистит. У тех пациентов, у которых не диагностировалась

ГЭРБ, нельзя было исключить фаринго-ларингеальный рефлюкс. Как известно, высокий гастроэзофагеальный рефлюкс, часто обуславливающий оториноларингологические внепищеводные проявления, редко подтверждается гастроэнтерологами, так как для этого необходимо проведение суточной рН-метрии на разных уровнях пищевода, что не всегда применяется на практике [43].

В таблице 5 представлены основные методы обследования пациентов и здоровых добровольцев.

Таблица 5 – Методы обследования пациентов с патологией глотки и здоровых добровольцев

Виды исследования	Здоровые добровольцы, количество	Пациенты с ХТ КФ, количество	Пациенты с ХТ ДФ, количество	Пациенты с ГФ, количество
Осмотр ЛОР-органов	70	131	76	58
Гистологический	-	-	76	-
Микробиологический	-	97	34	-
Определение концентрации ревмопроб (АСЛО, РФ, СРБ)	-	131	76	-
РФС	70	131	76	58

У пациентов из группы ГФ были отмечены следующие предрасполагающие к развитию заболевания факторы (представлены в таблице 6)

Таблица 6 – Возможные предрасполагающие к развитию ГФ анамнестические факторы

Возможный предрасполагающий фактор	N
Курение	17
Частый приём алкоголя	9
Профессиональные химические и физические вредности	13
Речевые профессии: певцы, актеры, учителя	11
Частый приём горячей, острой, раздражающей пищи	37
Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) и другие заболевания ЖКТ	18

Пациенты с ГФ, включенные в исследование, не имели заболеваний, предрасполагающих или оказывающих влияние на течение патологического процесса в глотке (исключение – ГЭРБ и другие заболевания ЖКТ). Согласно данным анамнеза, у пациентов этой группы отмечаются эпизодически возникающие першение, боль, дискомфорт в горле; обострение хронического воспалительного процесса глотке 1-2 и более раз в год, из предрасполагающих факторов, у данной категории больных были выявлены курение, профессиональные химические и физические вредности, частое употребление в пищу физически, химически и термически раздражающей пищи, сопутствующие заболевания ЖКТ (ГЭРБ и другие) (таблица 6). В таблицах 7, 8, 9 представлены результаты общего осмотра и данные фарингоскопии пациентов с патологией глотки

Таблица 7 – Данные фарингоскопии и пальпации регионарных лимфоузлов у пациентов с ХТКФ

Признак	Пациенты с ХТ КФ, количество (N)
регионарный лимфаденит (зачелюстные лимфатические узлы до 1,1-1,2 см в диаметре, безболезненные при пальпации)	131
наличие казеозного отделяемого в лакунах небных миндалин	131
гиперемия небных дужек	131
отечность небных дужек	131
утолщение небных дужек	122
наличие спаек между небными миндалинами и дужками	69

Таблица 8 – Данные объективного осмотра и анамнеза у пациентов с ХТДФ

Признак	Пациенты с ХТ ДФ, количество (N)
регионарный лимфаденит (зачелюстные лимфатические узлы до 1,1-1,2 см в диаметре, безболезненные при пальпации)	76
наличие казеозного отделяемого в лакунах небных миндалин	76
гиперемия небных дужек	76
утолщение небных дужек	47

отечность небных дужек	76
наличие спаек между небными миндалинами и дужками	68
признаки декомпенсации: заболевания других органов и систем (сердца, суставов, почек и др.), повышение ревмопроб, ангины 2 раза в год и более и др.	76

Таблица 9 – Данные осмотра, в т. ч., фарингоскопическая картина у пациентов с ГФ

Признак	Пациенты с ГФ, количество (N)
общее состояние удовлетворительное	58
увеличение лимфоидных гранул на задней стенке глотки	58

В группу больных хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы были включены пациенты с сопряжённой патологией почек, суставов, сосудов и сердца. Количество пациентов представлено в таблице 10.

Таблица 10 – Процентное соотношение от общего числа случаев, сопряженных с хроническим тонзиллитом заболеваний

ХТ ДФ, количество, абс.	Заболевания почек	Заболевания сердечно-сосудистой системы	Заболевания суставов
N	14 (18,4 %)	13 (17,1 %)	49 (64,5%)

В таблице 11 представлены данные ревмопроб у пациентов с хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы.

Таблица 11 – Лабораторные показатели (антистрептолизин-О, ревматоидный фактор, С-реактивный белок) у пациентов с ХТ ДФ

Показатель, среднее значение	Антистрептолизин-О	Ревматоидный фактор	С-реактивный белок
Пациенты с ХТ ДФ	>200 Ед/мл (M=412 Ед/мл)	><=14 МЕ/мл	><=5 мг/л
Количество пациентов с ХТДФ (повышение показателей), N	74		-

В таблице 12 представлены способы лечения в группах пациентов с ХТ КФ и ХТ ДФ.

Таблица 12 – Способы лечения в исследуемых группах

Консервативное лечение при ХТ КФ. N=16 (в динамике)	Хирургическое лечение при ХТ ДФ. N=76
Промывание лакун небных миндалин растворами антисептиков (в данном случае, раствором хлоргексидина 0,02%-ного), обработка слизистой оболочки глотки раствором Люголя, физиотерапия, витаминотерапия, иммуностропная терапия.	Двусторонняя тонзиллэктомия

Пациентам с хроническим тонзиллитом компенсированной формы проводилась оценка эффективности лечения, в том числе, с использованием метода раман-флюоресцентной спектроскопии. Таким образом, для обоснования диагностических возможностей метода РФС при ВЗГ проводились измерения методом РФС до и после лечения (N=16, что соответствует 12, 2 %). Данного количества пациентов было достаточно для получения статистически значимых результатов (Герасимов А. Н., 2007). Лечение пациентов данной группы проводилось в стационаре клиники болезней уха, горла и носа Первого МГМУ им. И. М. Сеченова и заключалось в промывании лакун небных миндалин раствором хлоргексидина 0,02%-ного № 7 с последующей обработкой небных миндалин раствором Люголя, а также с использованием системной витаминотерапии и фитотерапии и физиотерапевтических процедур.

2.3 Характеристики используемых аппаратно-программных комплексов и клиническое применение информативных показателей метода РФС

2.3.1 Алгоритмы и методы исследования при использовании РФСТ

Наш выбор метода раман-флюоресцентной спектроскопии для использования при патологии ЛОР-органов был обоснован необходимостью повышения

экспрессности, чувствительности и специфичности диагностики. РФС позволяет идентифицировать состояние биообъекта (в нашем исследовании – тканей глотки) в определенном локусе в данный конкретный промежуток времени. Раман-флюоресцентная диагностика основана на использовании феноменов конверсии зондирующего лазерного излучения в обратно отраженный сигнал, который позволяет получить характеристики ткани на всех уровнях ее организации - метаболическом, морфометрическом, функциональном (флюоресцентная составляющая) и комбинационного рассеяния света (эффекта Рамана), обеспечивающего идентификацию специфичности процесса, происходящего в ткани молекулярном уровне. Индексы и параметры РФС, проанализированные нами в работе, представлены ниже.

В работе нами использовались аппаратно-программные комплексы «EnSpectr R532» и «EnSpectr L405», сертифицированные для клинического применения (сертификат № РЗН 2015/2419 от 18 мая 2015 года). Установка для регистрации сигналов флюоресценции и рамановского рассеяния света включает в себя зеленый твердотельный лазер Nd:YAG (2w) с длинами волн 532 нм и 405 нм, оптическую систему фокусировки и фильтрации сигнала, спектрометр с дифракционной решеткой 1200 штрихов/мм со спектральным разрешением 4 см^{-1} , CCD-матрицу, контроллер и компьютер с программным обеспечением для записи спектров. Для проверки воспроизводимости спектральных особенностей мы проводили измерения в нескольких точках исследуемого образца. С целью уменьшения ошибки измерения использовался 10-кратный объектив, который фокусировал лазерный луч в достаточно широкое пятно (по размеру сравнимое с микроскопическими особенностями исследуемых тканей) диаметром 10 мкм. Мощность лазерного излучения составляла 10 мВт, запись спектров была произведена за время экспозиции, равное 1 с. Число усреднений - №20 - при записи каждого спектра было выбрано для эффективного подавления шумов считывания (рисунок 5).

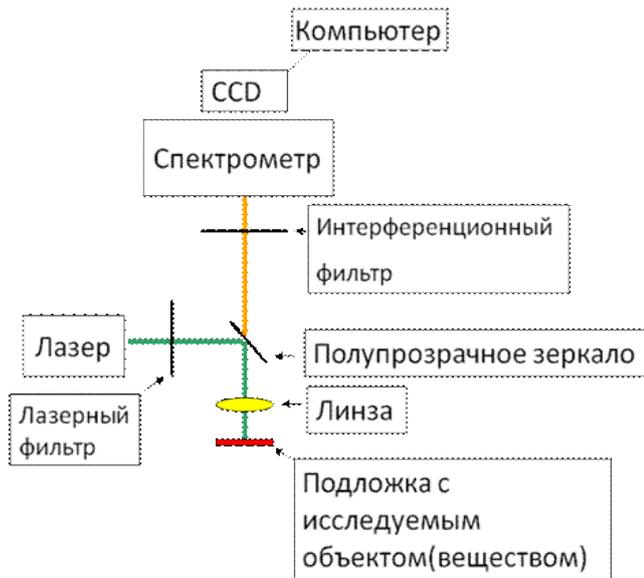


Рисунок 5- Схема аппаратно-программного комплекса

Методика работы на аппаратно-программном комплексе «EnSpectr» заключалась в регистрации измерений - спектральных характеристик ткани в норме и при патологии контактным способом, без освещения, с предварительной обработкой оптоволоконного световода раствором антисептика (Комбидеза).

В качестве референтного показателя была выбрана область, не вовлеченная в патологический процесс, – ткань небных миндалин здоровых добровольцев,- для определения референсных значений при использовании метода РФС в отношении лимфоидной ткани глотки; объектом сравнения была точка кожи внутренней поверхности предплечья.

В связи с тем, что тело человека имеет метамерное строение, симметричные области иннервируются из одних и тех же ганглиев, и есть взаимное влияние смежных анатомических зон на кровоток и иннервацию, что было показано в предыдущих исследованиях, таким образом, мы взяли асимметричную точку в качестве интактной. Нами в качестве интактной точки была выбрана точка на коже внутренней поверхности предплечья, так как в отличие от области лица, головы и шеи, кровоток на периферии (в данном случае, рука), значительно различается, в связи с чем представляется возможным провести более наглядный

анализ полученных данных. При получении информации в близко расположенных друг к другу точках, например, кожа губы, внутренняя поверхность щеки и другие, мы фиксировали показатели, близкие по своим характеристикам к норме, кроме того, наблюдалось наложение (интерференция волн) сигналов друг на друга, что препятствовало рациональному анализу данных. Было отмечено, что показатели в интактной точке (на коже внутренней поверхности предплечья) и исследуемых точках взаимосвязаны и изменяются синхронно.

В исследованиях, проведенных ранее, было показано более эффективное применение асимметричной точки- находящейся вне пределов изучаемой анатомической зоны [1]. Относительные показатели, такие как нормированные показатели флюоресценции, индексы аэробности в пределах одной анатомической зоны были одинаковыми, в то время как абсолютные показатели флюоресценции различались более, чем в 10 раз, что было определено в предварительно проведенных исследованиях [1]. В нашей работе мы использовали относительные индексы, такие как нормированный показатель флюоресценции, индекс структурированности тканей глотки, индексы аэробного и анаэробного метаболизма для обоснования возможности применения метода РФС с целью диагностики ВЗГ.

Использованные в работе аппаратно-программные комплексы изображены на рисунках б а-в.

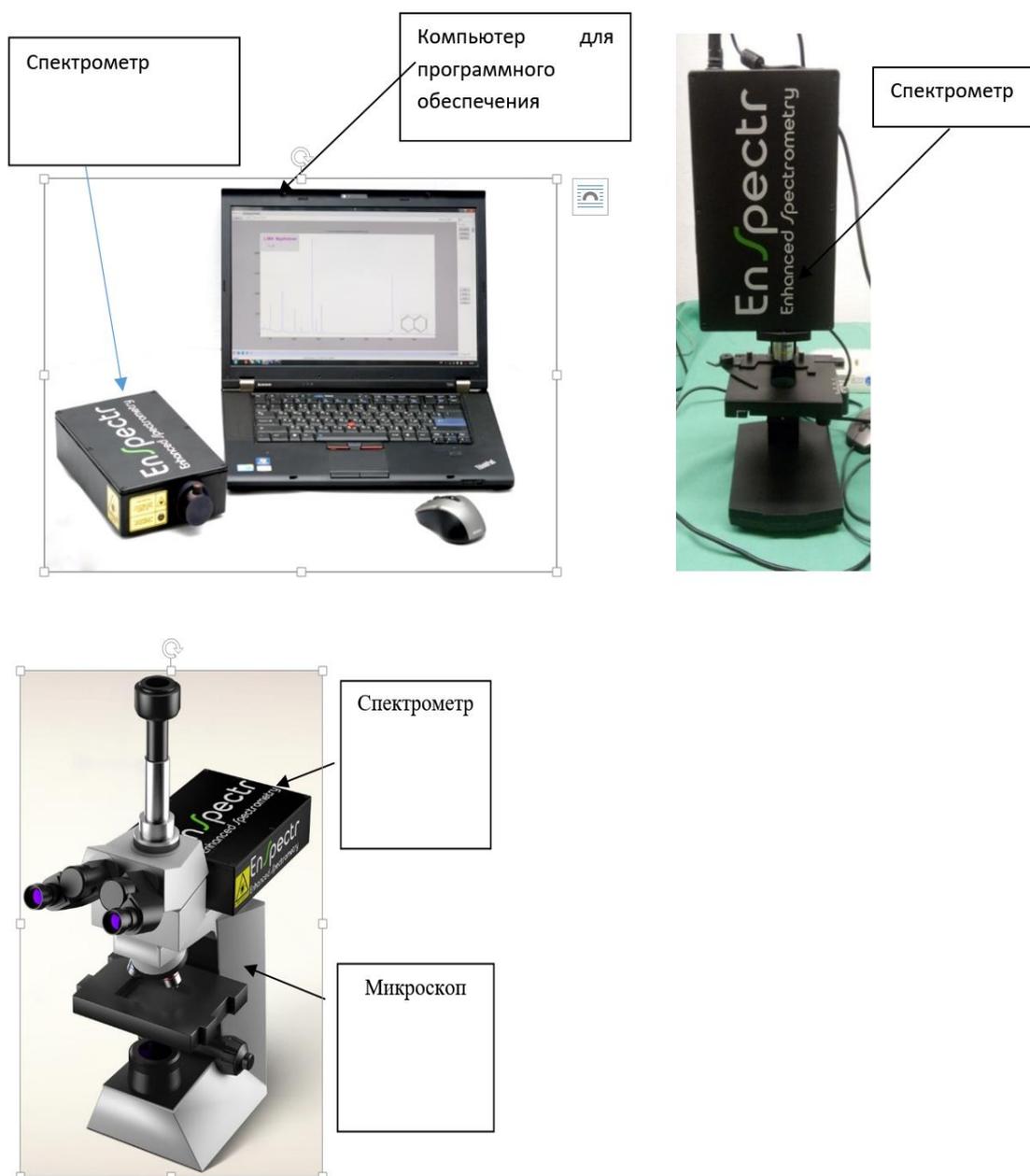


Рисунок 6 а, б, в. – Аппаратно-программный комплекс (АПК) EnSpectr (патент US 2011/0292376 A1) Аппаратно-программный комплекс для проведения раман-флюоресцентной спектроскопии *in vivo* (рисунок 6 а) и *in vitro* (рисунок 6 б, в) и его программное обеспечение. Раман-флюоресцентный микроскоп (справа) с длинами волн 532 нм и 405 нм, соответственно (рисунок 6 б, в).

Разрешающая способность аппаратно-программного комплекса (АПК) порядка 1\AA , что в 60-80 раз больше, чем у существующих отечественных

аналогов. Основной принцип действия АПК изображен на рисунке 5, более детальное описание представлено выше.

Для оценки спектральных различий тканей глотки в норме и при ВЗГ нами были определены основные индексы, расчет которых представлен ниже.

2.3.2 Информативные показатели, используемые при оценке раман-флюоресцентных характеристик тканей ЛОР-органов, и их клиническое применение

В предварительных исследованиях, при отработке методики вышеописанным способом, нами было отмечено, что спектры, снятые с поверхности небных миндалин с двух сторон (N=152), имели практически идентичные характеристики спектральных кривых, что дополнительно подтверждает не только схожий характер кровотока в данной области, но и системность процесса, вовлекающего симметричные зоны в патологический процесс.

Помимо интактной точки мы проводили измерения в 3 исследуемых точках в пределах одного и того же индивидуума. Точка 1 располагалась в области верхнего полюса небной миндалины, точка 2 - в области нижнего полюса небной миндалины, точка 3 - в области лакуны небной миндалины, точка 3 при хроническом фарингите - в области задней стенки глотки, у здоровых добровольцев - точка 3 - в области слизистой оболочки задней стенки глотки при сравнении с группой пациентов с хроническим фарингитом. При сравнении с группой пациентов с хроническим тонзиллитом нами были выбраны точки 1, 2, 3 в области аналогичной локализации у здоровых добровольцев, а именно, в области верхнего полюса, нижнего полюса и лакуны небных миндалин. Таким образом, сравниваемые точки во всех группах были идентичными и зависели от локализации и активности патологического процесса.

На рисунке 7 схематически изображены соответствующие точки, в которых мы проводили измерения:

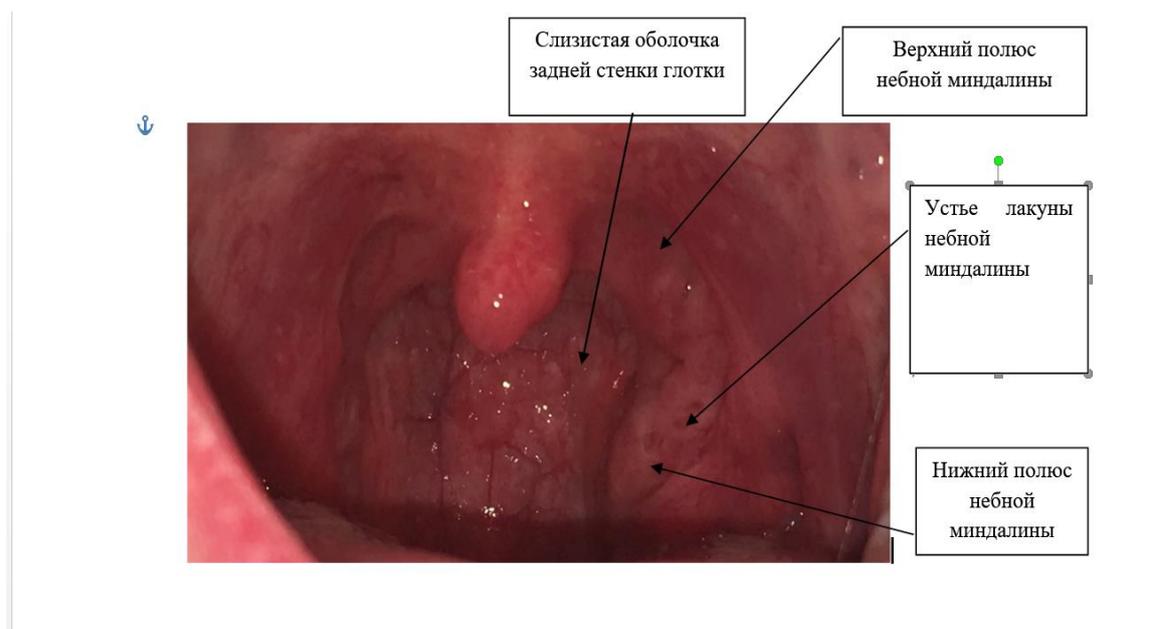


Рисунок 7 – Схематическое изображение точек на поверхности структур глотки (небных миндалин и задней стенки глотки), в которых были определены спектральные характеристики с использованием метода РФС

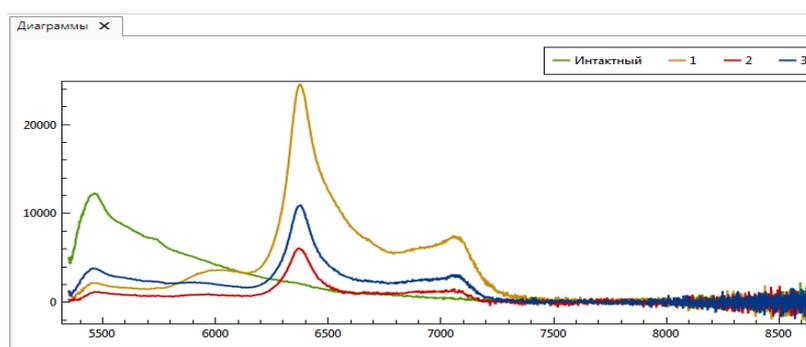


Рисунок 8. График спектральных кривых с поверхности ткани небных миндалин пациента с хроническим тонзиллитом (схема). Зеленая линия - спектральная кривая, полученная в ходе регистрации зондирующего и обратно отраженного сигнала с поверхности интактной точки. Желтая линия- спектр области лакуны небной миндалины; красная линия- спектр у верхнего полюса; синяя линия- спектр у нижнего полюса небной миндалины.

Одновременно мы проводили измерения таких показателей, как нормированный показатель флуоресценции и индекс аэробности, расчет которых проводился следующим образом. Если обозначить регистрируемый с поверхности биологического объекта спектр функцией интенсивности от длины волны: $F = F(x)$, то интегральный индекс флуоресценции (по всему

спектральному диапазону) для функции *Intact* (интактная точка) будет рассчитываться следующим образом:

Спектр будем задавать функцией интенсивности от длины волны: $F = F(x)$:

$$I_Int = \int Intact(x) dx$$

$$I_Fun = \int Fundus(x) dx$$

Эти два индекса отображают интегральные показатели флюоресценции (по всему спектральному диапазону) для функций *Intact* и *Fundus*. Подобным же образом данные показатели рассчитываются для всех остальных точек.

Intact- интактная точка, в данном случае-кожа внутренней поверхности предплечья, *Fundus*- измерения в точке 1 – у верхнего полюса небной миндалины, *Middle*-измерения в точке 2- на слизистой оболочке небной миндалины вблизи нижнего ее полюса, *Internal*-измерения в точке 3- в лакуне небной миндалины. В соответствующих формулах указываются описанные обозначения. Все функции заложены в программном обеспечении аппаратно-программных комплексов, использующихся в данной работе, и рассчитываются в автоматическом режиме.

Нормированные (на интегральный индекс флюоресценции в интактной точке) показатели флюоресценции (НПФ) для функций *Fundus*, *Middle*, *Internal* рассчитывались как отношение интегральной интенсивности флюоресценции в соответствующей точке (точке 1, 2, 3, 4) к данному показателю в интактной точке.

Индексы аэробности (ИА) для функций *Intact*, *Fundus*, *Middle*, *Internal* в исследуемых точках показывают отношение интегральной интенсивности флюоресценции в диапазоне длин волн 665-675 нм к данному показателю в диапазоне длин волн 685-695 нм, что соответствует спектральному диапазону

протопорфирина IX, который является индикатором бактериальной обсемененности.

Под «индексом структурированности ткани» мы понимаем степень ее однородности и интактности (невовлеченности в патологический процесс). Индекс структурированности при значениях его не более 5% можно считать нормальным, если же изменения данного показателя превышают указанное значение, то можно считать, что структура ткани нарушена. Расчет данного индекса производится путем вычисления среднего арифметического значений интегральной мощности флюоресценции во всех исследуемых точках и вычитании из каждого из данных показателей среднего значения. Таким образом, если полученная цифра не превышает 5%, то ткань можно считать достаточно структурированной, что больше характерно для нормы. Если же данный показатель выше 5%, то структурированность ткани нарушена, что характеризует патологическое состояние.

Индекс метаболизма (аэробного и анаэробного) отображает активность процессов, происходящих в тканях на биохимическом уровне. В норме и при ВЗГ данный индекс отличается качественным и количественным составом ткани, что также можно рассчитать на основе представленного программного обеспечения.

Вышеперечисленные индексы в ЛОР-практику введены впервые нами в настоящем исследовании.

Все вышеперечисленные индексы позволяют судить о физиологических, морфометрических, метаболических изменениях в ткани в норме и при воспалении

2.4 Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку полученных данных производили по общепринятому методу вариационной статистики (В. Ю. Урбах, 1967 г.) с

вычислением средней арифметической (M), среднеквадратического отклонения (σ), ошибки средней арифметической (m). Сравнение непараметрических вариантов после предварительной оценки правильности распределения выборок (соответствия его нормальному распределению) проводилось на основе критерия Стьюдента (t) с вычислением вероятности ошибки (p). При использовании метода РФС воспроизводимость исследуемых спектров подтверждали путем регистрации 5-10 спектров, записываемых последовательно с интервалами в 5 секунд. Ошибка измерений интегральной мощности флюоресценции не превышала $\pm 1.5\%$.

При анализе с использованием методов статистики нами были получены следующие данные: величина ИИ распределена достаточно компактно и симметрично, коэффициент асимметрии равен 0,142, коэффициент эксцесса (Kurtosis) равен -0,234. В соответствии с полученными показателями, мы можем использовать для анализа интенсивности флюоресценции в интактной точке (ИИ) методы параметрической статистики.

Регистрируемые многомерные данные (волновой сдвиг рассеянного излучения, интенсивность флюоресценции и рамановского рассеяния) были проанализированы при помощи регрессионного метода проекций на латентные структуры (PLS-DA), что позволило предсказать принадлежность новых образцов к определенному классу. Перед применением метода PLS-DA регистрируемые данные были избавлены от шума методом Савицкого-Голея и фонового излучения методом коррекции опорной линии с использованием ассиметричных наименьших квадратов. Все методы предобработки и многомерный анализ данных были реализованы в онлайн программном обеспечении TP^Tcloud^{beta}. После регистрации спектров проводилась статистическая обработка полученных данных с использованием программы SPSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3

3. 1 Определение диагностических возможностей метода РФС при воспалительных заболеваниях глотки

На первом этапе исследования мы определили диагностические возможности метода, затем провели анализ спектральных данных и сопоставили их с другими видами обследования, на основании чего были рассчитаны чувствительность и специфичность. Методика раман-флюоресцентной спектроскопии с использованием длин волн 405 нм и 532 нм была применена нами в идентификации тканей глотки как *in vivo*, так и *in vitro* в отношении больных хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы, с последующим гистологическим исследованием. Результаты проведенных исследований показали, что спектральные характеристики ткани небных миндалин, полученные при проведении измерений с использованием лазерного излучения с длинами волн 532 нм и 405 нм, не отличаются в соответствующем диапазоне частот (спектральные характеристики флюоресценции не зависят от длины волны зондирующего излучения, согласно законам физики).

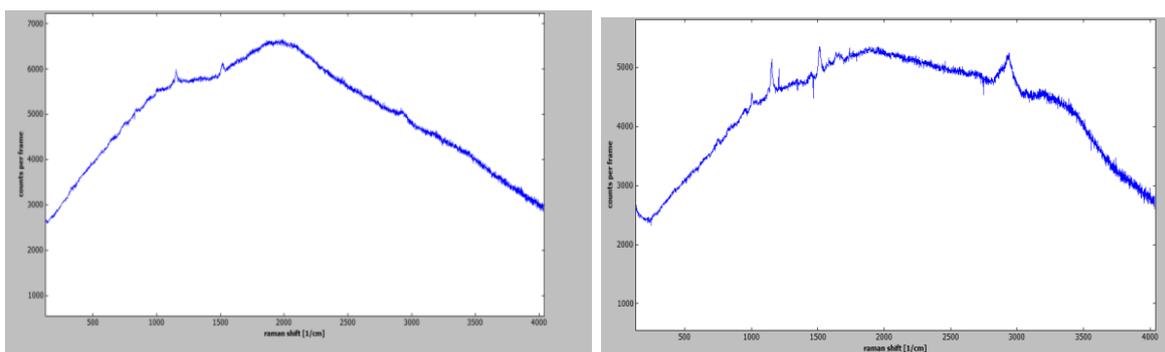


Рисунок 9. Спектральные характеристики ткани небных миндалин пациента с ХТ ДФ до (рисунок 9 а) и после удаления (рисунок 9 б) небных миндалин (регистрация спектра проводилась в течение 1 минуты после удаления). Спектры получены *in vivo* и *in vitro* (рис. 9а, 9б, соответственно). По оси абсцисс-

волновые числа (см^{-1}), по оси ординат- интенсивность флюоресценции в ОЕ-относительных единицах

На рисунках 9а и 9б мы видим, что на определенных длинах волн (или волновых числах) при воспалении появляются дополнительные пики, свидетельствующие не только об изменении структуры ткани при воспалительном процессе в глотке при хроническом тонзиллите, но и метаболических ее составляющих, а также физиологических особенностей. После использования метода главных компонент, линейного дискриминантного анализа, принципа наименьших квадратов, а также метода проекции на латентные структуры, стало возможным более детально оценить спектральные характеристики исследуемых тканей, что подробно описано ниже.

После окраски гематоксилин-эозином по результатам гистологического исследования подтверждалось наличие хронического воспаления в ткани небных миндалин, а именно лимфофолликулярной гиперплазии с лимфоидными элементами в криптах и десквамированными эпителиальными клетками, с внутриэпителиальными лимфоцитами, очаговым склерозом стромы. Согласно данным гистологии при хроническом тонзиллите было отмечено, что ткань небной миндалины покрыта многослойным плоским неороговевающим эпителием, инфильтрированным лимфоидными клетками с примесью полиморфно-ядерных лейкоцитов с участками склероза стромы и полнокровных сосудов, а также очаговым скоплением нейтрофилов в криптах. Описанная картина подтверждала наличие хронического воспалительного процесса в ткани небных миндалин у пациентов.

3. 2 Флюоресцентные характеристики тканей глотки в норме и при воспалительных заболеваниях глотки. Расчет чувствительности и специфичности метода РФС

На следующем этапе нами был проведен анализ интенсивности флюоресценции в интактной точке у всех исследуемых пациентов (ИИ) и в

точках на поверхности небных миндалин и задней стенки глотки у здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом и гранулёзным фарингитом. Также мы в соответствующих точках оценивали индексы аэробности (ИА) и нормированные показатели флюоресценции (НПФ) (см. главу II). Результаты фарингоскопии у здорового добровольца и соответствующих ей спектральных данных тканей глотки представлены на рисунках 10 и 11, соответственно.

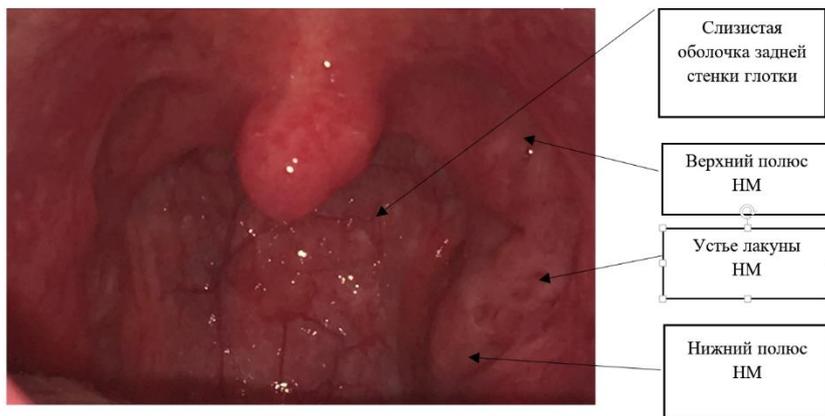


Рисунок 10-Фарингоскопическая картина здорового добровольца

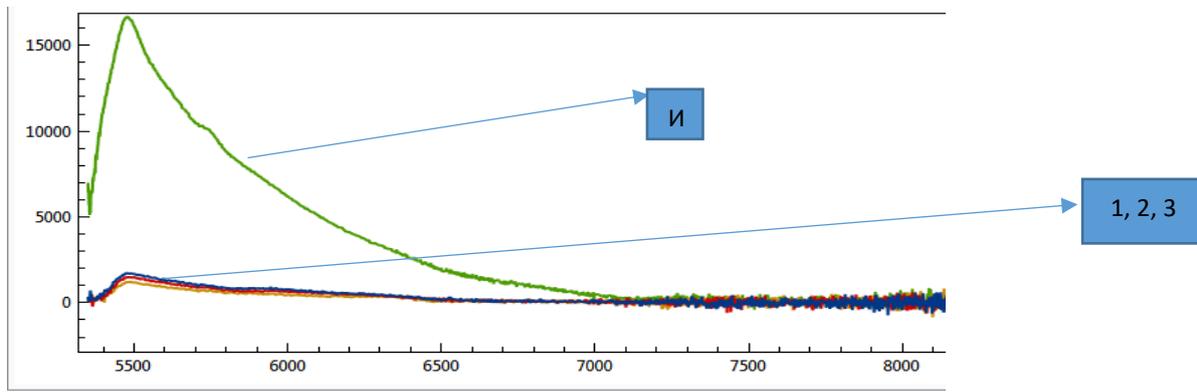


Рисунок 11- Спектры ткани небных миндалин здоровых добровольцев.

И- спектр в интактной точке; 1, 2, 3- спектры в исследуемых точках на поверхности небных миндалин в соответствующих точках. По оси абсцисс - величины длин волн в ангстремах ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ нм}$), по оси ординат - интенсивность флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (ОЕ).

При анализе полученных спектров у здоровых добровольцев (рисунок 11) выявлено, что интенсивность флюоресценции ткани небных миндалин, не вовлеченных в воспалительный процесс, измеренная в разных точках, практически одинакова и крайне низка по интенсивности, по сравнению с амплитудно-спектральными показателями области сравнения (кожные покровы), а именно составляет практически 1/10 от интенсивности флюоресценции в интактной области; дополнительных пиков флюоресценции не регистрируется; структурированность ткани не нарушена; так, отношение интегралов мощности флюоресценции и других параметров (индексов)-практически равно единице в пределах спектров в исследуемых точках, то есть, они практически одинаковые.

При анализе полученных нами спектров флюоресценции тканей глотки здорового человека было выявлено, что среднее значение нормированного показателя флюоресценции индивидуально воспроизводимо и варьирует в изучаемых точках 1, 2, 3. Результаты исследования показали, что в норме НПФ1=0,278, при ХТ КФ НПФ1=0,4768, при ХТ ДФ НПФ1=0,6332, при ГФ НПФ1=2,294.

Фарингоскопическая картина пациента с хроническим тонзиллитом компенсированной формы представлена на рисунке 12. При хроническом тонзиллите отмечаются следующие спектральные особенности (рисунок 13):



Рисунок 12 - Фарингоскопическая картина пациента с хроническим тонзиллитом, компенсированной формы

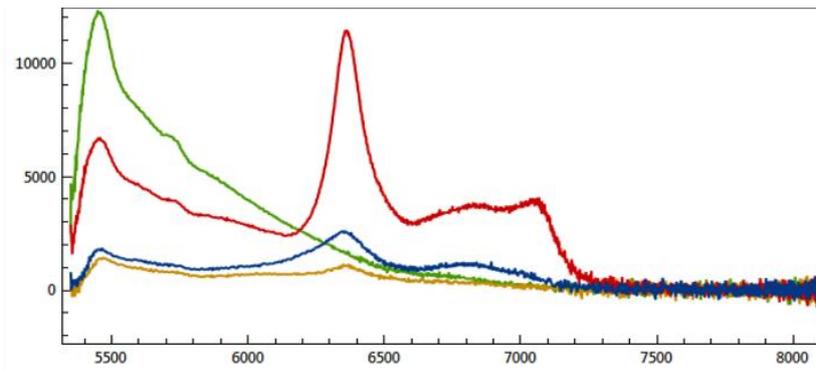


Рисунок 13. Спектры ткани небных миндалин пациентов с хроническим тонзиллитом компенсированной формы. По оси абсцисс-длины волн в ангстремах (10^{-10} м = 1 Å = 0,1 нм); по оси ординат - показатели интенсивности флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (OE).

При анализе спектров тканей глотки было выявлено, что максимальный пик флюоресценции (основного зондирующего сигнала) приходится на величину около 5450 Å (545 нм), что может свидетельствовать в совокупности о микробной обсемененности, степени оксигенации ткани, интенсивности аэробного и анаэробного метаболизма, структурной организации биообъекта, пролиферативной активности клеток и некоторых других показателях. Каждый из данных параметров необходимо выделять и изучать отдельно, однако методом РФС выявляются определенные четкие различия между интактной тканью и тканью небных миндалин и задней стенки глотки, не вовлеченными воспалительный процесс.

При воспалительном процессе в глотке при хроническом тонзиллите (ХТ) на величине 6350 Å (635 нм) появляется дополнительный пик, который не регистрируется у здоровых добровольцев (рисунок 13). Второй (дополнительный) пик на величине 6350 Å (635 нм) может различаться в зависимости от степени микробной обсемененности патологического очага, характера метаболизма и структурированности ткани: он может быть более или менее интенсивным в зависимости от степени выраженности патологического процесса. У более, чем 50% пациентов ХТ мы зарегистрировали дополнительные пики, в том числе, на величинах 6850 Å (685 нм) и 7050 Å (705 нм), что

свидетельствует о регистрации патогенной флоры, повышении концентрации условно патогенной флоры и является признаком дисбиоза. Данное положение было подтверждено результатами ранее проведенных экспериментальных исследований как на монокультурах, так и на ассоциациях микроорганизмов. Было отмечено, что, чем больше концентрация микроорганизмов, тем более выражена интенсивность флюоресценции. Таким образом, при концентрации условно-патогенных возбудителей, превышающей референсные значения, а именно 10^3 - 10^4 КОЕ на грамм ткани, интенсивность флюоресценции растет линейно (рисунок 14).

Составляющую микробной обсеменённости можно проиллюстрировать полученными нами ранее данными (это исследование не входило в задачи настоящей диссертационной работы). Спектры одного из возбудителей ВЗГ в чистой культуре в различной концентрации, полученные при оценке диагностических возможностей метода РФС, приведены на рисунке 14.

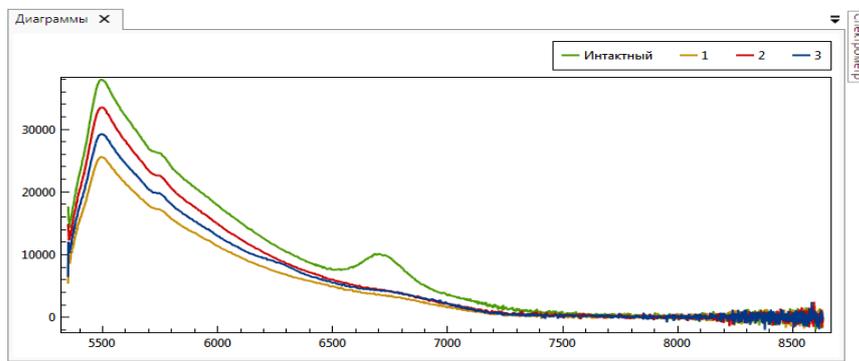


Рисунок 14 – Спектральные характеристики *Klebsiella pneumoniae* 10^7 КОЕ/мл (зеленая линия на рисунке) - чистая монокультура на нефлюоресцирующих подложках (грамотрицательная, факультативно-анаэробная бактерия).

По оси абсцисс-длины волн в ангстремах (10^{-10} м = 1 Å = 0,1 нм); по оси ординат - показатели интенсивности флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (ОЕ); другими цветными линиями обозначены спектры с поверхности той же культуры, на питательной среде в различной концентрации $<10^7$ КОЕ/мл

На рисунке 14 мы видим, что, чем больше концентрация микроорганизмов, тем выше интенсивность флюоресценции, и наоборот. Для каждого вида микроорганизма характерен индивидуальный набор спектральных кривых, однако учитывая, что микрофлора постоянно меняется с течением времени, не вызывает сомнений необходимость разработки метода, позволяющего определять концентрацию микроорганизмов в патологическом очаге в режиме «реального времени» [1].

При гранулезном фарингите методом РФС нами были выявлены характерные изменения спектров глотки по сравнению с нормой (рисунки 15, 16).

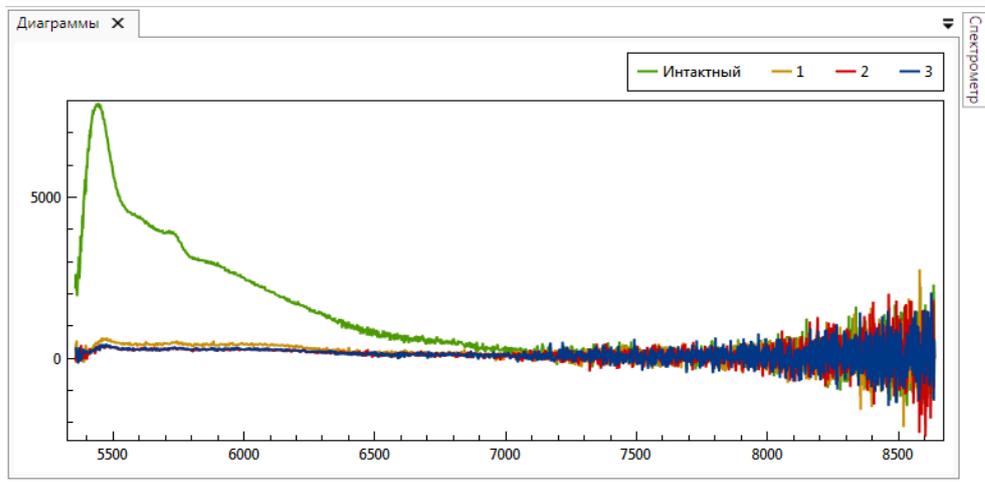


Рисунок 15 – Спектральные характеристики ткани задней стенки глотки здоровых добровольцев

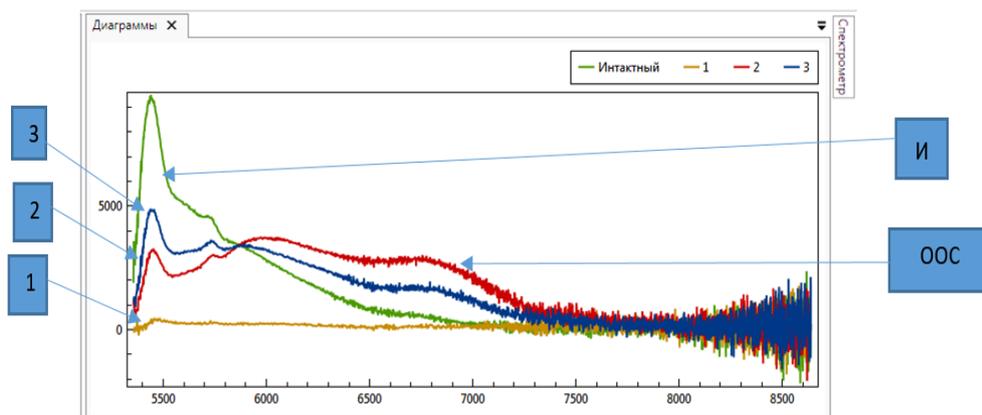


Рисунок 16 – Спектральные характеристики ткани задней стенки глотки при гранулёзном фарингите. По оси абсцисс - величины длин волн в ангстремах ($1 \text{ \AA} =$

0,1 нм), по оси ординат - интенсивность флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (ОЕ). И-спектр в интактной точке, ООС- обратно отраженный сигнал, 1, 2, 3 - спектры в соответствующих исследуемых точках (верхний полюс, нижний полюс, задняя стенка глотки)

Как видно из рисунка 16, при гранулезном фарингите появляется дополнительный пик на величине 5750 Å (575 нм), а также увеличение ширины обратно отраженного сигнала, что свидетельствует о нарушениях морфометрических, метаболических, функциональных параметров тканей, а именно повышается микробная обсемененность патологического очага, нарушаются оксигенация и структура ткани, чего не наблюдается в норме (рисунок 15).

Результаты исследования показали, что в отсутствие воспалительного процесса интенсивность флюоресценции в области задней стенки глотки невысока (в данном случае, не более 500 ОЕ) (рисунок 15), при воспалительном процессе (гранулезном фарингите) отмечается значительное повышение интенсивности флюоресценции, до 5000 ОЕ (рис. 16), нарушение структурированности ткани, о чём свидетельствуют различные величины интенсивности флюоресценции относительно интактной точки. При этом интенсивность флюоресценции ткани небных миндалин выше интенсивности флюоресценции ткани задней стенки глотки (рисунок 13), что может свидетельствовать о более выраженной микробной обсемененности небных миндалин, на основании результатов предварительных исследований [1].

На основании полученных исследований *in vivo* и *in vitro* нами были рассчитаны чувствительность и специфичность метода РФС (результаты представлены в таблице 13):

Таблица 13 – Значения основных характеристики исследуемого метода (РФС)

РФС	Специфичность	Чувствительность
ХТДФ-норма	95,2 %	94,4 %
ХТКФ-ХТДФ	100 %	100 %

На 3-ем этапе нашей работы мы изучали индивидуальные спектральные характеристики в цифровом и графическом виде пациентов с хроническим тонзиллитом компенсированной формы в день поступления в стационар и в день выписки, соответственно, до и после курса стандартного консервативного лечения (промывание лакун небных миндалин 0,02%-ым раствором хлоргексидина № 7, обработка поверхности небных миндалин раствором Люголя, физиотерапия, витаминно- и фитотерапия, применение лизатов бактерий) и сравнивали последние с полученными ранее результатами обследования пациентов с ХТ КФ. Результаты исследования показали, что индексы аэробности, нормированные показатели флюоресценции у данной группы пациентов до и после лечения значительно отличались - интенсивность флюоресценции стала в 2 раза меньше и практически стала приближаться к показателям интактной ткани небных миндалин и, по сравнению с исходными значениями, составила $\frac{1}{4}$ площади под кривой интактной точки, структурированность спектров практически восстановилась, что говорит об эффективности проведенного лечения. Графики спектров ткани небных миндалин до и после консервативного лечения при хроническом тонзиллите представлены ниже (рис. 17, 18).

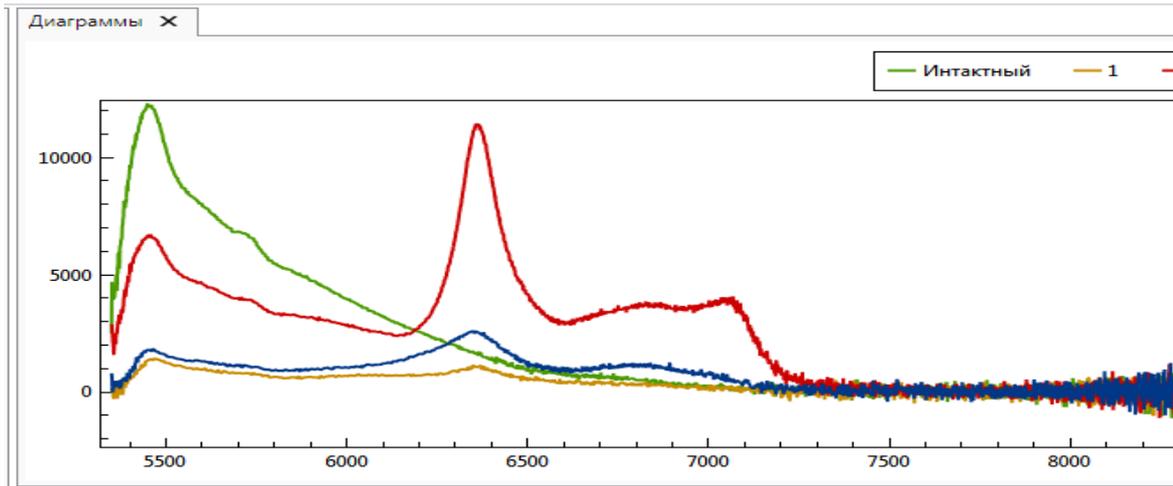


Рисунок 17 – Спектры ткани небных миндалин и интактной точки у больного хроническим тонзиллитом компенсированной формы до лечения. По оси абсцисс – длины волн в ангстремах (10^{-10} м = 1 Å = 0,1 нм); по оси ординат - показатели интенсивности флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (OE), по оси ординат - показатели интенсивности флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (OE).

Из рисунка 17 видно, что интенсивность амплитудно-спектральных показателей флюоресценции, измеренная в разных точках миндалин, разнородна (ткань не структурирована) и близка к таковым же показателям интактных кожных покровов. Обращает на себя внимание наличие дополнительные пиков на величинах 6350 Å (635 нм), 7050 Å (705 нм), описанных выше.

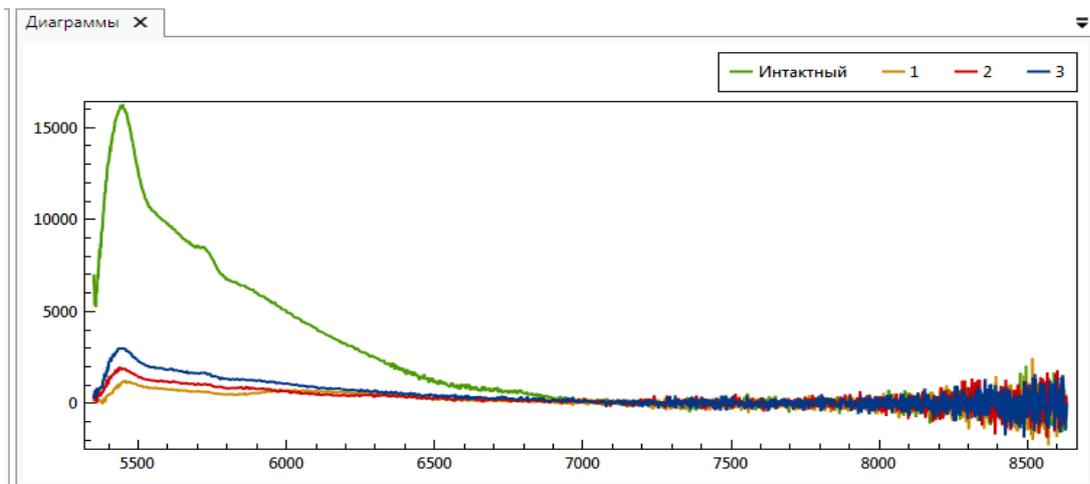


Рисунок 18. Спектральные характеристики пациента с хроническим тонзиллитом компенсированной формы после стандартного курса консервативного лечения-

промывания лакун небных миндалин №7- наиболее типичные графики. По оси абсцисс – длины волн в ангстремах (Å); по оси ординат - показатели интенсивности флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (OE); по оси ординат - показатели интенсивности флюоресценции (I) в относительных (условных) единицах (OE).

Рисунок 18 показывает, что структура, оксигенация ткани небных миндалин нормализовались, индекс аэробности повысился; спектральные данные, свидетельствующие о высокой микробной обсеменённости отсутствуют, максимальный пик флюоресценции лежит в нижней трети кривой, зарегистрированной с поверхности интактной точки, что свидетельствует об уменьшении выраженности воспалительного процесса и восстановлении ткани небных миндалин. Все исследуемые показатели качественно и количественно приближаются к показателям интактной ткани небных миндалин (см. таблицу 14).

Таблица 14 – Индексы аэробности (Air) и нормированные показатели флюоресценции (I) в исследуемых точках 2, 3, 4 больного хроническим тонзиллитом компенсированной формы до (а) и после (б) стандартного курса консервативного лечения. 1 - те же показатели в интактной области

Показатель	Air 4	I 4	Air 3	I 3	Air 2	I 2	Air 1	I 1
До лечения	1,05	0,38	0,9	1,29	1,46	0,19	1,84	5,63E+06
После курса лечения	1,5	0,21	1,55	0,14	1,79	0,08	2,24	6,91E+06

Таким образом, анализируя НПФ в динамике, можно контролировать течение воспалительного процесса в глотке с целью оценки адекватности лечения и, при необходимости, проводить его коррекцию.

3.3 Рамановские характеристики тканей глотки в норме и при воспалительных заболеваниях глотки

Диссертационное исследование включало в себя анализ рамановских спектральных характеристик ткани небных миндалин до и после обработки методами главных компонент, линейного дискриминантного анализа и принципа наименьших квадратов, а также очистки сигнала методом Савицкого-Голея. На рисунках 19 и 20 представлены спектры до обработки вышеперечисленными методами.

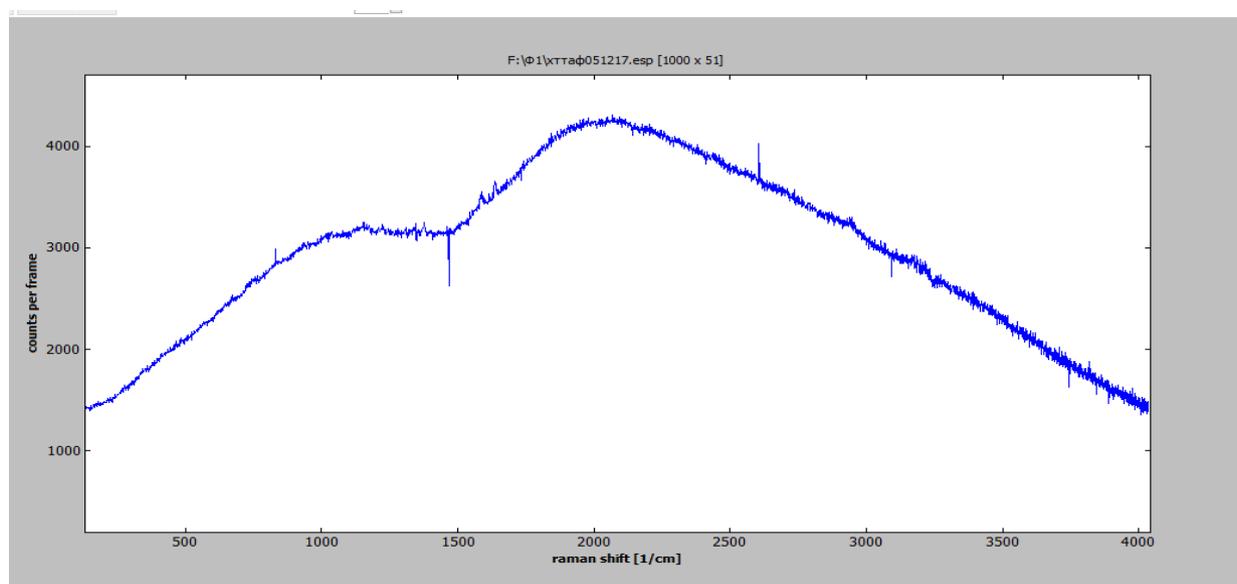


Рисунок 19 – Спектральные характеристики ткани небных миндалин пациента с хроническим тонзиллитом, компенсированной формы.

Показано, что до вышеуказанной обработки основные рамановские пики регистрировались на величинах волновых чисел: 831, 1029, 1148, 1214, 1337, 1368, 1538, 1636, 2604, 2938, 3171, 3259/ см.

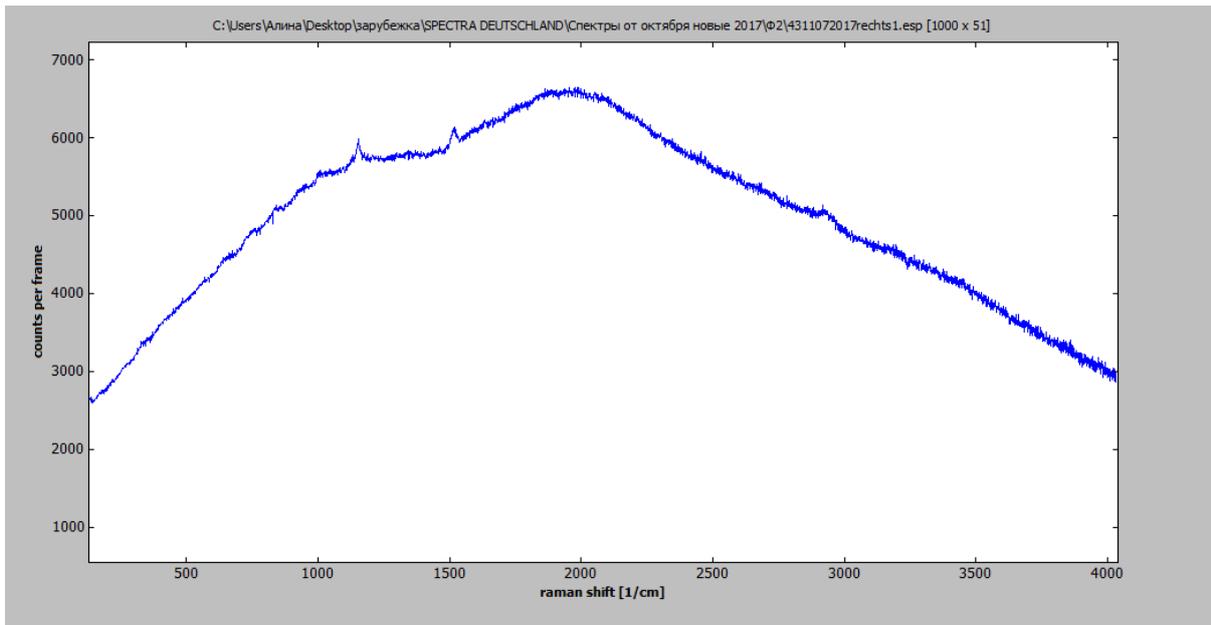


Рисунок 20 – Спектральные характеристики ткани небных миндалин пациента с хроническим тонзиллитом, декомпенсированной формы

Мы получили, что нативно основные рамановские пики регистрировались на величинах волновых чисел: 1150, 1515/ см. Пики на разных величинах свидетельствуют о содержании различных структурных компонентов ткани небных миндалин, концентрация которых в норме и при патологии значительно различается.

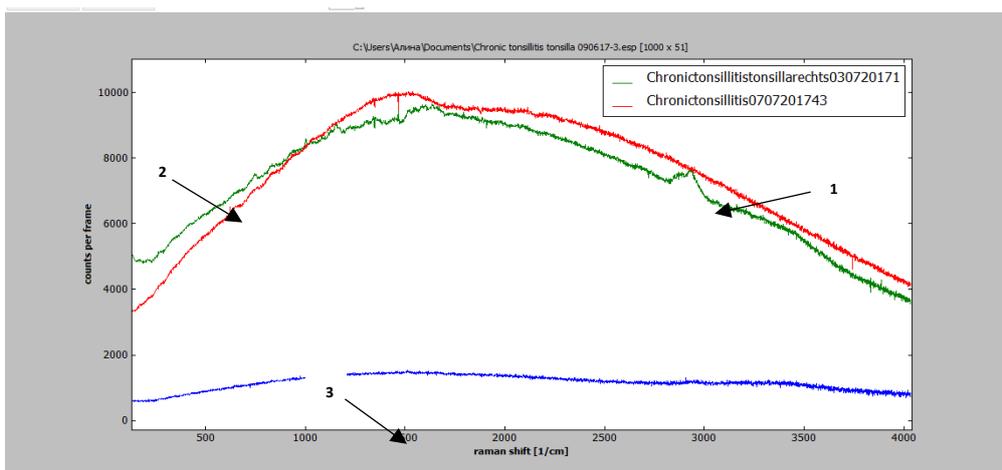


Рисунок 21 – Спектры ткани небных миндалин здорового (3) и пациента с хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы (1-поверхность ткани небной миндалины; 2 - область лакуны небной миндалины)

На рисунке 21 видно, что спектральные кривые без специальной обработки характеризуются значительным увеличением интенсивности флюоресценции при хроническом тонзиллите декомпенсированной формы, появлением дополнительных пиков, отсутствующих у здоровых добровольцев, что может свидетельствовать о нарушении структурированности ткани небных миндалин, повышении микробной обсемененности, изменении оксигенации и других тонзиллярных изменениях на фоне патологии.

Помимо флюоресцентной составляющей, мы изучили возможность применения рамановской составляющей метода РФС в идентификации воспалительного процесса в глотке. Всего был проанализирован 121 спектр с поверхности небных миндалин при хроническом тонзиллите, декомпенсированной и компенсированной форм (61 и 60 спектров, соответственно), а также 69 спектров с поверхности ткани небных миндалин здоровых добровольцев.

В данном случае, разделение методом PLS-DA (метод проекции на латентные структуры+ линейного дискриминантного анализа) проводилось между 2 классами ткани: ткани небных миндалин, не пораженной воспалением, и на фоне хронического воспалительного процесса. На рисунке 22 проиллюстрированы спектральные характеристики ткани небных миндалин здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы после оценки методом главных компонент и методом проекции на латентные структуры. Методы обработки данных, с использованием которых проводился соответствующий анализ спектров, включали в себя: сглаживание, центрирование и нормирование данных и метод выделения сигнала на общем фоне (избавление от флюоресценции). Были выявлены наиболее важные рамановские полосы, являющиеся информативными при дифференцировке нормальной ткани небных миндалин и ткани последних при воспалении (Рисунок 23). На рисунке 23 показано положение селективных рамановских сдвигов, по которым происходит разделение между классами воспаления и

непораженной области. Нахождение и анализ таких линий является важной задачей для интерпретации морфометрических, метаболических и функциональных характеристик ткани, принадлежащих различным классам. Эти рамановские линии характеризуют не только тип выделяемых метаболитов (белков, липидов и др.) при различных диагнозах, но и другие изменения ткани, такие как нарушение структурированности ткани, снижение (увеличение) микробной обсемененности, оксигенации тканей глотки. Выделение наиболее информативных спектральных характеристик в норме и при воспалении представляет значительный интерес для ускоренной идентификации воспалительного процесса и применения данного метода в качестве экспресс-диагностики.

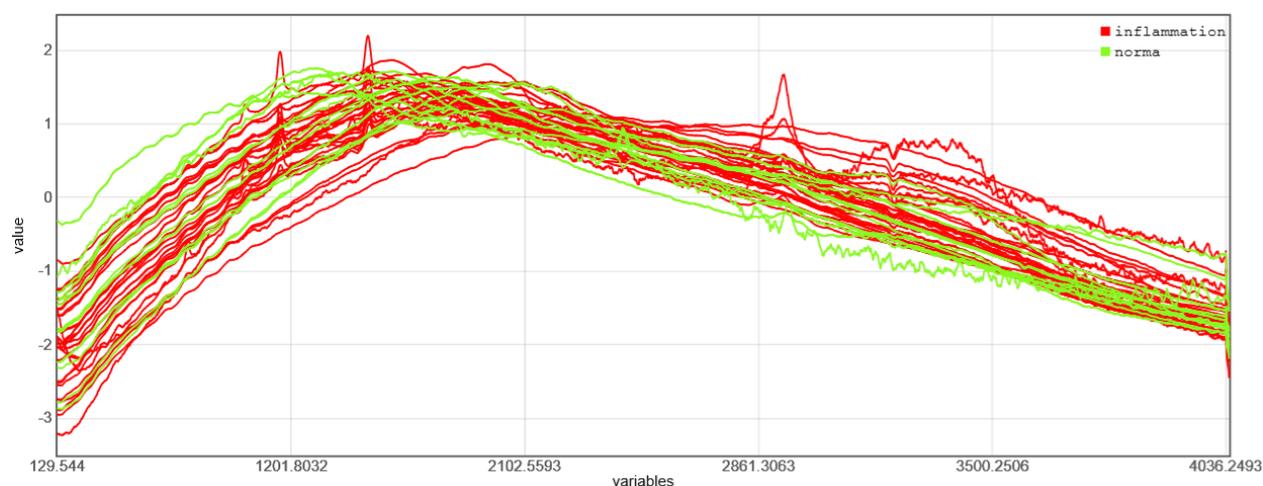


Рисунок 22 – Спектральные характеристики ткани небных миндалин здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы после оценки методом главных компонент и методом проекции на латентные структуры. Красные линии – спектры здорового добровольца, зелёные линии – спектры ткани небных миндалин пациента с ХТ ДФ. По оси абсцисс- волновые числа (обратные сантиметры, $1/\text{см}$), по оси ординат- нормированная интенсивность рамановского рассеяния в относительных единицах (ОЕ).

Таким образом, с использованием рамановской составляющей возможно дифференцировать нормальную и вовлеченную в воспалительный процесс ткань со специфичностью 95, 2%, чувствительностью 94, 4% и точностью 94, 7 %.

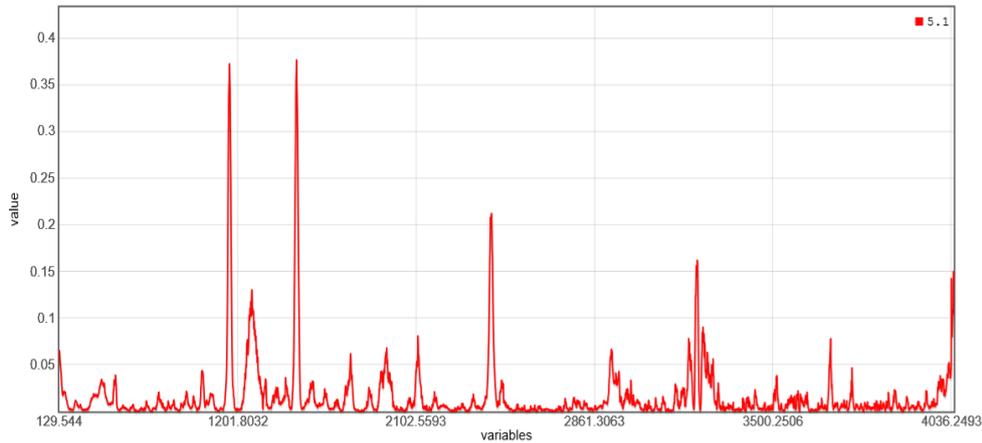


Рисунок 23 – Наиболее информативные рамановские полосы, для дифференцировки воспаления и нормы. По оси абсцисс- волновые числа (обратные сантиметры, 1/см), по оси ординат- нормированная интенсивность рамановского рассеяния в относительных единицах (OE).

На рисунке 24 а проиллюстрированы чувствительность, специфичность, точность метода для вышеуказанной дифференцировки с использованием PCA-анализа.

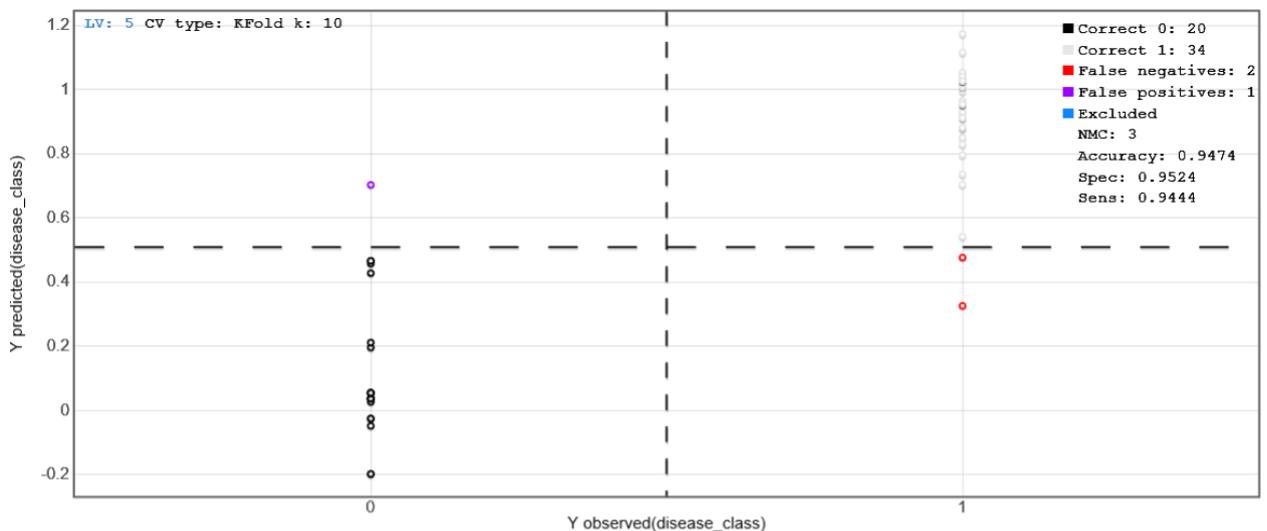


Рисунок 24 а. – Чувствительность, специфичность и точность рамановской составляющей метода РФС–после обработки с использованием метода главных компонент при дифференцировке нормы и воспаления.

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что при воспалительном процессе спектральная кривая ткани небных миндалин при получении ее методом РФС (рамановская составляющая), в отличие от нормы,

приобретает другую форму; изменяется характер и расположение пиков. Амплитуда пиков в норме и при воспалении имеет различные значения. На определенных длинах волн (или волновых числах) при воспалении появляются дополнительные пики, свидетельствующие не только об изменении структуры ткани при воспалительном процессе в глотке, но и качественного химического ее состава, а также оксигенации, количественного содержания определенных метаболитов (липидов, белков, углеводов, в том числе, флюорохромов) в определенной концентрации. Интенсивность флюоресценции также варьирует у здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом и гранулёзным фарингитом, однако более информативными, в данном случае, являются такие характеристики, как амплитуда, ширина рамановских пиков, их количество, длины волн, на которых они регистрируются, их форма, дополнительные сигналы флюоресценции или сглаженность спектральной кривой (либо, напротив, выпуклость). Полученные спектральные данные необходимо анализировать не только качественно, но и производить более точный расчет вышеуказанных величин, в том числе с использованием метода главных компонент, линейного дискриминантного анализа, принципа наименьших квадратов, а также метода проекции на латентные структуры, что и было продемонстрировано в данном исследовании. Между рамановскими спектральными данными тканей небных миндалин различных форм хронического тонзиллита мы также получили некоторые различия (рисунки 19, 20). После обработки результатов вышеуказанными методами мы отметили, что наиболее информативными полосами комбинационного рассеяния (рамановского рассеяния) (метод проекции на латентные структуры и линейный дискриминантный анализ) являются следующие: 573 см^{-1} , 1092 см^{-1} (рисунок 24 б).

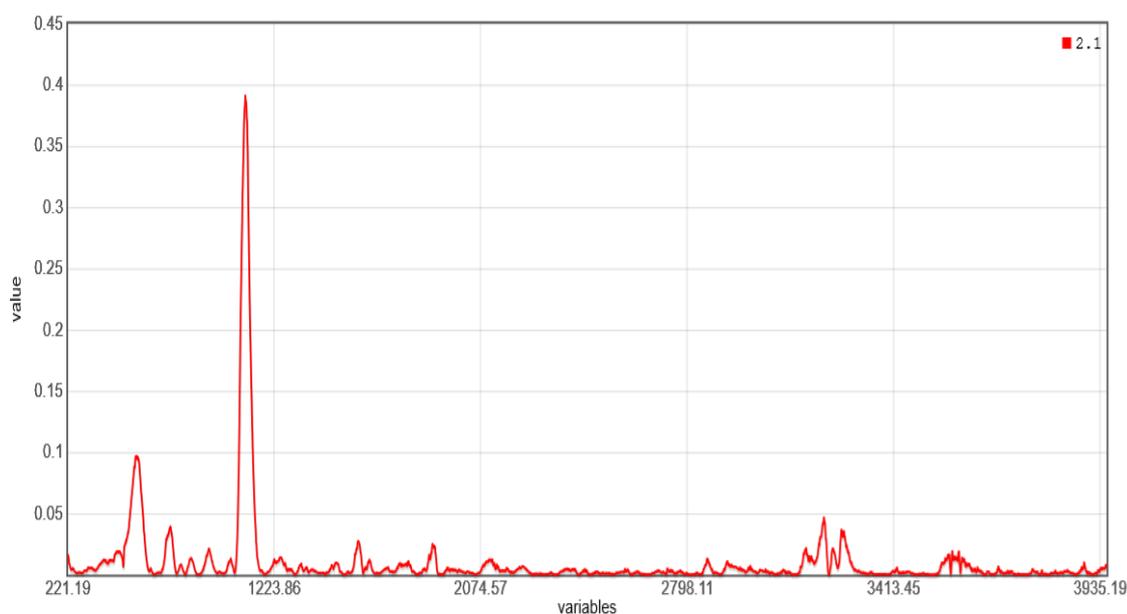


Рисунок 24 б. – Наиболее информативные полосы комбинационного рассеяния (рамановского рассеяния) (метод проекции на латентные структуры и линейный дискриминантный анализ): 573 см^{-1} , 1092 см^{-1}

3.4. Результаты статистической обработки спектральных данных тканей глотки у здоровых добровольцев и пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями глотки

Полученные в исследовании результаты были статистически обработаны с использованием современных методов. Величина ИИ (интенсивности флюоресценции в интактной точке) в нашем исследовании распределена достаточно компактно и симметрично (коэффициент асимметрии 0,142, коэффициент эксцесса (Kurtosis) 0,234), таким образом, для анализа данного показателя мы использовали методы параметрической статистики. Для показателя индекса аэробности в интактной точке (ИАИ) были определены коэффициент асимметрии (2,85) и коэффициент эксцесса (29).

Рисунок 25 иллюстрирует, что в общей выборке есть единичные пациенты с аномально большими и аномально малыми величинами ИАИ, однако кривая характеризуется нормальным распределением Гаусса.

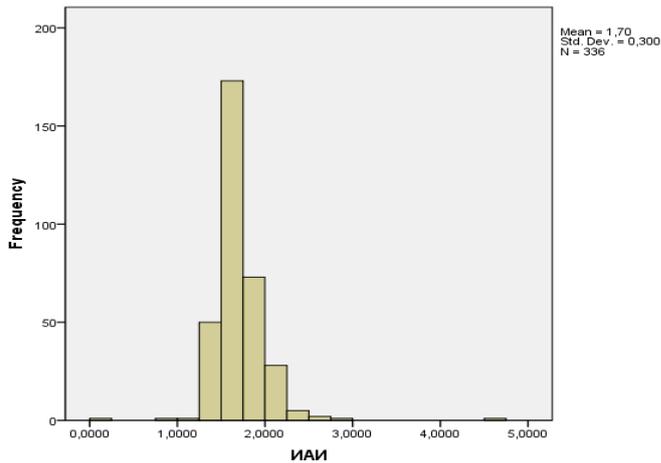


Рисунок 25 – Частотная гистограмма распределения величины ИАИ, где N- число наблюдений, Mean-среднее значение, Std. Dev. – стандартное отклонение.

Непараметрический критерий Крускала-Уоллеса показывает, что различия между группами по распределению величины ИАИ недостоверны, $p=0,05$.

Величины ИИ (интенсивности флюоресценции в интактной точке) и ИАИ (индекса аэробности в интактной точке) положительно коррелируют, коэффициент ранговой корреляции Спирмена равен 0,231 ($p < 0,001$), таким образом, абсолютная интенсивность флюоресценции в интактной точке взаимосвязана и зависима от индекса аэробности в этой точке у конкретного индивидуума. Ниже приведены частотные гистограммы распределения по величинам вышеуказанных индексов. Как видно на рисунках 25-30, распределение может быть, как по Гауссу, так и ненормальным, таким образом, в зависимости от этого, при обработке результатов применяются либо параметрические методы статистики, либо непараметрические.

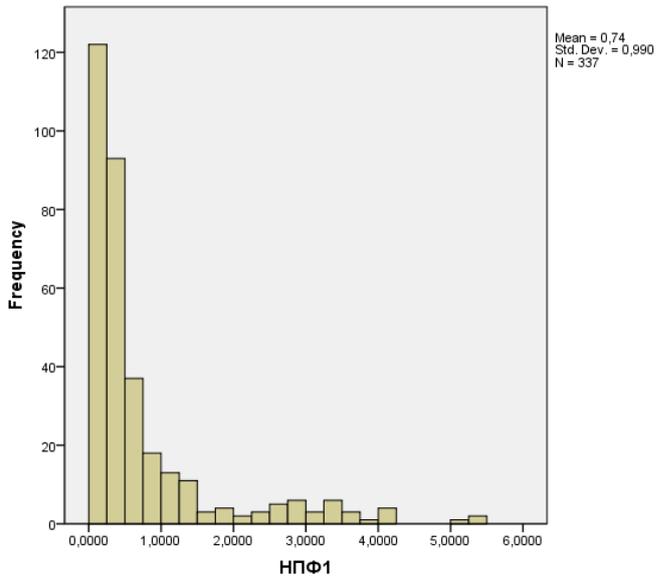


Рисунок 26 – Частотная гистограмма распределения нормированного показателя флуоресценции в точке 1 (0 - 5,5), где N-число наблюдений, Mean-среднее значение и Std. Dev. – стандартное отклонение

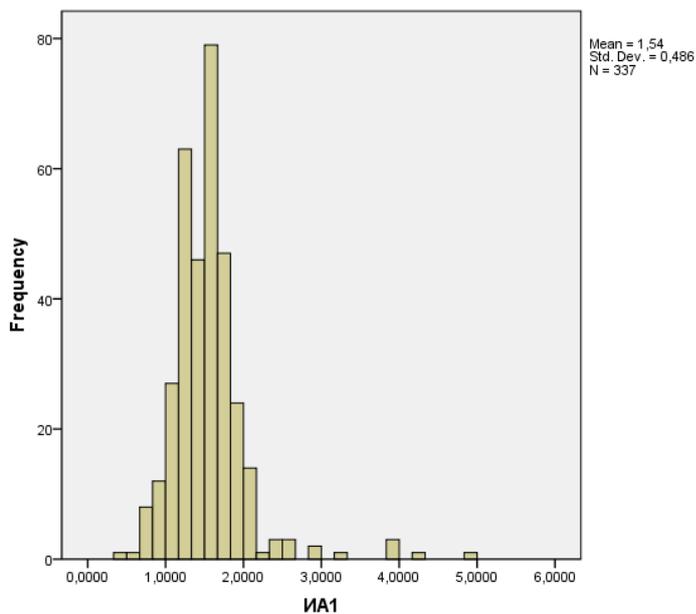


Рисунок 27 – Частотная гистограмма распределения (индекса аэробности в первой точке) -нормальное распределение (по Гауссу), где N=337-число наблюдений, Mean-среднее значение и Std. Dev. – стандартное отклонение

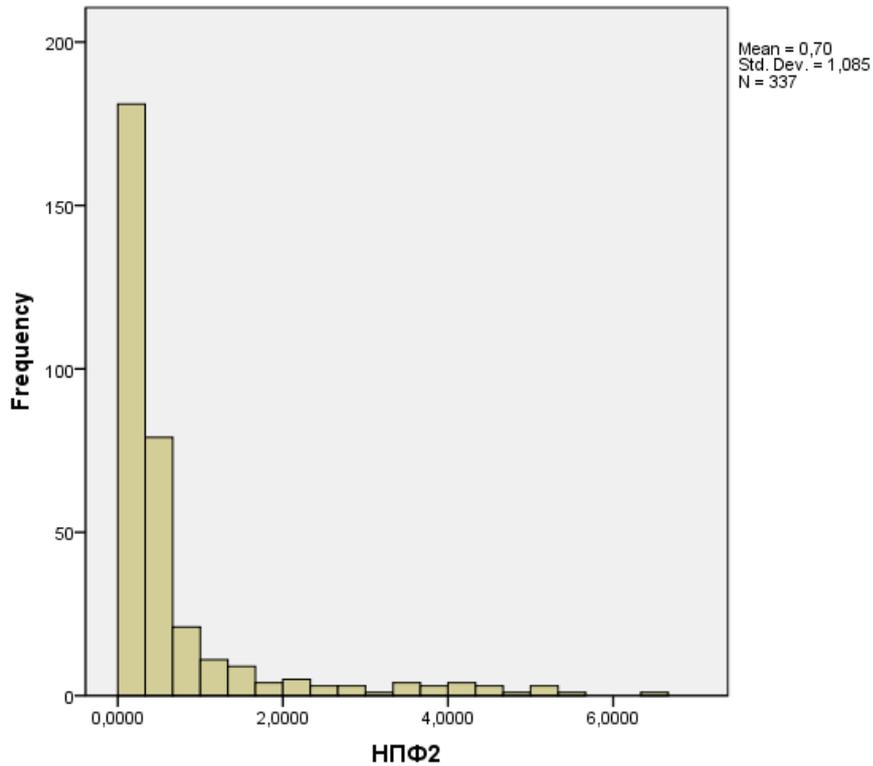


Рисунок 28 – Частотная гистограмма распределения нормированного показателя флуоресценции во второй точке (0 - 5,5), где N=337-число наблюдений, Mean-среднее значение и Std. Dev. – стандартное отклонение

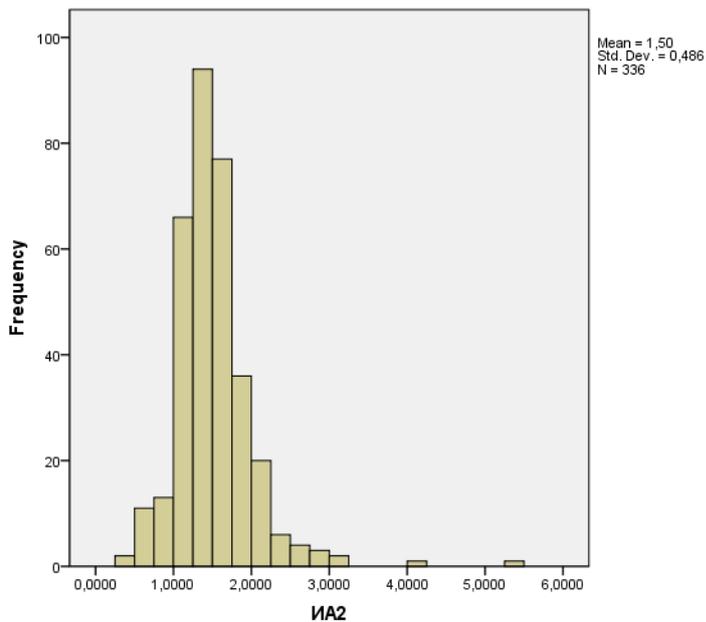


Рисунок 29 – Частотная гистограмма распределения индекса аэробности во второй точке- нормальное распределение (по Гауссу), где N=337-число наблюдений, Mean-среднее значение и Std. Dev. – стандартное отклонение

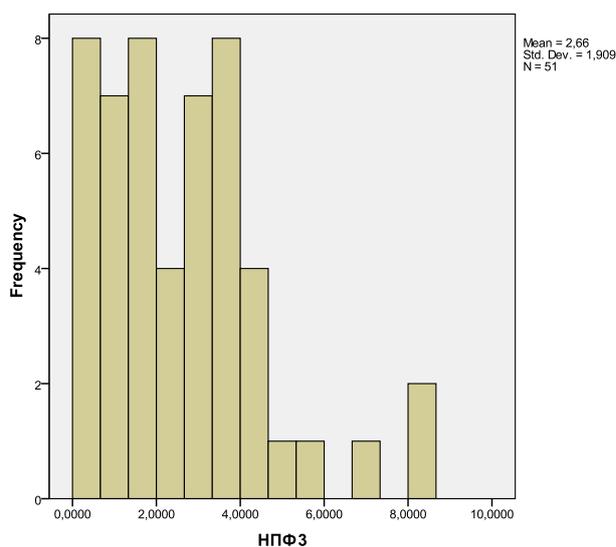


Рисунок 30 – Частотные распределения НПФ 3 у пациентов с хроническим фарингитом. Из рисунка следует, что варьирование НПФ 3 в пределах рассматриваемой группы укладывается в нормальное распределение по Гауссу. Из 51 пациента данной группы значения наблюдались в пределах от 0,219 до 8,38 со средним $2,66 \pm 0,67$ и $\sigma = 1,91$

При статистической обработке данных оценивался не только характер распределения и использовались методы параметрической и непараметрической статистики, но и оценивалась корреляция исследуемых показателей между собой, как проиллюстрировано на рисунках 25-44 и в таблицах 16-18. Между изучаемыми признаками была найдена взаимосвязь различной степени выраженности.

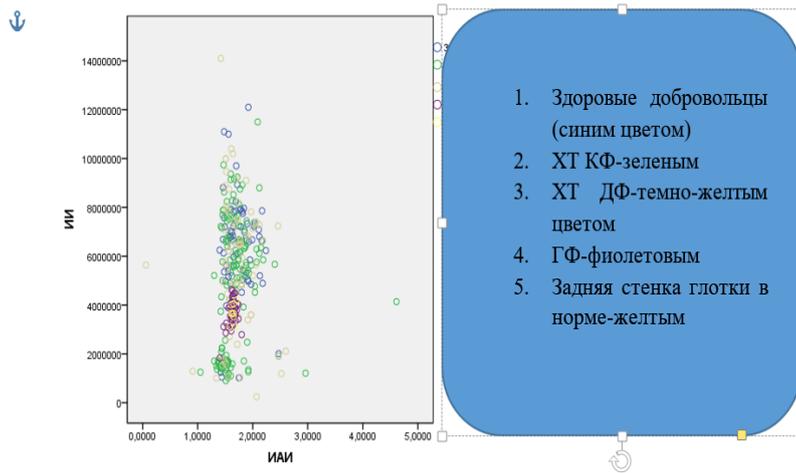


Рисунок 31 – Рисунок совместного распределения величин ИАИ и ИИ. Наиболее сильная связь между изучаемыми показателями наблюдается в группе пациентов с хроническим фарингитом. Достоверных сведений величин ИИ и ИАИ с полом и возрастом не выявлено, то есть данные величины не зависят от пола и возраста

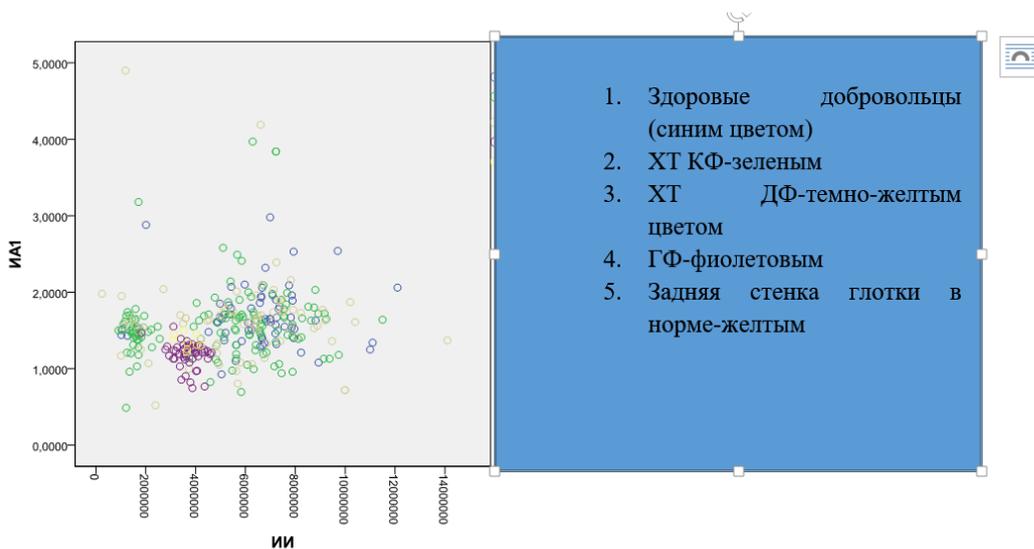


Рисунок 32 – Рисунок совместного распределения величин ИА1 и ИИ

Из рисунка 32 следует, что между интенсивностью флюоресценции в интактной точке и индексом аэробности в точке 1 существует взаимозависимость, однако она относительно слабая так как существует большой разброс между показателями в пределах изучаемых групп. Наиболее сильная связь прослеживается в группе пациентов с хроническим фарингитом.

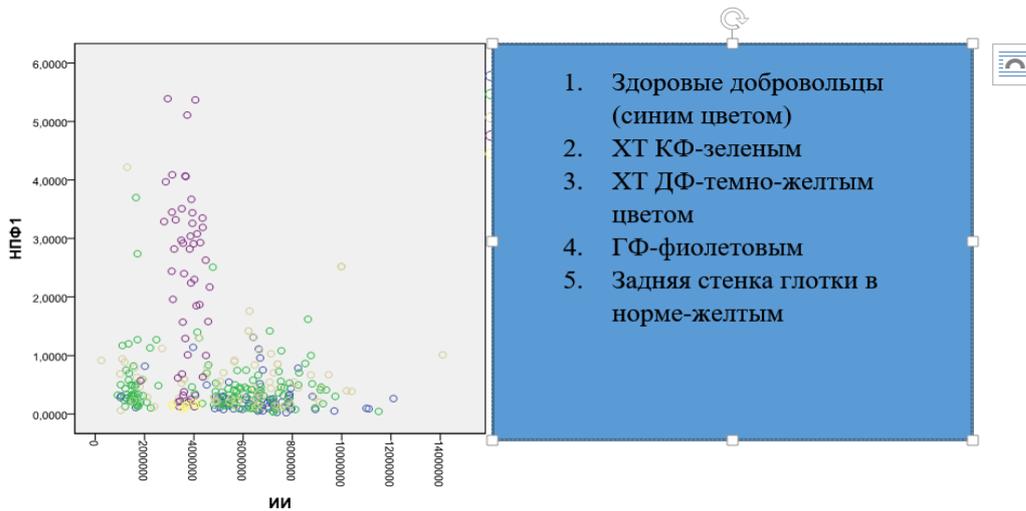


Рисунок 33 – Рисунок совместного распределения величин НПФ1 и ИИ. Из данных, представленных на рис. 33, следует, что взаимосвязь между интенсивностью флюоресценции в интактной точке и НПФ 1 наиболее сильная в группе пациентов с хроническим фарингитом

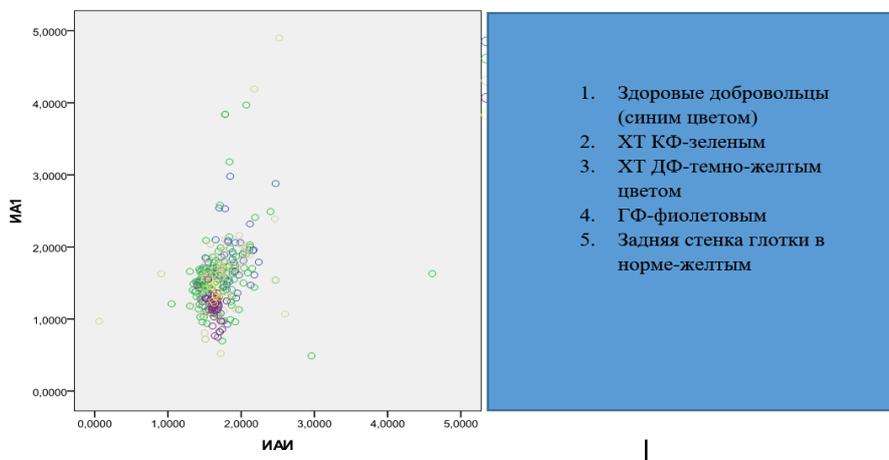


Рисунок 34 – Рисунок совместного распределения величин ИА1 и ИАИ. Из рисунка 34 следует, что ИА1 и ИАИ также взаимозависимы, однако данная связь

средней степени; наиболее сильная она в группе пациентов с хроническим фарингитом.

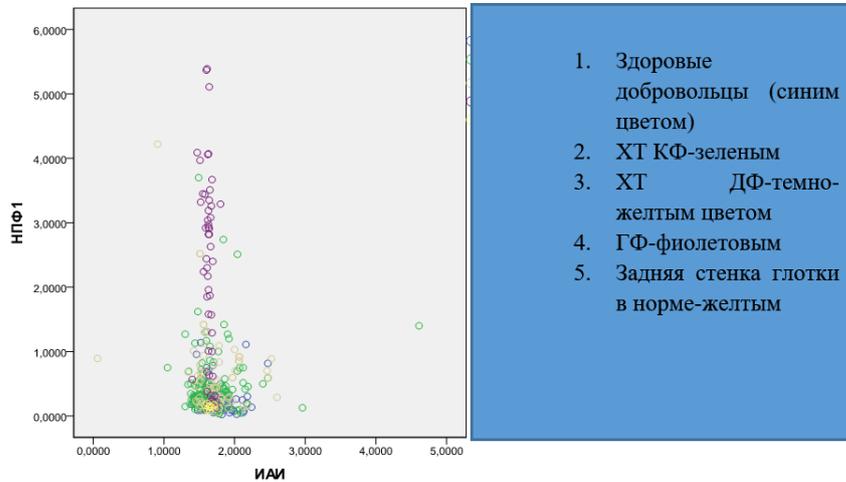


Рисунок 35 – Рисунок совместного распределения величин НПФ1 и ИАИ

На рисунке 35 отмечено, что между изучаемыми показателями (НПФ 1 и ИАИ) наблюдается взаимосвязь средней степени.

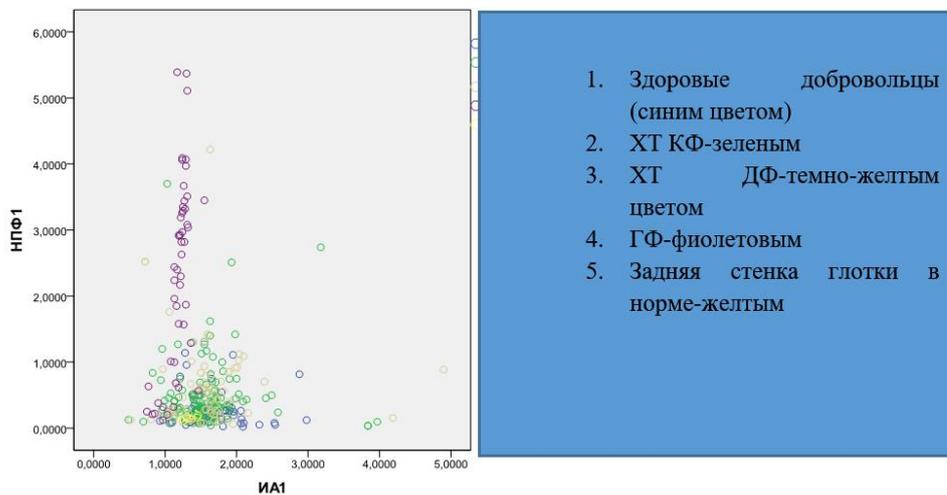


Рисунок 36 – Рисунок совместного распределения величин НПФ1 и ИА1.

Из рисунка 36 следует, что НПФ 1 и ИА1 взаимосвязаны, однако данная связь имеет, скорее, характер обратной зависимости. Наиболее сильная связь прослеживается в группе пациентов с хроническим фарингитом (ГФ).

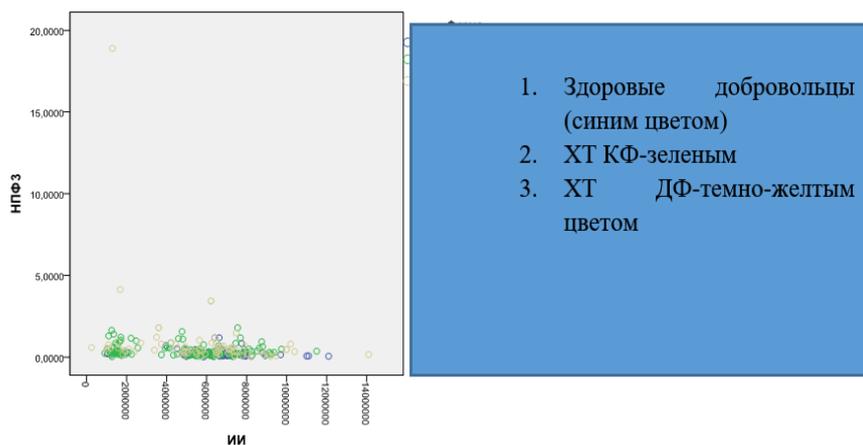


Рисунок 37 – Рисунок совместного распределения величин НПФ3 и ИИ. Синим цветом обозначены параметры здоровых добровольцев, желтым-ХТ ДФ, зеленым-ХТ КФ

Из рисунка 37 следует, что имеется слабая взаимозависимость между НПФ 3 и ИИ в изучаемых группах, также значения НПФ 3 варьируют от 0 до 2, кроме того, имеются некоторые anomalно высокие значения НПФ 3.

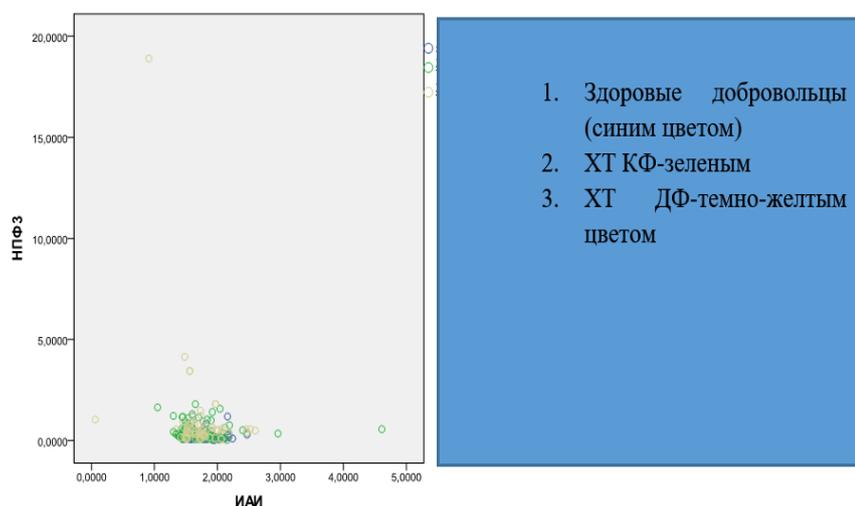


Рисунок 38 – Рисунок совместного распределения величин НПФ3 и ИАИ. Синим цветом обозначены параметры здоровых добровольцев, желтым- показатели в группе ХТ ДФ, зеленым-в группе ХТ КФ.

Из рисунка 38 следует, что взаимозависимость между НПФ 3 и ИАИ имеется, однако она слабая.

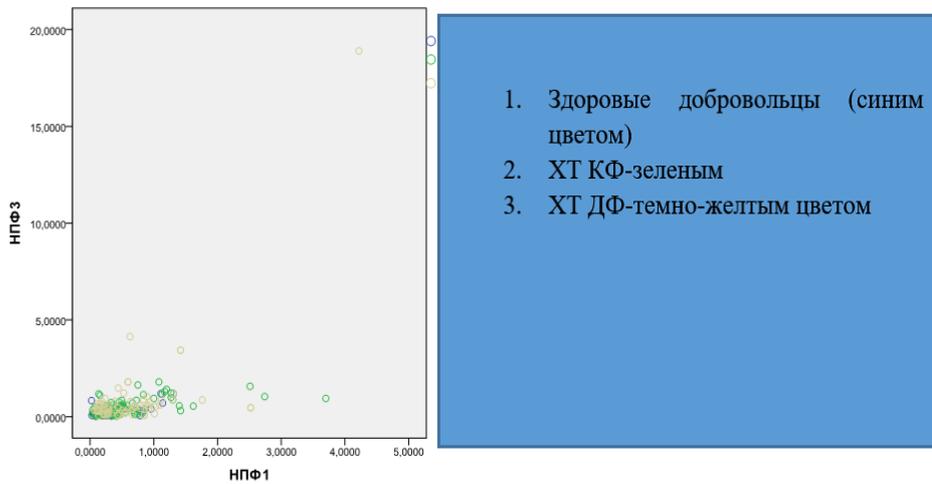


Рисунок 39 – Рисунок совместного распределения величин НПФ1 и НПФ 3. Синим цветом обозначены параметры здоровых добровольцев, желтым-ХТ ДФ, зеленым-ХТ КФ

Из рисунка 39 следует, что НПФ 1 и НПФ 2 взаимосвязаны средней силой, также имеются «выскакивающие варианты» с аномально высокими цифрами НПФ 1 и НПФ 3.

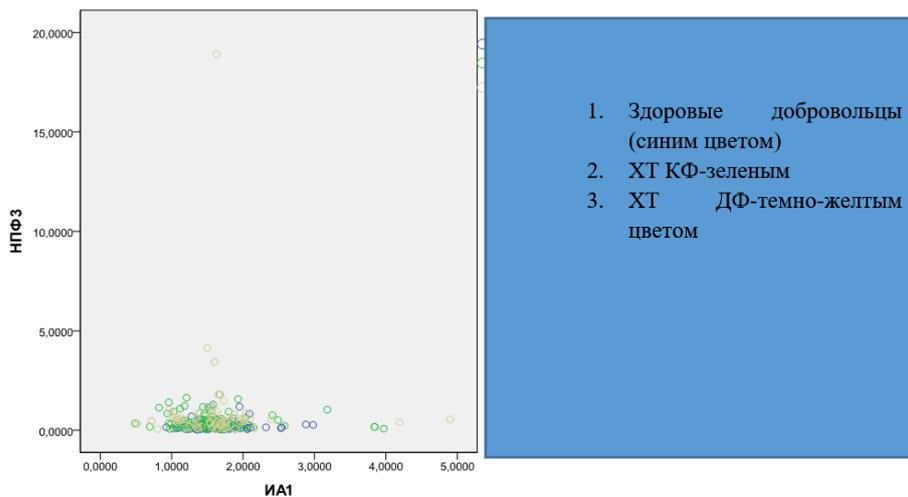


Рисунок 40 – Рисунок совместного распределения величин ИА1 и НПФ 3. Синим цветом обозначены параметры здоровых добровольцев, желтым-ХТ ДФ,

зеленым-ХТ КФ. ИА 1 и НПФ 3, согласно рисунку 40, имеют слабую взаимозависимость; при повышении ИА 1 в некоторых случаях НПФ 3 не меняется.

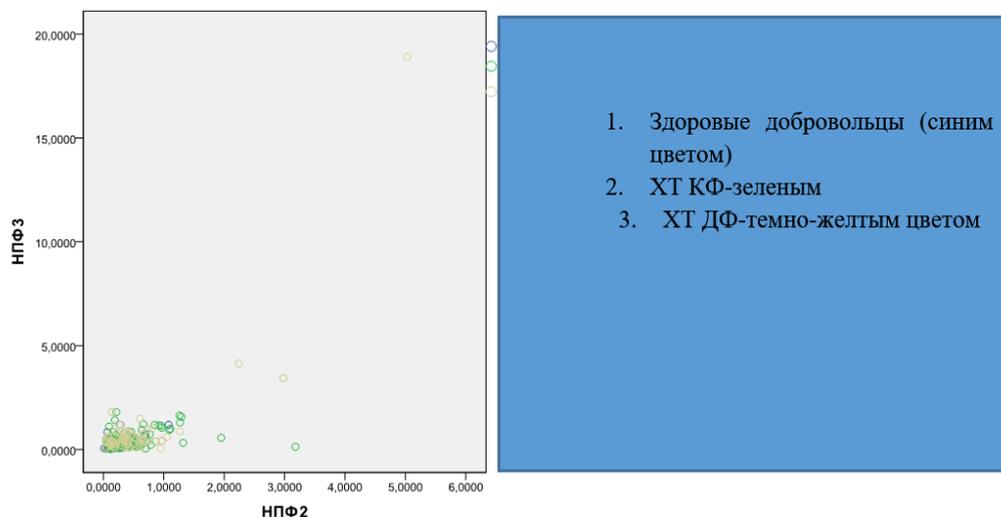


Рисунок 41 – Рисунок совместного распределения величин НПФ2 и НПФ 3. Синим цветом обозначены параметры здоровых добровольцев, желтым-ХТ ДФ, зеленым-ХТ КФ

Из рисунка 41 следует, что НПФ 2 и НПФ 3 взаимосвязаны между собой сильной связью, однако в группах пациентов с хроническим тонзиллитом компенсированной формы и декомпенсированной формы в единичных случаях регистрируются anomalно высокие значения НПФ 2, и НПФ 3 в таких случаях также повышается. Для большинства пациентов группы ХТ ДФ НПФ 2 варьирует от 0 до 1, однако имеются случаи с зарегистрированными anomalно высокими цифрами НПФ 2, достигающими 3, при этом НПФ 3 находится в диапазоне от 0 до 3, с повышением в единичных случаях до 4 отн. ед. У здоровых добровольцев НПФ 3 и НПФ 2 находятся в пределах от 0 до 1.

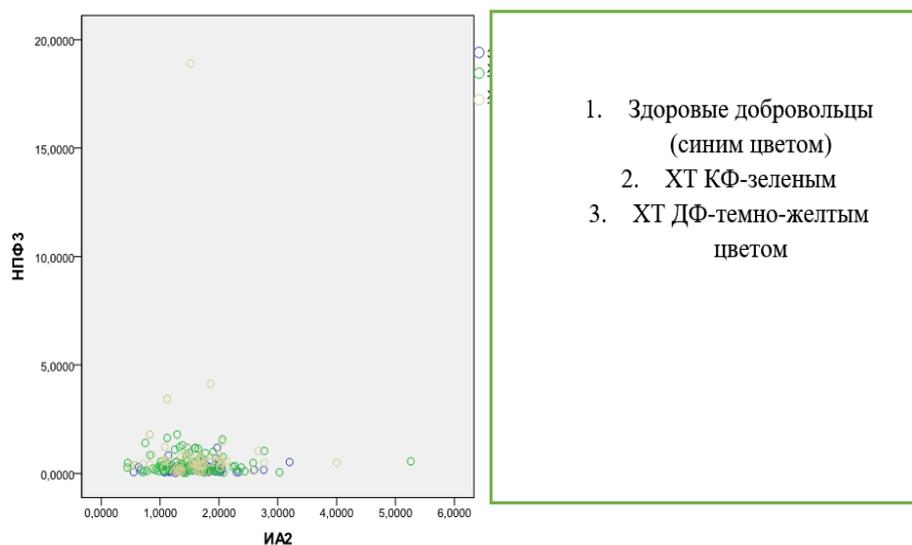


Рисунок 42 – Рисунок совместного распределения величин ИА2 и НПФ 3

Из рисунка 42 следует, что величины ИА 2 в группе здоровых добровольцев находится в диапазоне от 0,5 до 3, в то время как НПФ 3 не выше 1. ИА 2 в группе пациентов с хроническим тонзиллитом КФ находится в диапазоне от 0,5 до 3, однако имеются значения, достигающие 5,5 отн. ед., в то время как НПФ 3 варьирует от 0 до 2 отн. ед. В группе ХТ ДФ ИА 2 находится в диапазоне от 0,5 до 2,8, в то время как НПФ 3 варьирует от 0 до 2, в некоторых случаях достигая 4-4,5 отн. ед.

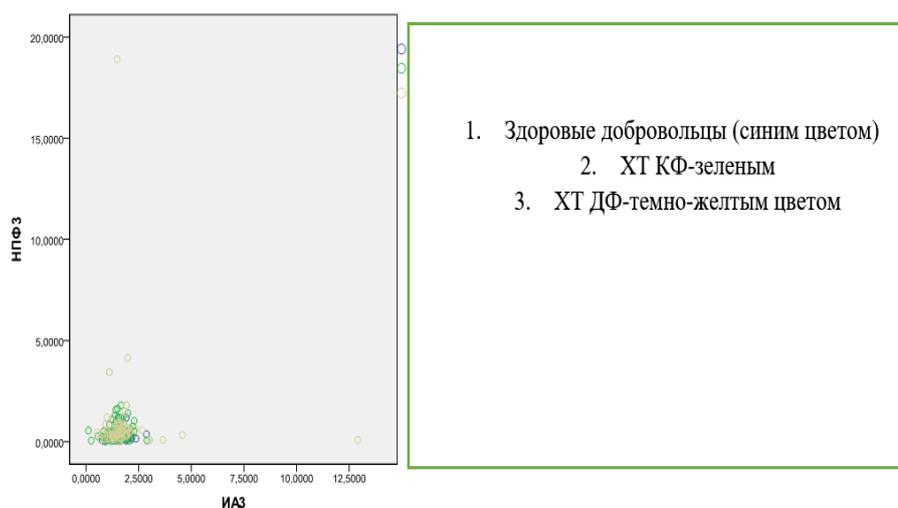


Рисунок 43 – Рисунок совместного распределения величин ИА3 и НПФ 3

Согласно рисунку 43, ИА 3 в группе здоровых добровольцев находится в диапазоне 0,5-2,7, тогда как НПФ 3 – от 0 до 1,3. В группе пациентов с ХТ КФ ИА 3 находится в диапазоне от 0 до 2,4, тогда как НПФ 3 от 0 до 2.

В группе пациентов с ХТ ДФ ИА 3 в пределах 0,5-2,4, тогда как НПФ 3 от 0 до 2, в некоторых случаях достигая 4-4,5.

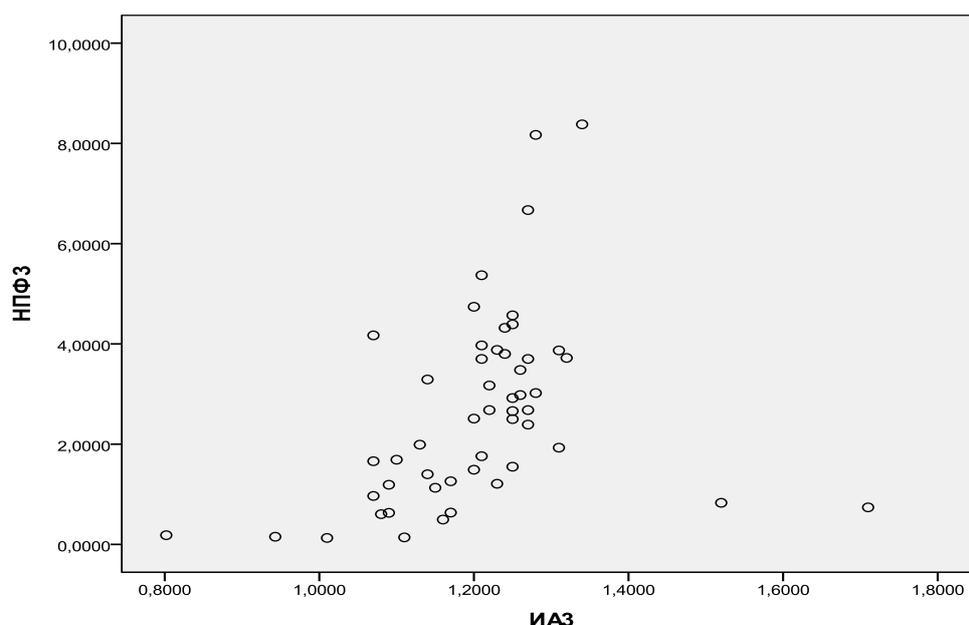


Рисунок 44 – Рисунок совместного распределения показателей НПФ3 и ИА3 у пациентов с гранулезным фарингитом.

Корреляционные связи изучаемых показателей между собой с использованием статистических методов также представлены в таблицах 15-17.

Таблица 15 – Корреляционные связи между показателями интенсивности флюоресценции в интактных точках и у верхнего полюса небной миндалины (точка 1).

Показатель 1	Показатель 2	Коэф. Корреляции	р	Коэфф. Ранговой корреляции	р
Интенсивность флюоресценции в интактной	Индекс аэробности 1	0,142	0,009	0,267	<0,001

точке					
Интенсивность флюоресценции в интактной точке	Нормированный показатель флюоресценции в точке 1	-0,229	0,000	-0,256	<0,001
Интенсивность флюоресценции в интактной точке	Индекс аэробности в интактной точке	0,098	0,073	0,231	<0,001
Индекс аэробности в интактной точке	Индекс аэробности 1	0,309	0,000	0,352	<0,001
Индекс аэробности в интактной точке	Нормированный показатель флюоресценции в точке 1	-0,101	0,063	-0,140	<0,001
Индекс аэробности в точке 1	Нормированный показатель в точке 1	-0,172	0,002	-0,141	<0,001

Таблица 16 – Корреляционные связи величины НПФ 3 у здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом КФ и с ДФ с показателями индекса аэробности в интактной точке, индексов аэробности в точках 1 и 2, а также с нормированными показателями флюоресценции в точках 1 и 2 и показателем интенсивности флюоресценции в интактной точке

Показатель	Коэф. корреляции	p	Коэфф. ранговой корреляции	p
Интенсивность флюоресценции в интактной точке	-0,166	0,006	-0,257	<0,001
Индекс аэробности в интактной точке (ИАИ)	-0,169	0,005	-0,122	0,043
Нормированный показатель в точке 1 (НПФ1)	0,564	0,000	0,501	<0,001

Индекс аэробности в точке 1 (ИА1)	-0,016	0,796	-0,066	0,274
Нормированный показатель в точке 2 (НПФ2)	0,718	<0,001	0,463	<0,001
Индекс аэробности в точке 2 (ИА2)	-0,014	0,814	0,026	0,668
Индекс аэробности в точке 3 (ИА3)	-0,014	0,811	0,111	0,065

Таблица 17 – Корреляционные связи величины НПФ 3 у пациентов с хроническим фарингитом с показателями индекса аэробности в интактной точке, индексов аэробности в точках 1 и 2, а также с нормированными показателями флюоресценции в точках 1 и 2 и показателем интенсивности флюоресценции в интактной точке у пациентов из этой же группы

Показатель	Коэф. корреляции	p	Коэфф. ранговой корреляции	p
ИИ	-0,257	<0,001	-0,038	0,791
ИАИ	-0,122	0,043	-0,423	0,002
НПФ1	0,501	0,000	0,710	<0,001
ИА1	-0,066	0,274	0,231	0,103
НПФ2	0,463	<0,001	0,727	<0,001
ИА2	0,026	0,668	0,227	0,110
ИА3	0,111	0,065	0,509	<0,001

После исследования взаимозависимости изучаемых показателей между собой мы рассчитали средние показатели, а также величины стандартного отклонения, медиан и достоверности (таблицы 15-17).

Исследование нормированного показателя флюоресценции и индекса аэробности в сравниваемых группах (0, 1, 2, 3) на поверхности ткани небных миндалин у верхнего и нижнего их полюсов (в точках 1 и 2)

В таблице 18 представлены нормированный показатель флюоресценции и индекс аэробности в изучаемых точках исследуемых групп. В дифференциации двух форм хронического тонзиллита наиболее информативна точка 3- в лакуне небной миндалины, полученные результаты представлены в таблице 19.

Таблица 18-Сравнение статистических параметров исследуемых величин в подгруппах (M-среднее значение, m –медиана, Min-минимальное значение, Max-максимальное значение, σ -среднеквадратическое отклонение (среднее квадратическое отклонение, среднеквадратичное отклонение, квадратичное отклонение, стандартное отклонение, стандартный разброс)

Форма		НПФ1	ИА1	НПФ2	ИА2
А) Здоровые добровольцы (N=70)	M	0,278	1,6705	0,2122	1,6019
	σ	0,2685	0,3781	0,1656	0,4521
	m	0,0321	0,0452	0,0198	0,054
	Min	0,0222	0,926	0,012	0,55
	Max	1,31	2,98	1,08	3,2
	Me	0,198	1,61	0,1695	1,575
В) Хронический тонзиллит, компенсированная форма (N=131)	M	0,4768	1,5817	0,3968	1,5334
	σ	0,5058	0,5009	0,3948	0,5396
	m	0,0442	0,0438	0,0345	0,0473
	Min	0,0366	0,488	0,0441	0,442
	Max	3,7	3,97	3,18	5,26
	Me	0,336	1,52	0,283	1,485
С) Хронический тонзиллит, декомпенсированная форма (N=76)	M	0,6332	1,6255	0,5506	1,5679
	σ	0,6446	0,6	0,7451	0,5184
	m	0,0739	0,0688	0,0855	0,0595
	Min	0,0614	0,521	0,0452	0,5
	Max	4,22	4,9	5,03	4

	Me	0,4545	1,62	0,368	1,57
D) Хронический фарингит, гранулезная форма (N=51)	M	2,294	1,1865	2,4799	1,1985
	σ	1,4751	0,161	1,6566	0,1321
	m	0,2066	0,0225	0,232	0,0185
	Min	0,124	0,746	0,112	0,747
	Max	5,39	1,55	6,65	1,51
	Me	2,44	1,22	2,13	1,23
Достоверность различий (Манн-Уитни)	A и B	<0,001	0,052	<0,001	0,167
	A и C	<0,001	0,488	<0,001	0,589
	A и D	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	B и C	0,032	0,242	0,115	0,508
	B и D	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	C и D	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Достоверность различий (Колмогоров-Смирнов)	A и B	<0,001	0,283	<0,001	0,294
	A и C	<0,001	0,46	<0,001	0,633
	A и D	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	B и C	0,008	0,106	0,085	0,499
	B и D	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	C и D	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Измерение нормированного показателя флюоресценции и индекса аэробности в точке 3 (лакуна небной миндалины при хроническом тонзиллите и у здоровых добровольцев).

Таблица 19 – Статистические величины НПФ 3 в сравниваемых группах

Форма	M	N	σ	m	Min	Max
Здоровые добровольцы	0,2401	70	0,223	0,0266	0,0245	1,19
Хронический тонзиллит, компенсированная форма	0,4047	131	0,3481	0,0304	0,0313	1,8
Хронический	0,8703	76	2,2164	0,2542	0,0518	18,9

тонзиллит, декомпенсированная форма						
Всего	0,490841	277	1,2097638	0,0726877	0,0245	18,9

Согласно таблице 19, отмечаются достоверные различия между средними значениями НПФ3 в группах здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом компенсированной и декомпенсированной форм. Различия среднего значения достоверны с $p=0,004$.

Статистический анализ результатов исследования показал достоверные различия показателей НПФ 1 и НПФ 2 во всех изучаемых группах, однако значения показателей ИА во всех группах были недостоверны. НПФ 3 во всех группах различался (различия достоверны).

Таким образом, после верификации достоверности результатов по Манну-Уитни и Колмогорову-Смирнову было отмечено, что в группе здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом, компенсированной формой отмечаются различия в значениях нормированных показателей флюоресценции, различия достоверны, и в случае отсутствия воспаления (у здоровых добровольцев) данные показатели в 1,7 (НПФ 1)- 1,9 (НПФ 2) раза меньше, чем при воспалительных изменениях в небных миндалинах при хроническом тонзиллите, компенсированной форме. При декомпенсированной форме хронического тонзиллита значения НПФ 1 и НПФ 2 превышают таковые показатели в отсутствие патологии в 2,28 - 2,59; различия достоверны.

У пациентов с гранулёзным фарингитом отмечались достоверные различия в показателях НПФ 1, НПФ 2 от аналогичных у здоровых лиц, которые при наличии заболевания в 8,25- 11,69 раз превышают соответствующие значения в норме.

У пациентов с хроническим тонзиллитом, компенсированной формы и декомпенсированной формы различия в соответствующих точках ИА1, ИА2, НПФ1, НПФ2 не были достоверными, в то время как в точке 3-НПФ3 отмечались достоверные различия.

У больных хроническим тонзиллитом как компенсированной, так и декомпенсированной форм и хроническим фарингитом гранулезной формы имеются достоверные различия показателей во всех точках: ИА1, ИА2, НПФ1, НПФ2. Показатель НПФ1 при ХФ в 4,81 больше, чем при ХТ КФ, ИА 1 в 1,33 раза меньше при ХФ, НПФ 2 в 6,25 раз больше при ХФ, чем при ХТ КФ, а также ИА2 в 1,279 раза больше при ХТ КФ, чем при ХФ. Также отмечаются достоверные различия между средними значениями НПФ3 у здоровых добровольцев, пациентов с хроническим тонзиллитом компенсированной формы и пациентов с хроническим тонзиллитом декомпенсированной формы.

Также отмечаются достоверные различия в соответствующих точках при хроническом тонзиллите, декомпенсированной форме и хроническом фарингите, гранулезной форме, таким образом, что НПФ 1 в 3,623 раза при ХФ больше, чем при ХТ ДФ, ИА 1 в 1,37 раза больше при ХТ ДФ, чем при ХФ, НПФ 2 в ,5 раза больше при ХФ, чем при ХТ ДФ, ИА 2 в 1,31 раза больше при ХТ ДФ, чем при ХФ.

На основании представленного моделирования (рисунки 25-42, таблицы 15-18), нами сформулированы основные закономерности взаимозависимости наиболее информативных параметров друг от друга:

1. Интенсивность флюоресценции, нормированный показатель флюоресценции, индекс аэробности в исследуемых точках в пределах групп пациентов взаимосвязаны;
2. В каждой из исследуемых групп наблюдается взаимозависимость данных параметров различной силы. Наиболее сильная зависимость прослеживается в группе пациентов с хроническим фарингитом;

3. В группах здоровых добровольцев, а также пациентов с хроническим фарингитом наблюдается наименьший разброс значений показателей ИФ, НПФ, ИА, как в интактной точке, так и в исследуемых точках в области небных миндалин и задней стенки глотки;
4. различия в индексах аэробности ИА 1 и ИА 2 в исследуемых группах были недостоверны;
5. нормированные показатели флюоресценции в изучаемых группах НПФ 1 и НПФ 2 во всех изучаемых группах были различны, и различие было достоверно;
6. у здоровых добровольцев показатели НПФ в 1,7 (НПФ 1) - 1,9 (НПФ 2) раза меньше, чем при воспалительных изменениях в небных миндалинах при хроническом тонзиллите, компенсированной форме.
7. при хроническом тонзиллите, ДФ значения НПФ 1 и НПФ 2 превышают таковые показатели в норме в 2,28-2,59; различия достоверны.
8. в группе пациентов с гранулезным фарингитом отмечаются достоверные различия в показателях НПФ 1, НПФ 2, которые при наличии заболевания в 8,25- 11,69 раз превышают соответствующие значения в норме.
9. формы «Хронический тонзиллит, компенсированная форма» и «Хронический тонзиллит, декомпенсированная форма» не имеют в соответствующих точках ИА1, ИА2, НПФ1, НПФ2- достоверных различий.
10. между соответствующими показателями при хроническом тонзиллите, КФ и гранулезном фарингите имеются достоверные различия во всех точках: ИА1, ИА2, НПФ1, НПФ2 и показатель НПФ1 при ХФ в 4,81 больше, чем при ХТ КФ, ИА 1 в 1,33 раза меньше при ХФ, НПФ 2 в 6,25 раз больше при ХФ, чем при ХТ КФ, а также ИА2 в 1,279 раза больше при ХТ КФ, чем при ХФ.
11. отмечаются достоверные различия в соответствующих точках при хроническом тонзиллите декомпенсированной формы и хроническом фарингите ГФ, таким образом, что НПФ 1 в 3,623 раза при ХФ больше, чем при ХТ ДФ, ИА 1 в 1,37 раза больше при ХТ ДФ, чем при ХФ, НПФ 2 в 4,5 раза больше при ХФ, чем при ХТ ДФ, ИА 2 в 1,31 раза больше при ХТ ДФ, чем при

ХФ. В большинстве случаев НПФ 3 в данной группе находится в диапазоне от 0 до 4,5, однако может достигать и 8,5 отн. ед

12. НПФ 3 в группе здоровых добровольцев в 1,7 раза меньше, чем в группе пациентов с ХТ КФ, а также в 3,6 раза меньше, чем в группе ХТ ДФ, тогда как НПФ 3 в группе пациентов с ХТ КФ в 2,2 раза меньше, чем в группе пациентов с ХТ ДФ.

13. Для большинства исследуемых ИА1 варьирует от 0,5 до 4 в группе пациентов с ХТ КФ, причем НПФ 3 в данном случае не превышает 2, однако в группе пациентов с ХТ ДФ может достигать 2 в единичных случаях. У здоровых добровольцев ИА1 находится в диапазоне от 1 до 3, причем НПФ 3 в данном случае не превышает 1.

Результаты статистической обработки полученных данных выявили положительную взаимосвязь средней силы в исследуемых группах пациентов между индексами ИИ, ИА и НПФ 2, между НПФ 1 и НПФ 2; слабую взаимозависимость между НПФ 3 и ИИ, ИАИ, ИА 1, сильную взаимозависимость между индексами НПФ 2 и НПФ 3.

3.5 Алгоритм диагностики воспалительных заболеваний глотки с использованием метода РФС

В результате исследования нами был разработан алгоритм диагностики воспалительных заболеваний глотки с использованием метода РФС, который представлен на рисунке 45:

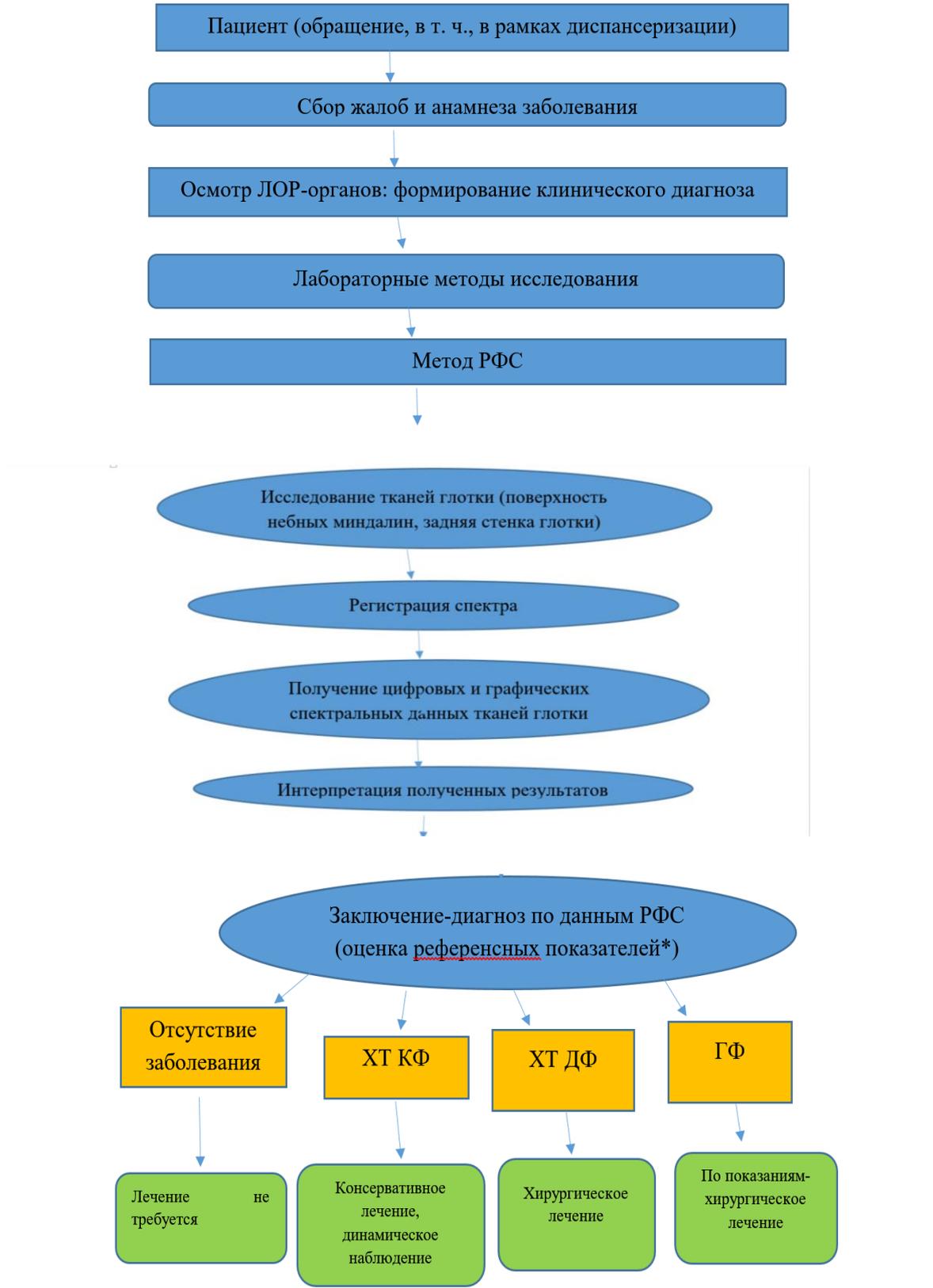


Рисунок 45 – Алгоритм диагностики воспалительных заболеваний глотки с использованием метода РФС.

3.5 Перспективы применения метода раман-флюоресцентной спектроскопии в оториноларингологии

Микробиологическое исследование.

Для оценки информативности применения раман-флюоресцентных медицинских технологий в отношении воспалительных заболеваний глотки нами в серии экспериментов были проведены измерения чистых культур: *Ps. aeruginosa*, *E.coli*, *S. Aureus* в водных растворах. Измерения проводились на только что приготовленных культурах, а также через один и через 2 дня. Ниже, на рисунке 46 представлены спектры возбудителя- синегнойной палочки, концентрация которой с течением времени может изменяться, так же, как и сигнал флюоресценции.

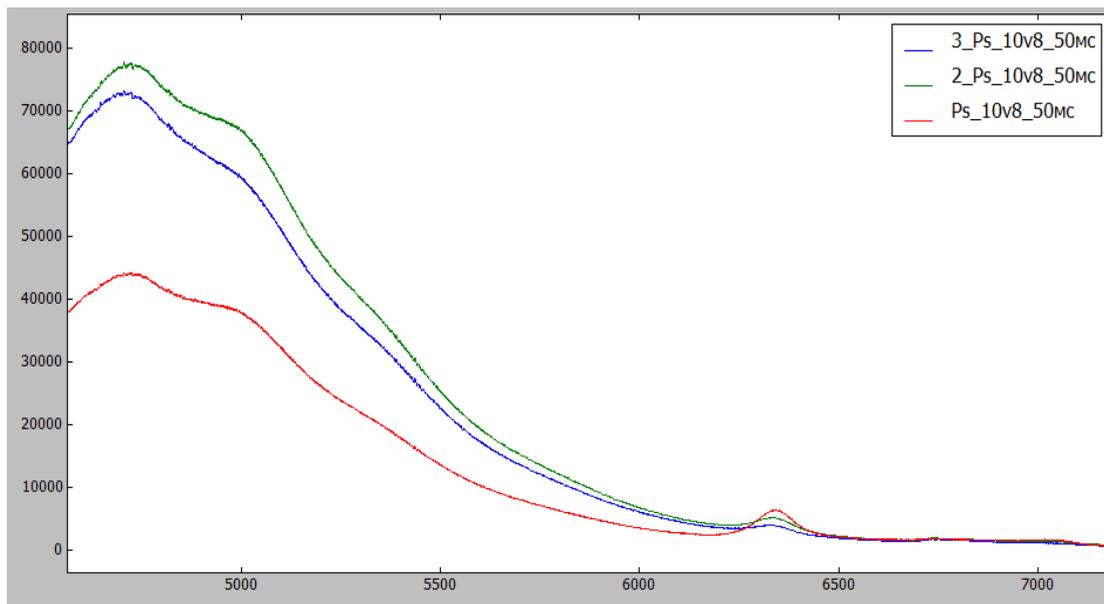


Рисунок 46 – Спектры синегнойной палочки в первоначальной концентрации 10^8 КОЕ/мл. Красный спектр – свежая культура, зеленый спектр – через 1 день, синий спектр- через 2 дня. Как мы видим на рисунке 46, сначала интенсивность флуоресценции возрастает, так как увеличивается концентрация микроорганизмов (в течение суток)-зеленая линия, затем мы можем наблюдать, что интенсивность флуоресценции начинает падать, так как после фазы стагнации, когда дальнейшего роста концентрации возбудителей не происходит,

далее интенсивность флюоресценции снижается (синяя линия), так как происходит гибель микроорганизмов (угнетение их своими же продуктами обмена), что мы и наблюдаем на данном рисунке.

Аналогичные результаты были получены и в отношении других микроорганизмов. В ЛОР-практике, так же, как и в других направлениях клинической медицины, данный эффект можно применять для качественного и количественного анализа микрофлоры (как патогенной, так и условно-патогенной) в патологическом очаге; своевременного назначения антибактериальной терапии; оценки выздоровления пациента (оценка концентрации микрофлоры в динамике).

Для оценки информативности применения раман-флюоресцентных медицинских технологий нами *in vitro* были получены основные спектральные особенности некоторых колонизирующих глотку микробов (рисунки 47 а, б).

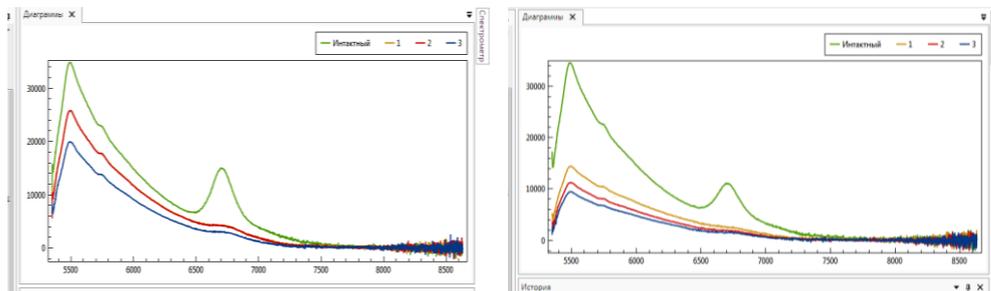


Рисунок 47 а – Спектральные характеристики микроба *Staphylococcus aureus*-чистая монокультура на нефлюоресцирующих подложках.

Рисунок 47 б – Спектральные характеристики микроба *Streptococcus pneumoniae*) чистая монокультура на нефлюоресцирующих подложках.

Изучение действия детергента на микроорганизмы (экспресс-метод определения эффективности антибактериальных препаратов методом РФС)

Один из главных механизмов действия детергента (мирамистина) на микроорганизмы-это разрушение мембраны, когда происходит выход структурных элементов микроорганизмов и их метаболитов в раствор. Данный

эффект может быть подтвержден с использованием оптических методов [1; 119], когда наблюдаются усиление флюоресценции раствора и усиление сигнала рассеивания. При нахождении флюорохромо́в внутри клетки после воздействия и поглощения внешнего фотона, последние переходят в возбужденное состояние. Однако в окружении флюорохромо́в находится большое количество белков, поэтому происходит безызлучательное перераспределение энергии, таким образом, сигнал флюоресценции будет не интенсивным. При переходе флюорохромо́в в среду, основная часть поглощенной энергии излучается в виде фотонов, таким образом, флюоресценция микроорганизмов увеличивается. Под действием детергента составные элементы клеток выходят в раствор, таким образом, увеличивается мутность раствора. Зарегистрировать данный эффект можно с использованием турбидиметра. В ходе экспериментов было отмечено, что мутность раствора, содержащего микроорганизмов, при добавлении мирамистина возрастает в 1,5-2 раза. Кроме того, при использовании раствора мирамистина 0,1%-ного в исследованиях *in vivo* было отмечено значительное увеличение интенсивности наиболее информативной люминесцентной линии, которое уменьшалось с течением времени. Данный эффект можно применять в оториноларингологической практике при оценке эффективности антибактериальной терапии.

Также нами были проведены предварительные исследования *in vitro* методом раман-флюоресцентной спектроскопии тканей с воспалительным процессом и опухолевым ростом. Некоторые из соответствующих спектров представлены ниже на рисунках 48-51.

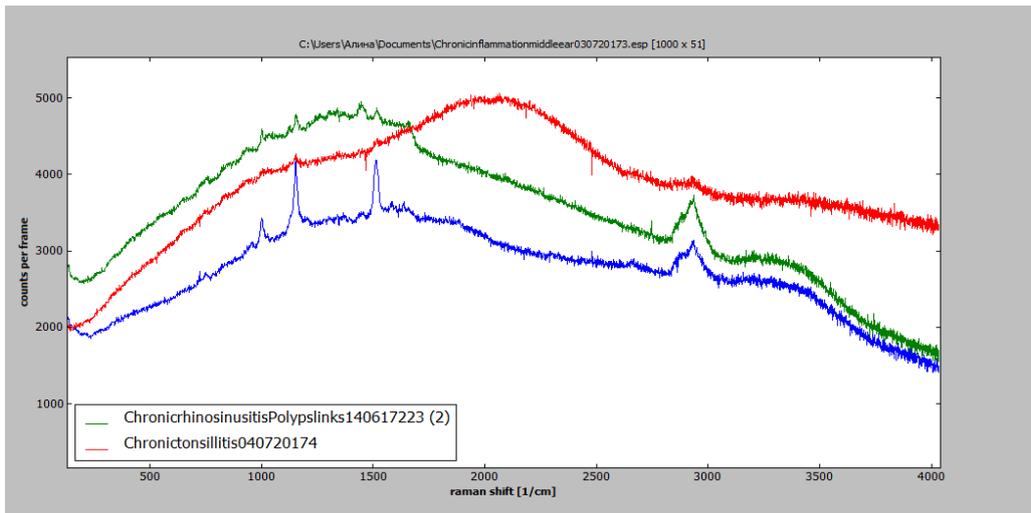


Рисунок 48 – Спектры ткани небных миндалин при хроническом тонзиллите (отмечено на рисунке красным) в сравнительном аспекте со спектрами при других воспалительных заболеваниях ЛОР-органов, а именно со спектрами полипозной ткани при хроническом риносинусите (зеленым цветом) и хроническом гнойном среднем отите (синим цветом).

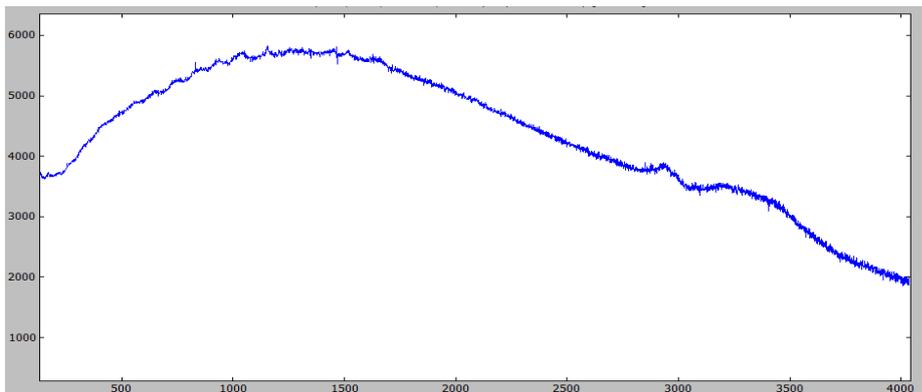


Рисунок 49 – Спектр интактной ткани глотки, окружающей опухолевую ткань. Характерный пик на 2950/см, отсутствие дополнительных пиков позволяет отличить данную кривую от спектров при воспалении или опухолевом процессе.

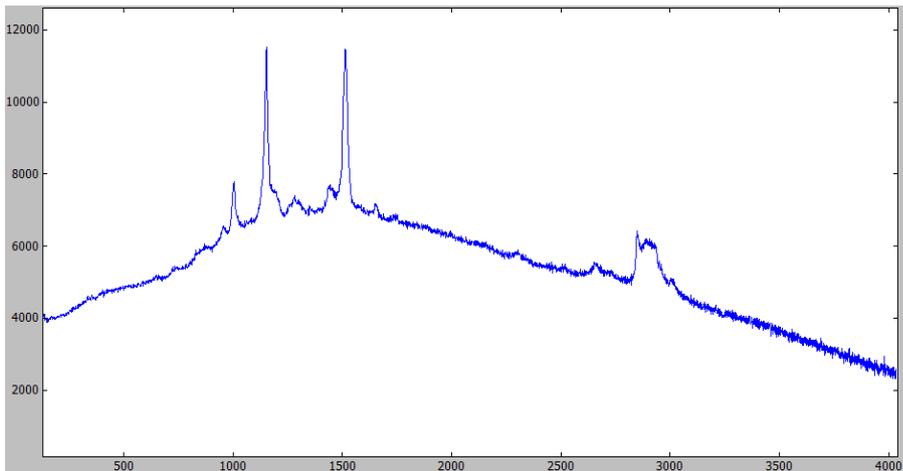


Рисунок 50 – Спектр ткани глотки переходном от хронического воспалительного процесса в плоскоклеточную карциному глотки. Высокоамплитудные пики с пиковой интенсивностью 11800 отн. ед. регистрируются на 1150, 1500/см, также регистрируется пик на 1000/см и трапециевидный пик на 2950/см..

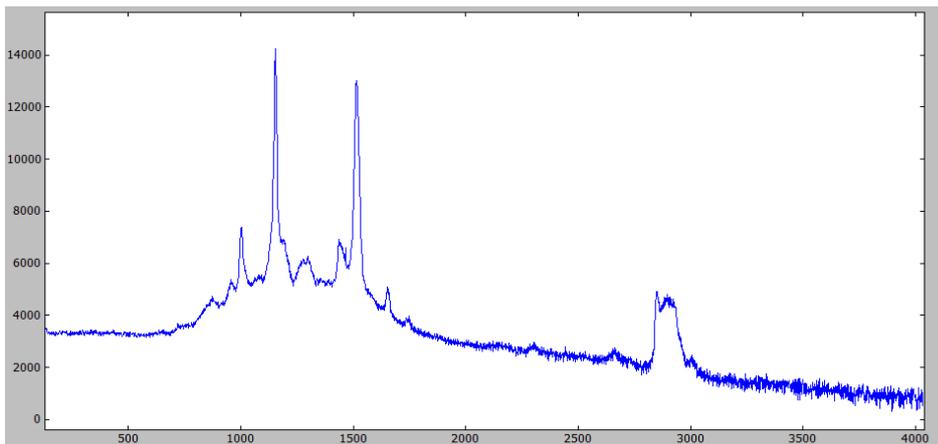


Рисунок 51 – Спектр ткани меланомы (при метастазировании в регионарные лимфатические узлы наблюдаются высокоамплитудные остроконечные пики на 1200, 1500/см, а также низкоамплитудные на 850, 990, 1000, 1300, 1450, 1650, 1750, 2300, 2700/см, также регистрируется трапециевидный пик на 2950/см. Интенсивность флюоресценции невысока и приближается к 6000 отн. ед. Пиковая интенсивность достигает 14000 отн. ед).

Таким образом возможности РФС универсальны, метод может быть информативным применительно к воспалительным и опухолевым заболеваниям ЛОР-органов и может быть использован для экспресс-гистологической

верификации данных заболеваний. Кроме того, нами было продемонстрировано в серии экспериментов, что по количеству накопленного препарата в тканях можно было судить об интактности или вовлеченности в воспалительный или опухолевый процесс тканей ЛОР-органов у мышей. Полученные данные подтверждены при проведении эксперимента на культурах микробных клеток и мышцах, что позволило обосновать возможность применения и перспективы метода раман-флюоресцентной спектроскопии в диагностике и лечении заболеваний и процессов воспалительной и неопластической природы ЛОР-органов. Раман-флюоресцентные медицинские технологии зарекомендовали себя в качестве перспективных не только в идентификации воспалительных заболеваний глотки, но и других воспалительных и опухолевых заболеваний ЛОР-органов, что можно использовать в клинической ЛОР-практике после расширенной экспериментально-теоретической и клинической проработки алгоритмов диагностики и лечения заболеваний ЛОР-органов воспалительной и опухолевой этиологии. Полученные результаты по перспективам использования метода РФС в оториноларингологии в настоящее диссертационное исследование не вошли, однако планируется дальнейшая работа в этом направлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воспалительные заболевания глотки являются одними из самых распространенных в человеческой популяции [103-109; 111; 138; 141; 142; 158]. Ежегодно количество пациентов с ВЗГ неуклонно растет [105]. Среди хронических воспалительных заболеваний глотки наиболее распространены хронический фарингит и хронический тонзиллит [98; 103; 117].

Широкая распространенность воспалительных заболеваний глотки и наличие большого количества осложнений свидетельствуют об определённых недостатках современных методов диагностики и лечения данных патологических процессов [54; 67; 92; 100; 103-109; 132; 147; 158; 167]. Несвоевременная и неточная диагностика и обусловленная этим обстоятельством нерациональная тактика лечения пациентов с заболеваниями ЛОР-органов не вызывают сомнений в необходимости разработки новых технологий, выявления патологического процесса, особенно на начальных стадиях [1; 76; 119]. Важной характеристикой диагностики является комплексность: высокая чувствительность и специфичность, точность, неинвазивность, а также экспрессность, способность оценивать стадии патологического процесса в реальный момент времени [177; 179].

Таким образом, современная диагностика должна обеспечивать постановку диагноза на соответствующей стадии патологического процесса, оценивать степень тяжести заболевания, его течение, выявлять осложнения, обеспечивать выбор адекватного лечения, анализировать его эффективность [1]. Среди используемых в настоящее время методов диагностики заболеваний глотки центральное место занимает стандартный осмотр, так как он позволяет достаточно быстро оценить состояние пациента и выраженность клинических симптомов, а также назначить лечение [103-109]. Для диагностики патологии глотки на современном этапе также используются микробиологический, цитологический, гистологический, биохимический и некоторые другие методы, однако необходимо учитывать ряд их особенностей. Так микробиологическое

исследование-сложное в исполнении, экономически затратное и не позволяет выявить весь спектр возбудителей. Экспресс-метод диагностики стрептококкового антигена информативен только в отношении конкретного патогена, биохимический метод исследования при ВЗГ, несмотря на достаточную диагностическую ценность, неспецифичен и малоинформативен на ранней стадии заболеваний. Гистологическое исследование тканей глотки проводится далеко не у каждого пациента, в основном, при подозрении на неопластический процесс или после тонзиллэктомии [5; 9; 15-17; 18; 20; 31; 50; 78; 89; 90; 91; 102; 118; 126-129; 168; 176; 182; 211; 214; 224; 246; 252; 267; 274; 278; 294].

Таким образом, используемые на сегодняшний день в оториноларингологии методы не позволяют выявлять все составляющие патогенеза ВЗГ одномоментно. Необходимость поиска новых методов диагностики, отвечающих всем требованиям качественной объективной диагностики, к которым можно отнести высокую чувствительность и специфичность, неинвазивность, экспрессность, возможность оценивать стадии патогенеза *in situ*, как *in vivo*, так и *in vitro*, а также осуществлять мониторинг процесса реабилитации после перенесенного воспалительного процесса в глотке, не вызывает сомнений. Вышеуказанным требованиям, по данным литературы, отвечают оптические методы диагностики [1; 159].

Определенный интерес для диагностики заболеваний ЛОР-органов воспалительной природы представляет возможность применения в клинике метода раман-флюоресцентной спектрометрии (РФС). На сегодняшний день эффект комбинационного рассеяния света уже широко применяется в различных направлениях медицины, таких как онкология, акушерство и гинекология, хирургия, иммунология и др. [1; 110; 159; 200; 204].

Раман-флюоресцентная спектрометрия основана на явлении аутофлюоресценции биологических тканей и эффекте рамановского рассеяния света, при котором при воздействии на ткань лазерного излучения в спектре

рассеянного света регистрируются характерные молекулярные колебания веществ, входящих в ее состав [146; 159]. Разработанный нами способ диагностики воспалительных заболеваний методом РФС реализуется с использованием аппаратно-программного комплекса, работающего на основе длин волн 405 нм и 532 нм. Для адаптации раман-флюоресцентных технологий к использованию с целью диагностики патологии глотки, нами была разработана методика расчета специальных индексов для оценки морфометрических, метаболических и функциональных особенностей фарингеальной ткани в норме и при патологии. Разработанная технология позволяет регистрировать изменения в биологическом объекте в конкретный промежуток времени с использованием специального оптоволоконного световода, программное обеспечение позволяет интерпретировать данные о предмете исследования в режиме реального времени, быстро, с оценкой основных звеньев патогенеза патологического процесса в глотке. Предлагаемый метод раман-флюоресцентной спектроскопии является высокочувствительным, высокоспецифичным и точным методом диагностики фарингеальной патологии, так как позволяет неинвазивно и быстро регистрировать минимальные изменения морфометрических и метаболических показателей [200; 204; 207]. Таким образом, используемая нами методика раман-флюоресцентной спектроскопии в диагностике заболеваний глотки является универсальным, точным, малоинвазивным, высокочувствительным, высокоспецифичным, быстрым методом диагностики, который характеризуется определением не только спектральных особенностей самой ткани, но и метаболических, структурных, а также функциональных изменений изучаемого биологического объекта (в данном случае, тканей глотки).

Кроме того, с использованием методики *in vitro* могут быть зарегистрированы спектральные характеристики микроорганизмов и/или их ассоциатов, что является дополнительным преимуществом применения данного метода в клинической оториноларингологии [184]. Таким образом метод раман-

флюоресцентной спектроскопии может быть использован в дополнение к существующим методам диагностики заболеваний ЛОР-органов.

С целью подтверждения вышеизложенного, нами было проведено исследование возможности и диапазона применения метода раман-флюоресцентной спектрометрии в диагностике воспалительных заболеваний глотки.

На первом этапе в условиях *in vivo* и *in vitro* мы изучили диагностические возможности метода раман-флюоресцентной спектрометрии и выявили, что метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью в диагностике воспалительных заболеваний глотки. У здоровых добровольцев показатели НПФ были меньше, чем при воспалительных изменениях в небных миндалинах при хроническом тонзиллите, компенсированной форме; при хроническом тонзиллите, ДФ значения НПФ 1 и НПФ 2 были выше таковых у здоровых добровольцев. При гранулезном фарингите показатели НПФ 1, НПФ 2 были в 8,25- 11,69 раз выше соответствующих значений в норме. НПФ 1 при ХФ в 3,623 раза больше, чем при ХТ ДФ, при ХТ ДФ ИА 1 в 1,37 раза больше, чем при ХФ, при ХФ НПФ 2 в 4,5 раза больше, чем при ХТ ДФ, а ИА 2 в 1,31 раза больше, чем при ХФ. НПФ 3 в группе здоровых добровольцев в 1,7 раза меньше, чем в группе пациентов с ХТ КФ, а также в 3,6 раза меньше, чем в группе ХТ ДФ, тогда как НПФ 3 в группе пациентов с ХТ КФ в 2,2 раза меньше, чем в группе пациентов с ХТ ДФ. Также в ходе исследования мы отметили, что наиболее информативными полосами комбинационного рассеяния (рамановского рассеяния) при ХТ КФ и ХТ ДФ (метод проекции на латентные структуры и линейный дискриминантный анализ) являются следующие: 573 см^{-1} , 1092 см^{-1} (рис. 24б). Соответствующие результаты были подтверждены данными гистологического исследования. Таким образом, мы выявили основные спектральные особенности тканей глотки, как рамановские, так и флюоресцентные, позволяющие использовать метод РФС с целью их дифференциации.

На втором этапе нами были получены и проанализированы показатели, полученные методом РФС, такие как индекс аэробности (индекс аэробного и анаэробного метаболизма), нормированный показатель флюоресценции, индекс структурированности тканей глотки у здоровых добровольцев и у пациентов с различными хроническими воспалительными заболеваниями глотки, проведено сравнение вышеуказанных показателей во всех группах исследования. Таким образом, мы провели сравнительную оценку спектральных характеристик тканей глотки в норме, при хроническом фарингите и хроническом тонзиллите компенсированной и декомпенсированной форм и выявили, что между полученными показателями имеются различия, которые можно использовать с целью дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний.

Метод РФС, выявляя морфологические, метаболические, иммунологические, физиологические, микробиологические изменения на фоне воспалительных заболеваний глотки, в частности, хронического тонзиллита, позволяет проводить диагностику. При помощи метода раман-флюоресцентной спектроскопии представляется возможным регистрировать уровень различного генетического материала (ДНК и РНК), ферментов, отдельных аминокислот, белков, липидов, углеводов, изменения кровотока, микроциркуляции, пролиферативной активности биологического объекта, что позволяет идентифицировать стадию и активность заболевания в том числе и на начальных этапах патологических изменений [175; 240]. Таким образом, рамановское и люминесцентное (флюоресцентное) виды излучений помогают получить количественные и качественные данные об изучаемом органе, распознать его морфологические и физиологические особенности на основе регистрации различных спектров от исследуемого объекта [159]. Диагностика, в том числе и дифференциальная, воспалительных заболеваний глотки является одной из важных задач для оториноларингологов и врачей ряда других специальностей. С использованием метода флюоресцентной спектроскопии в совокупности с применением специальных индексов становится возможным провести анализ спектральных

данных тканей глотки в норме и при воспалительных заболеваниях неинвазивно в экспресс-режиме на любой стадии патологического процесса.

При дифференцировке форм хронического тонзиллита с использованием предлагаемого нами способа высокая чувствительность и специфичность были обнаружены лишь при сравнении одной точки - в области лакуны небной миндалины - данные точки были различны во всех изучаемых группах после статистической обработки данных, что подробно описано в III главе.

Следует отметить, что дифференциальная диагностика форм тонзиллита является наиболее точной при анализе совокупности различных результатов обследования пациента и метод РФС у таких пациентов является дополняющим и может быть рекомендован к использованию в комплексе. Дифференциальная диагностика между нормой и патологией, а также между хроническим тонзиллитом и гранулёзным фарингитом возможна с высокой чувствительностью и специфичностью, приближающимися к 100% - результаты нашей работы показывают такие цифры при сравнении всех точек исследования здоровых добровольцев и пациентов с хроническим тонзиллитом и гранулёзным фарингитом. Клиницистам особенно важны все совокупные параметры биологического объекта в сравнительном аспекте «норма-патология», которые представлены в предлагаемом способе с в графическом и цифровом виде.

На третьем этапе была проведена оценка спектральных данных тканей небных миндалин пациентов с ХТ КФ в динамике, до и после курса консервативного лечения. В процессе исследования была отмечена тенденция изменения изучаемых показателей в сторону нормализации, то есть практически до нормальных (референтных) значений. Полученные результаты позволяют с помощью РФС не только дифференцировать вид ткани - интактной или вовлеченной в воспалительный процесс при ВЗГ, но и оценивать в динамике результат лечения и восстановления метаболических, морфометрических и функциональных изменений ткани в случае обратимой стадии заболевания, в данном случае при компенсированной форме хронического тонзиллита.

После обработки полученных спектров методами главных компонент, линейного дискриминантного анализа, принципа наименьших квадратов, очистки сигналов методом Савицкого-Голея, нами были продемонстрированы существенные различия спектральных характеристик тканей глотки в норме и при ВЗГ (хроническом тонзиллите и хроническом гранулёзном фарингите), с чувствительностью и специфичностью, близкими к 100%.

На основе проведенных исследований нами был разработан и апробирован алгоритм диагностики воспалительных заболеваний глотки с использованием метода РФС, представленный в главе III, который мы предлагаем к использованию в работе научных работников и практикующих врачей.

Таким образом, использование метода РФС в предлагаемом нами алгоритме диагностики воспалительных заболеваний глотки в дополнение к имеющемуся арсеналу способов обследования пациента позволит повысить точность и сократить сроки диагностики на любой стадии заболевания, а также контролировать эффективность лечения в конкретный момент времени.

Полученные в ходе настоящего исследования результаты соответствуют поставленным цели и задачам нашего исследования, а также подтверждают данные отечественных и зарубежных авторов, которые использовали ранее метод РСФ в других областях медицины [1; 119; 159; 166; 170; 174; 175].

ВЫВОДЫ

1. Метод РФС позволяет оценивать индивидуальные показатели биологического объекта, такие как индекс аэробности, нормированный показатель флюоресценции, интенсивность флюоресценции, степень клеточной пролиферации, микробной обсемененности, интенсивности кровотока и оксигенации ткани, отражающие её морфометрические, метаболические, функциональные особенности в норме и при хроническом тонзиллите и хроническом фарингите.
2. Метод РФС выявляет достоверные различия спектральных характеристик тканей у лиц в отсутствие патологии глотки и у пациентов с хроническим тонзиллитом компенсированной и декомпенсированной форм и хроническим фарингитом.
3. Метод РФС является информативным для дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний глотки - хронического тонзиллита компенсированной и декомпенсированной форм и хронического фарингита с чувствительностью 95,2-100 % и специфичностью 94,4-100%.
4. При дифференцировке форм хронического тонзиллита с использованием метода РФС достоверные результаты были обнаружены при сравнении показателей в одной точке- в области лакуны небной миндалины
5. Использование метода РФС в соответствие с предлагаемым разработанным алгоритмом диагностики воспалительных заболеваний глотки позволит повысить точность и сократить сроки диагностики на любой стадии заболевания, а также контролировать эффективность лечения в конкретный момент времени.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. РФС может быть использована в качестве неинвазивного, высокочувствительного и высокоспецифичного диагностического метода у пациентов с воспалительными заболеваниями глотки в экспресс-режиме на любой стадии патологического процесса.
2. Метод РФС реализуется с использованием аппаратно-программных комплексов «EnSpectr R532» и «EnSpectr L405», сертифицированных для клинического применения, работающих на основе длин волн 405 нм и 532 нм.
3. Работа на аппаратно-программных комплексах «EnSpectr» заключается в регистрации измерений - спектральных характеристик ткани в норме и при патологии контактным способом, без освещения, с предварительной обработкой оптоволоконного световода раствором антисептика.
4. Дифференциальная диагностика между нормой и патологией, а также между хроническим тонзиллитом и гранулёзным фарингитом методом РФС возможна с высокой чувствительностью и специфичностью.
5. Метод раман-флюоресцентной спектроскопии может быть использован в клинической практике в соответствие с разработанным алгоритмом в дополнение к существующим методам диагностики заболеваний ЛОР-органов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПК-аппаратно-программный комплекс

АСЛО-антистрептолизин-О

БГСА- β -гемолитический стрептококк группы А

ВЗГ- воспалительные заболевания глотки

ГФ – гранулезный фарингит

ГЭРБ-гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

ИА-индекс аэробности

ИАИ-индекс аэробности в интактной точке

ИИ-интенсивность флюоресценции в интактной точке

ЛОР-оториноларингология

ЛФД-лазерно-флюоресцентная диагностика

ЛФС-лазерно-флюоресцентная составляющая

НПФ-нормированный показатель флюоресценции

ОЕ-относительные единицы

ОКТ-оптическая когерентная томография

ПУРС-поверхностно-усиленное рамановское рассеяние

РФ-ревматоидный фактор

РФД- раман-флюоресцентная диагностика

РФМТ-раман-флюоресцентные медицинские технологии

РФС-раман-флюоресцентная спектрометрия

СРБ- С-реактивный белок

ХТ- хронический тонзиллит

ХТ ДФ- хронический тонзиллит, декомпенсированная форма

ХТ КФ - хронический тонзиллит, компенсированная форма

ХФ- хронический фарингит

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров М. Т. Лазерная клиническая биофотометрия / М. Т. Александров. – М.: Техносфера, 2008. - 553 с.
2. Александров М. Т. Способ идентификации микроорганизмов с помощью эффекта гигантского рамановского рассеивания / М. Т. Александров, Е. В. Буданова, Г. Э. Баграмова // Международный научно-исследовательский журнал. - 2017. -№6 (60: 2). -С. 50-55.
3. Александров М. Т. Многофакторный анализ в лазерной флуоресцентной диагностике / М. Т. Александров, Е. Н. Васильев, А. В. Лебедев, Г. П. Кузьмин, Е. М. Хохлов, М. И. Воропаева // Радиотехника и электроника. -2007.- № 4 (52).- С. 486-491.
4. Александров М. Т. Экспериментально-теоретическое обоснование принципов и особенностей применения метода лазерно-конверсионной диагностики для оценки состояния твердых тканей зуба в норме и при патологии (кариес) / М. Т. Александров, С. В. Зубов, А. С. Березинская, В. И. Кукушкин, Е. П. Пашков, О. Н. Иванченко // Российский стоматологический журнал. - 2013.- №4. С. 6-10.
5. Андриянова И.В. Динамика иммунологических показателей у больных хроническим тонзиллитом // Московский хирургический журнал.- 2013.- № 5 (33).-С. 29-32.
6. Антонив В. Ф. Субатрофический и атрофический фарингит как проявление дистрофии слизистой оболочки глотки у лиц пожилого, старческого возраста и у долгожителей / В. Ф. Антонив, В. М. Аксёнов, Н. А. Лебедева // Вестн. оториноларингологии. - 1999. - № 3. - С. 38-39.
7. Арефьева Н. А. Тонзиллярная патология. Современное состояние проблемы // Вестник оториноларингологии. -2012.- № 6. С. 10–13.
8. Бабияк В. И. Клиническая оториноларингология / В. И. Бабияк, Я. Л. Накатис. -СПб.: Питер, 2012.- 832 с.

9. Бабушкин С. А. Эпидемиологические и микробиологические аспекты заболеваемости острыми фарингитами и тонзиллитами сотрудников МВД России по Пермскому краю / Бабушкин С. А., Ивенских В. И., Мамаев А. В., Ожгибесов Г. П., Никулина Е. А., Шубина Н. В., Годовалов А. П. // Вестник современной клинической медицины. - 2016.- 9 (6).-С.27-33.
10. Бажанов Н. Н. Применение мирамистина для лечения больных одонтогенными флегмонами челюстно-лицевой области / Н. Н. Бажанов, М. Т. Александров, И. В. Черкесов // Стоматология. -2006.- №3. -С.24-26.
11. Барышевская Л.А. Хроническое воспаление небных миндалин, ассоциированное с вирусом Эпштейна-Барр / Л. А. Барышевская, Т. Ю. Владимирова, О. В. Зелева, Е. В. Колдова// Наука и инновации в медицине. - 2018.- 1(9).-С. 6-10.
12. Белов Б. С. Острая ревматическая лихорадка и инфекционно-воспалительные заболевания глотки: сопряженность, лечение, профилактика // Вестник оториноларингологии. - 2015. - №2. -С.4-7.
13. Белов Б.С. Современные подходы к антибактериальной терапии А-стрептококкового тонзиллита Consillium Medicum // Инфекции и антимикробная терапия. - 2000.- №2(2).-С.164–168.
14. Белов Б.С. А-стрептококковый тонзиллит: современные аспекты / Б. С. Белов, М. Ю. Щербакова// Педиатрия. - 2009.-№ 88(5).- С. 127-135.
15. Белов В.А. Современные методы микробиологической диагностики при обострении хронических и острых формах тонзиллитов у детей // Вопросы современной педиатрии. - 2012. -№ 2 (11).- С. 128-131.
16. Блоцкий А. А. Морфологические изменения небных миндалин при хроническом неспецифическом тонзиллите / А. А., Блоцкий, А. А. Григоренко, В. В. Антипенко// Амурский медицинский журнал. -2013.- №1 (1).- С. 69-72.
17. Бойко Н.В. Содержание цитокинов в слюне детей с хроническим тонзиллитом / Н. В. Бойко, А. С. Ким, И. В. Стагниева, В. В. Быкова // Медицинская иммунология. - 2017. -№ s (19). - С. 311.

18. Бондарева Г. П. Иммуноморфологические особенности хронического тонзиллита / Г. П. Бондарева, Н. А. Антонова, П. Л. Чумаков // Вестник оториноларингологии. - 2013.-78 (3).- С.12-16.
19. Бондаренко Н. Л. Оценка состояния здоровья человека при прогнозировании течения инфекционно-воспалительного заболевания / Н. Л. Бондаренко, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин, Е. А. Воропаева, А. Л. Байракова, М. С. Афанасьев и соавт. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2016. -№3.-С. 77-84.
20. Борисова О. Ю. Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией / О. Ю. Борисова, В. А. Алешкин, А. С. Пименова, А. И. Крюков, Н. Л. Кунельская, А. В. Гуров, Г. Б. Шадрин, А. С. Товмасян, Б. А. Ефимов, Л. И. Кафарская // Инфекция и иммунитет. - 2015.-№ 5(3).-С. 225-232.
21. Бочарова М. Б. Радиоволновая дезинтеграция лимфоидных элементов глотки при хроническом гипертрофическом фарингите: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14. 01. 03/ Бочарова Маргарита Борисовна. - Москва, 2006. -24 с.
22. Брико Н.И. Клинико-эпидемиологические проявления и перспективы контроля стрептококковой (группы А) инфекции // Медицинская кафедра. - 2006.- №2.- С.4-13.
23. Брин А. В. Операционные характеристики симптомов хронического тонзиллита и хронического фарингита для усовершенствования их дифференциальной диагностики / А. В. Брин, В. Б. Токарь, Е. З. Мирзоева // Тверской медицинский журнал. -2016.- № 2.-С. 41-44.
24. Быков И. М. Гипертрофия небных миндалин: особенности иммунологии и терапии / И. М. Быков, В. Г. Песчаный, Е. Е. Есауленко, Н. И. Самойлик // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. С. 1-6.
25. Быкова В.П. Миндалины лимфаденоидного глоточного кольца в системе мукозального иммунитета верхних дыхательных путей // Материалы Всероссийской конференции "Проблема реабилитации в оториноларингологии». - 2003.- №1.- С. 347-349.

26. Быкова В.П. Морфофункциональная организация небных миндалин как лимфоэпителиального органа // Вестник оториноларингологии. -1998.- №1.-С.41-45.
27. Быкова В.П. Современный аспект проблемы тонзиллярной болезни // Архив патологии. -1996.- №3. -С.23-29.
28. Быкова В. П. Иммуноморфологические аспекты патогенеза хронических фарингитов / В. П. Быкова, Г. Ф. Иванченко, Т. В. Короткова // Российская ринология. - 2014.- № 1.-С.19-23.
29. Быкова В. П. Хромогенная *in situ* гибридизация в диагностике герпес-вирусной инфекции при хроническом тонзиллите / В. П. Быкова, Ф. А. Хафизова, Д. В. Калинин, Н. А. Дайхес// Arkh Patol.- 2012.-74(2). С.19-22.
30. Бычкова М. В. Информативность лабораторных показателей, определяемых по стандартам медицинской помощи у больных с хроническими синуситами и хроническими тонзиллитами / М. В. Бычкова, Д. В. Трусов, Е. Р. Кулюцина, Н. К. Починина// Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. - 2017.- Т. 22. № 6-2. -С. 1612-1620.
31. Воробьев А. В. Микробиология: учеб. лит. для студ. фарм. вузов. -2-е изд. перераб. и доп. / А. В. Воробьев, А. С. Быков, Е. П. Пашков, А. М. Рыбакова. - М.: Медицина, 2003. - 336 с.
32. Гладкова Н. Д. Возможности и ограничения внутрисосудистой оптической когерентной томограф / Н. Д. Гладкова, Е. В. Губарькова, Е. Г. Шарабрин, В. И. Стельмашок, А. Э. Бейманов // СТМ] 2012.- 4.- С.128-141.
33. Голуб А. В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клин. микробиол. антимикроб. химиотерапия. – 2012. – № 1 (14). – С. 23-29.
34. Горбаносов, И. В. Связь патологического гастроэзофагеального рефлюкса с некоторыми симптомами хронического воспаления глотки и гортани // Вестн. оториноларингологии. - 2002. - № 6. -С. 43-45.
35. Горенков Р. В. Хроническая гипоксия как один из факторов повышенной флуоресценции эндогенных порфиринов в живых биологических тканях / Р. В.

Горенков, В. Н. Карпов, Д. А. Рогаткин, В. И. Шумский // Биофизика. -2007.-№ 4 (52).-С.711-717.

36. Гострый А. В. Хронический фарингит: этиология, патогенез, лечение. Новые подходы к оценке этиопатогенеза / А. В. Гострый, Н. А. Симонова, И. А. Михайлова и соавт. // Архивъ внутренней медицины. - 2019.- № 1.-С. 32-43.

37. Гофман В. В. Дисбиотическое состояние слизистой оболочки небных миндалин как локальное проявление системного микробиологического дисбаланса-основная причина возникновения хронического тонзиллита (аналитический обзор) // Российская оториноларингология. -2014.- 4 (71).-С. 32-40.

38. Гуров А.В. Клинико-микробиологическая оценка очагов гнойно-септических заболеваний в оториноларингологии: автореф. дис. ... докт. мед. наук. -14. 01. 03 / Гуров Александр Владимирович. - Москва, 2011.- 52 с.

39. Данилова Т. А. Формирование биопленок стрептококками группы а разных типов и изучение влияния антибиотиков на этот процесс / Т. А. Данилова, Г. Л. Данилина, А. А. Аджиева, А. Г. Минко, Н. В. Алексеева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. -2015. - №2. -С.50-54.

40. Джибладзе Т. А. Применение лазерных технологий для диагностики и лечения заболеваний органов репродуктивной системы женщин: дис. ...докт. мед. наук.: 14. 01. 01 / Джибладзе Теа Амирановна. -Москва, 2004. -290 с.

41. Долина И. В. Определение тактики ведения беременных с хроническим тонзиллитом в зависимости от микробной флоры // Медицинский журнал. - 2016.-№ 2 (56).- С. 69-72.

42. Енин И. П. Микрофлора небных миндалин при хроническом тонзиллите / И. П. Енин, В. А. Батулин, Е. В. Щетинин, В. П. Карпов // Вестник оториноларингологии. -2013.- №4.- С. 21.-22.

43. Епанчинцева А.С. Фактор высокого гастроэзофагеального рефлюкса в развитии различных форм хронического фарингита / А. С. Епанчинцева, В. М.

Свистушкин, В. А. Исаков, Г. Н. Никифорова, С. В. Морозов, В. Л. Шабаров // Российская оториноларингология. - 2010.- №5. (48).- С. 11-15.

44. Зайцева Е.В. Разработка метода флуоресцентной диагностики твердых тканей зуба при кариозном поражении: автореф. дисс. ...канд. мед. наук. : 14. 01. 14 / -Москва, 2000. - 20 с.

45. Зайцева О. В. Острый фарингит // Лечащий врач. - 2011.-№8.

46. Зайцева С. В. Острый тонзиллит в практике врача-педиатра / С. В. Зайцева, А. К. Застрожина, Е. В. Куликова// Медицинский совет. - 2019.- №2.-С. 113-119.

47. Захаров А. А. Анализ микрофлоры ротовой полости обследованных людей с различными заболеваниями / А. А. Захаров, Н. А. Ильина // Успехи современного естествознания. – 2007.- № 12-3. – С. 141-143.

48. Извин А.И. Генетические аспекты хронического тонзиллита // Новости оториноларингологии и логопатологии.- 2002.- №2.-С. 90 - 92.

49. Извин А. И. Микробный пейзаж слизистой оболочки верхних дыхательных путей в норме и патологии / А. И. Извин, Л. В. Катаева // Вестник оториноларингологии. -2009.- 2.-С. 64–68.

50. Ильина Е. Н. Совершенствование способов и средств микробиологической диагностики. Молекулярные средства измерения в современной микробиологической лаборатории // Клиническая лабораторная диагностика. - 2013.-№ 9.

51. Каманин Е. И. Клинико-иммунологический эффект криохирургического лечения больных хроническим гипертрофическим фарингитом / Е. И. Каманин, Н. В. Панова // Вестник оториноларингологии. - 2003. - № 4. - С. 58-61.

52. Карнеева О.В. Протоколы диагностики и лечения острых тонзиллофарингитов / О. В. Карнеева, Н. А. Дайхес, Д. П. Поляков // РМЖ.- 2015.- 6: 307-311.

53. Карпищенко С. А. Тонзиллит и тонзиллогенные заболевания / С. А. Карпищенко, Г. В. Лавренова, С. В. Баранская // Вестник оториноларингологии. - 2016.-81(4).- С. 69-71.

54. Карпищенко С. А. Хронический тонзиллит и ангина / С. А. Карпищенко, В. М. Свистушкин. - СПб.: «Диалог», 2017.-264 с.
55. Карпищенко С.А. Хронический тонзиллит: представление о микробном пейзаже небных миндалин / С. А. Карпищенко, О. М. Колесникова // Фарматека. -2015.- № 4 (297).-С. 13-17.
56. Киселюс В.Э. Хронический тонзиллит, осложненный ювенильным ревматоидным артритом // Вестник оториноларингологии. - 2015.- № 4 (80).- С. 88-89.
57. Клинические рекомендации. Острый тонзиллофарингит / ред. совет. Д. П. Поляков [и др.]. - Москва: Национальная медицинская ассоциация оториноларингологов, 2016. - С. 6-24.
58. Коллекер В. В. Дисбиотическое состояние слизистой оболочки небных миндалин как основная причина возникновения хронического тонзиллита / В. В. Коллекер, Е. В. Байке // Забайкальский медицинский журнал. - 2016.- № 2.- С. 83-84.
59. Косяков С. Я. Неинфекционные причины хронического фарингита / С. Я. Косяков, И. Б. Анготоева, А. Н. Исамов // Медицинский Совет. - 2018.-№20.-С. 112-115.
60. Косяков С. Я. Современные представления о тонзиллофарингите / С. Я. Косяков, И. Б. Анготоева, А. А. Мулдашева // Медицинский Совет.- 2015.- № 17.
61. Кренделев М.С. К вопросу об этиологии тонзиллита / М. С. Кренделев // Современные проблемы науки и образования. - 2015.-№4.- С.377.
62. Кречиков В. А. Современные подходы к диагностике стрептококкового фарингита / В. А. Кречиков, К. В. Шпынев // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. -2007. - N 1.-С.20-33.
63. Крюков А. И. и соавт. Роль микрофлоры в этиологии хронического тонзиллита / А. И. Крюков // Вестник оториноларингологии. – 2010. – № 3. – С. 4-6.
64. Крюков А. И. Особенности эпидемиологии хронического тонзиллита в современных условиях оказания специализированной ЛОР-помощи / А. И.

- Крюков, А. В. Аксенова, А. Ф. Захарова // Вестник оториноларингологии. - 2013.-78 (3). С. 4–7.
65. Крюков А. И. Особенности клинико-лабораторных показателей активности стрептококковой инфекции при тонзиллярной патологии / А. И. Крюков, А. В. Аксенова, Н. А. Шостак, Н. И. Брико, А. В. Гуров, Д. А. Клейменов, О. А. Гусева, Т. Т. Набиева // Вестник оториноларингологии. - 2013.- № 3.-С.17-20.
66. Крюков А. И. Острый тонзиллит у детей: диагностика, прогностическое значение, современное лечение / А. И. Крюков, А. Ю. Ивойлов, М. И. Кулагина // Медицинский Совет. - 2015.- №3.
67. Крюков А. И. Актуальность проблемы хронического тонзиллита / А. И. Крюков, Г. Н. Изотова, А. Ф. Захарова, П. Л. Чумаков, О. А. Киселева // Вестник оториноларингологии. - 2009.-5.- С. 52-53.
68. Крюков А. И. Клинико-микробиологическая характеристика дисбиотических изменений слизистой оболочки полости рта и ротоглотки / А. И. Крюков, Н. Л. Кунельская, А. В. Гуров, Г. Н. Изотова, А. Е. Старостина, А. С. Лапченко // Медицинский Совет. - 2016.- № 6.
69. Крюков А. И. Тонзиллофарингиты: диагностика и лечение / А. И. Крюков, Н. Л. Кунельская, А. Б. Туровский, Г. Н. Изотова // Справочник поликлинического врача. - 2007.- 1(5).-С. 58-61.
70. Крюков А. И. Эпидемиология грибковых заболеваний верхних дыхательных путей и уха / А. И. Крюков, В. Я. Кунельская, Г. Б. Шадрин // Проблемы медицинской микологии. -2011.-13(1):28-31.
71. Крюков А. И. Аспекты современной эпидемиологии ЛОР-микозов / А. И. Крюков, В. Я. Кунельская, Г. Б. Шадрин // Вестник оториноларингологии. - 2011.-2:13-15.
72. Крюков А. И. Роль микобиоты при хроническом фарингите / А. И. Крюков, В. Я. Кунельская, Г. Б. Шадрин, Т. П. Бессараб, А. И. Мачулин, Д. И. Красникова, О. А. Андреевкова // Вестник оториноларингологии. - 2018.-83(3).- С. 61-64.

73. Крюков А. И. Профилактика осложнений стрептококковых заболеваний глотки / А. И. Крюков, А. Б. Туровский, А. Ф. Захарова и соавт. // РМЖ. -2011. - №24.-С. 1488.
74. Крюков А. И. Латентное течение хронического тонзиллита, сопровождающегося ревматоидоподобным синдромом / А. И. Крюков, Н. А. Шостак, Н. А. Антонова, О. В. Елисеев // Вестник оториноларингологии. - 2003.- 5.-С. 4-6.
75. Кукушкин В. И. Взаимосвязь гигантского усиления сигналов рамановского рассеяния и люминесценции на наноструктурированных металлических поверхностях / В. И. Кукушкин, А. Б. Ваньков, И. В. Кукушкин // Письма в ЖЭТФ. - 2013.- 98: 6.-С. 383–388.
76. Кукушкин В. И. К вопросу о дальнодействии поверхностно-усиленного рамановского рассеяния / В. И. Кукушкин, А. Б. Ваньков, И. В. Кукушкин // Письма в ЖЭТФ. - 2013.- 98:2.-С. 72–77.
77. Куличенко Т. В. Диагностика острого фарингита у детей / Т. В. Куличенко, А. М. Кабалоева, Ю. С. Лашкова, М. А. Лазарева // ПФ. -2014.- №4.
78. Куличенко Т. В. Современная диагностика и лечение острого стрептококкового фарингита и тонзиллита у детей и взрослых / Т. В. Куличенко, Ю. С. Патрушева, А. А. Редина, М. А. Лазарева // Педиатрическая фармакология. - 2013.-10 (3).-С. 38–44.
79. Кунельская Н. Л. Ангины: диагностика и лечение / Н. Л. Кунельская, А. Б. Туровский, Ю. С. Кудрявцева // Лечебное дело. - 2010.- №3. С. 4-10.
80. Кунельская Н. Л. Фарингомикоз. Диагностика, профилактика и лечение / Н. Л. Кунельская, Г. Н. Изотова, В. Я. Кунельская, Г. Б. Шадрин, Д. И. Красникова, О. А. Андреевкова // Медицинский Совет. - 2013.- (2).-С.42-45.
81. Леванова Л. А. Роль микрoэкологических нарушений слизистой зева у медицинского персонала в развитии заболеваний верхних дыхательных путей / Л. А. Леванова, Ю. В. Захарова // Acta Biomedica Scientifica.-2007.- №3S.

82. Лукань Н. В. Консервативное лечение различных форм хронического тонзиллита / Н. В. Лукань, В. И. Самбулов, Е. В. Филатова // Альманах клинической медицины. - 2010.- 23.-С. 37-41.
83. Мальцева Г. С. Хронический тонзиллит: актуальные вопросы (клиническая лекция) / Г. С. Мальцева // Consilium medicum. Пульмонология. - 2006.
84. Мальцева Г. С. Применение лабораторных методологий в этиологической диагностике хронического тонзиллита / Г. С. Мальцева, Ю. К. Янов // Российская оториноларингология. – 2007. – № 2. – С. 46-55.
85. Мальцева Г. С. Особенности стрептококковой инфекции при хроническом тонзиллите / Г. С. Мальцева // Consilium Medicum. -2010.- №11.-С. 26-29.
86. Мальцева Г.С. Современные этиологические, патогенетические и клинические основы диагностики и лечения хронического тонзиллита: автореф. дис. ... докт. мед. наук.: 14. 01. 03 / Мальцева Галина Семеновна. - Санкт-Петербург, 2008. - 46с.
87. Мальцева Г. С. О роли бета-гемолитических стрептококков в этиологии хронического тонзиллита / Г. С. Мальцева, Л. А. Бурова // Медицинский Совет. - 2014.- № 15.- С. 48-51.
88. Мальцева Г. С., Гринчук О. Н. Консервативное лечение хронического тонзиллита стрептококковой этиологии // Оториноларингология: статья в журнале - научная статья. — М.: Некоммерческое партнерство содействия развитию системы здравоохранения и медицины "Русмедикал групп", 2011. — № 6. — С. 20-23.
89. Мареев Г.О. Измерение микроциркуляторных параметров небных миндалин при хроническом тонзиллите / Г. О. Мареев, Д. Д. Цымбал // Бюллетень медицинских интернет-конференций. - 2015.-№ 12 (5).- С. 1731.
90. Меньшиков В. В. Лабораторные исследования возле пациента / В. В. Меньшиков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. - №4. - С. 23-34.
91. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований // Клиническая микробиология. - М.: «Лабора», 2009. - Т. 3. - 879 с.

92. Мирзоева Е. З. Диагностическая значимость симптомов хронического тонзиллита и хронического фарингита / Е. З. Мирзоева // Верхневолжский медицинский журнал. 2014.-№ 4 (12).-С. 32-36.
93. Михайлов Ю. Х. Хронический фарингит: причины и диагностика / Ю. Х. Михайлов, И. В. Михайлова // Рос. оториноларингология. - 2014. - Т. 71, № 4. - С. 78-80.
94. Михайлова Е.А. Мониторинг микробиоценоза миндалин студентов, больных хроническим тонзиллитом / Е. А. Михайлова, А. Ю. Миронов, С. Б. Киргизова и соавт. // Медицинский алфавит. -2016.- т. 3. № 19 (282).- С. 51-52.
95. Михайлова Е. А. Микробная экология небных миндалин у больных с хроническим тонзиллитом / Е. А. Михайлова, М. В. Фомина, С. Б. Киргизова // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2015.- № 10.- С.185.
96. Нестерова А. А. Особенности лакунарного микробиома при хроническом тонзиллите у больных с гастроэзофагеальным рефлюксом / А. А. Нестерова, В. В. Вермиенко // Российская оториноларингология. -2018.- № 1 (92). С. 85-92.
97. Николаевская В.П. Хронический тонзиллит. Этиология, патогенез, клиника // М.: Медицина, 1989. - С.56-78.
98. Овчинников А.Ю. Острый и хронический фарингит / А. Ю. Овчинников // Вестник оториноларингологии. -1991. - №4. - С. 8-10.
99. Овчинников А. Ю. О взаимосвязи хронического фарингита и хронического гастрита / А. Ю. Овчинников, В. П. Гамов, Л. Ю. Жаворонкова и др. // Вестник оториноларингологии. -1984. - №4. - С. 31—34.
100. Овчинников А. Ю. Хронический тонзиллит и сопряженные с ним заболевания / А. Ю. Овчинников, А. Н. Славский, И. С. Фетисов // «РМЖ». 1999. - №8. - С. 45-48.
101. Окулич, В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с.

102. Отвагин И. В. Современные аспекты диагностики инфекций, вызванных стрептококками группы А / И. В. Отвагин, Н. С. Соколов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. -2011.- Т. 13. № 3.- С. 223–230.
103. Пальчун В.Т. Хронический тонзиллит. В кн.: Оториноларингология. Национальное руководство. -М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016.
104. Пальчун В.Т. Дифференциальная диагностика хронического тонзиллита по степени выраженности тонзиллогенной интоксикации организма / В. Т. Пальчун, А. В. Гуров, А. В. Аксенова, О. А. Гусева // Вестник оториноларингологии. - 2015. -№ 5.-С.8-13.
105. Пальчун В. Т. Современные представления о токсико-аллергических проявлениях хронической тонзиллярной патологии, его этиологическая и патогенетическая роль в возникновении и течении общих заболеваний / В. Т. Пальчун, А. В. Гуров, А. В. Аксенова, О. А. Гусева // Вестник оториноларингологии. - 2012.- 2. С. 5-12.
106. Пальчун В.Т. Микробный пейзаж и пути рациональной антибиотикотерапии при острой гнойно-воспалительной патологии ЛОР-органов / В. Т. Пальчун, Л. И. Кафарская, Н. Л. Кунельская, М. Е. Артемьев // Лечебное дело. -2004.- №4.- С. 88-85.
107. Пальчун В. Т. Воспалительные заболевания глотки / В. Т. Пальчун, Л. А. Лучихин, А. И. Крюков-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014 г.-288с.
108. Пальчун В. Т. Классификация и лечебная тактика при хроническом тонзиллите / В. Т. Пальчун // Вестник оториноларингологии. -2013.-78(3).-С. 8-11.
109. Пальчун В. Т., Крюков А. И., Магомедов М. М. Оториноларингология: учеб. для вузов / В. Т. Пальчун, А. И. Крюков, М. М. Магомедов-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 224 с.
110. Пашков Е. П. Лазерно-флюоресцентный метод экспресс-индикации микроорганизмов при гнойно-воспалительных заболеваниях, дисбактериозах и другой патологии микробной этиологии: автореф. дисс. ... докт. мед. наук. : 03.02.03 / Пашков Евгений Петрович. –Москва, 2002. - 84 с.

111. Педдер В. В. Хронический тонзиллит: новый метод лечения и критерии его эффективности / В. В. Педдер, И. В. Пантюхин, Л. А. Пантюхина и соавт. // Новости оториноларингологии и логопатологии. -2002.- №3.-С. 91-94.
112. Пиманчева Ю. И. Клиническое значение экспресс-диагностики доброкачественных заболеваний матки с использованием неупругого светового рассеивания: дис. ... канд. мед. наук.: 14. 01. 01 / Пиманчева Юлия Игоревна. - Москва, 2018. -25с.
113. Пирогов Н. Н. К вопросу о роли микробиоты в этиопатогенезе развития хронического фаринготонзиллита / Н. Н. Пирогов, Е. Г. Портенко, Д. И. Столяров // Folia otorhinolaryngologiae et pathologiae respiratoriae. -2016.- т. 22. № 3.- С. 63-71.
114. Пискунов Г. З. Острый тонзиллофарингит / Г. З. Пискунов, И. Б. Анготоева // Лечащий Врач. -2007.- №2.
115. Плиева М. И. Озонотерапия при хроническом тонзиллите / М. И. Плиева, Э. Т. Гаппоева // Российская оториноларингология. - 2008. - №6. - С. 108-110.
116. Плужников М. С. Хронический тонзиллит: клиника и иммунологические аспекты / М. С. Плужников, Г. В. Лавренова, М. Я. Левин, П. Г. Назаров, К. А. Никитин. - СПб.: Диалог, 2010.-224 с.
117. Плужников М. С. Фарингит (клинико-морфологические аспекты и криохирургия) / М. С. Плужников, Н. В. Панова, М. Я. Левин и соавт.- СПб.: Диалог, 2006.-120 с.
118. Поляков Д. П. Современные аспекты диагностики острого стрептококкового тонзиллофарингита у детей / Д. П. Поляков // Вопросы современной педиатрии. – 2013.- 12 (3): 46–51.
119. Попов С.Н. Возможности и перспективы применения лазерно-конверсионной диагностики в стоматологии: Материалы II научно-практической конференции молодых ученых «Современные технологии в экспериментальной и клинической стоматологии». - М.; 2011; С. 122-125.
120. Портенко Е.Г. Об информативности симптомов хронического тонзиллита / Е. Г. Портенко // Вестник оториноларингологии. -2006.-№5. С.308-309.

121. Портенко Е. Г. Способ дифференциальной диагностики компенсированной и декомпенсированной форм хронического тонзиллита / Е. Г. Портенко, Г. М. Портенко, Г. П. Шматов // Российская оториноларингология. - 2005. - №6.- С.12-15.
122. Потапова П. Д. Микробный пейзаж небных миндалин у медицинских работников с хроническим тонзиллитом / П. Д. Потапова // Российская оториноларингология. - 2015. - № 1.- С. 113-116.
123. Разживина А. А. Спектроскопические методы и увеличительная эндоскопия в дифференциальной диагностике патологии толстой кишки / А. А. Разживина, А. М. Нечипай, А. В. Волова, С. М. Горяев, А. А. Соколов // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. -2013.- № 1. -С.37-41.
124. Руденко В. В. Хламидийная и микоплазменная инфекция ЛОР-органов: дисс. ... канд. мед. наук.: 14. 01. 03 / Руденко Виктория Викторовна. -Москва, 2013. -110 с.
125. Русецкий Ю. Ю. Сравнительное бактериологическое исследование микрофлоры поверхности и биоптатов миндалин у детей с патологией лимфоаденоидного глоточного кольца / Ю. Ю. Русецкий, Т. К. Седых, И. О. Чернышенко и соавт. // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. -2012.- т. 91. - № 2.- с. 52-56.
126. Рыбак Н. А. Микрофлора небных миндалин и метатонзиллярные осложнения при хроническом тонзиллите / Н. А. Рыбак // Клиническая инфектология и паразитология. 2014.- № 3.- С. 31-40.
127. Рыбак Н. А. Антибиотикорезистентность микрофлоры небных миндалин при хроническом тонзиллите / Н. А. Рыбак, Т. Н. Соколова, М. В. Ершова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2016.- № 2 (54).- С. 87-91.
128. Рыбак Н. А. Чувствительность/резистентность микроорганизмов, выделенных из биопленок, к антибактериальным средствам при хроническом тонзиллите / Н. А. Рыбак, Т. Н. Соколова, В. М. Цыркунов и соавт. // Клиническая инфектология и паразитология.- 2016.- № 2 (17).- С. 171-182.

129. Рыбак Н.А. Микробиоценоз небных миндалин при хроническом тонзиллите / Н. А. Рыбак, В. М. Цыркунов, Р. Ф. Рыбак // Здоровоохранение (Минск).- 2014.-№ 12.-С. 2-7.
130. Рыбак Н. А. Морфологические критерии активности и стадии хронического тонзиллита / Н. А. Рыбак, В. М. Цыркунов, Н. И. Прокопчик и соавт. // Оториноларингология. -2015.-№11.
131. Рязанов В. Д. Окислительный стресс как фактор диагностики различных форм хронического тонзиллита / В. Д. Рязанов, С. И. Красиков, Е. А. Васильев и соавт. // Информационный архив. - 2011.- т. 5. № 4.- С. 40-41.
132. Рязанцев С. В. Современные методы лечения хронического тонзиллита / С. В. Рязанцев, Н. В. Еремина, К. Ю. Щербань // Медицинский Совет.-2017.- №19.
133. Ряпис Л. А. Стрептококки: общая характеристика и методы лабораторной диагностики / Л. А. Ряпис, Н. И. Брико, А. С. Ещина и соавт. // ООО «Медицинское информационное агентство».- 2009.-196 с.
134. Сагандыкова Н.С. Особенности микрофлоры небных миндалин при хроническом воспалении / Н. С. Сагандыкова // Вестник КазНМУ.-2015.- №2.
135. Салтанова Ж. Е. Хронический тонзиллит, этиологические и патогенетические аспекты развития метатонзиллярных осложнений / Ж. Е. Салтанова // Вестник оториноларингологии. - 2015.- т. 80. № 3.- С. 65-70.
136. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Б63 Биологическая химия. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. — 364 с.
137. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2-е изд. М.: Издательство БИНОМ; 2008.
138. Серов В. В. Применение лазеротерапии в профилактике хронических тонзиллитов у детей / В. В. Серов, П. А. Суин, Е. В. Головин и соавт. // Вестник российской военно-медицинской академии. -2015.- № 2 (50).- С. 49-52.
139. Соколов Н. С. Подходы к этиологической диагностике острого тонзиллофарингита в практике врача-оториноларинголога / Н. С. Соколов, И. В.

Отвагин // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2016.-№ 3 (15).-С. 57-61.

140. Солдатов И.Б. Лекции по оториноларингологии: учебное пособие (учебная литература для студентов мед. институтов) / И. Б. Солдатов. - М.: Медицина, 1990. -282 с.

141. Солдатский Ю. Л. Выбор оптимального средства для местного лечения фарингита у детей / Ю. Л. Солдатский, Е. К. Онуфриева, С. Ф. Гаспарян, Н. В. Щепин, А. М. Стеклов // Вопросы современной педиатрии. -2012.-№11 (2).-С.94-97

142. Тихомирова И.А. Предпосылки поиска генетических факторов, влияющих на развитие хронического тонзиллита у детей / И. А. Тихомирова // Российская оториноларингология. - 2006.- 24(4).-С. 23-26.

143. Топчий Н. В. Ликвидация дисбиоза возможность профилактики заболеваний в общей врачебной практике? / Н. В. Топчий // Рус. мед. журн. - 2007. -№ 16.-С. 1185-1192.

144. Трищенко С.Н. Изменение показателей местного иммунитета у юных хоккеистов при лечении хронического тонзиллита / С. Н. Трищенко // Вестник спортивной науки. -2015.-№ 4.-С. 35-38.

145. Туманов А.А. Микробный пейзаж небных миндалин при разных формах хронического тонзиллита / А. А. Туманов // Российская оториноларингология.- 2015.- № s1.-С. 117-119.

146. Фабелинский И. Л. Открытие комбинационного рассеяния света в России и Индии / И. Л. Фабелинский // Успехи физических наук. - 2003. - том 173, №10.- С. 1137–1144.

147. Финогеев Ю. П. Острые тонзиллиты у инфекционных больных / Ю. П. Финогеев, Д. А. Павлович, С. М. Захаренко и соавт. // Журнал инфектологии.- 2011.-№ 4 (3).

148. Цыркунов В. М., Рыбак Н. А., Васильев А. В. и соавт. Микробиологические и морфологические аспекты хронического тонзиллита / В.

- М. Цыркунов, Н. А. Рыбак, А. В. Васильев и соавт. // Инфекционные болезни. - 2016.- т. 14. № 1. -С. 42-47.
149. Чеботарь И. В. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь [и соавт.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия – 2012. – Том 14, № 1. – С 51-58.
150. Черданцев Д. В. Возможности лазерной спектроскопии в диагностике микроциркуляторных нарушений при экспериментальном панкреатите / Д. В. Черданцев, О. В. Первова, В. В. Салмин и соавт. // Молодой ученый. - 2014.- №4. С. 385-391.
151. Черкасова Е. Н. Острый тонзиллит на педиатрическом участке: этиологическая диагностика и лечение / Е. Н. Черкасова, Т. А. Кузнецова // Педиатрическая фармакология. - 2015.- 12 (2).-С. 197–200.
152. Черныш А.В. Клинико-иммунологические аспекты хронического тонзиллита: автореф. дисс. ... доктора мед. наук.: 14. 01. 03 / Черныш Александр Владимирович. - СПб., 1996.-36 с.
153. Черныш А.В., Гофман В.Р. Хронический тонзиллит как вторичный признак иммунодефицитного состояния организма / А. В. Черныш, В. Р. Гофман // Новости оториноларингологии и логопатологии. - 1995. - № 3. - С. 145.
154. Чистякова В. Р. Ангина и хронический тонзиллит (аналитический обзор) / В. Р. Чистякова // Вестник оториноларингологии. - 2012.- 1.-С. 68-76.
155. Шахов А. В. Оптическая когерентная томография в диагностике заболеваний гортани: автореф. дисс. ... доктора мед. наук.: 14. 01. 03 / Шахов Андрей Владимирович. - Москва, 2003.-236 с.
156. Шиленкова В. В. Тонзиллофарингиты. Роль местной противовоспалительной терапии / В. В. Шиленкова // Медицинский Совет. - 2018.-№6. С.-56-60.
157. Шпынев К. В. Современные подходы к диагностике стрептококкового фарингита / К. В. Шпынев, В. А. Кречиков // КМАХ. - 2007.- т. 9 (1).- С. 20–33.

158. Шульга И. А. К вопросу диагностики хронического тонзиллита (литературный обзор) / И. А. Шульга, С. И. Красиков, В. Д. Рязанов // Вестник челябинской областной клинической больницы.-2014.- № 1 (25).- С. 28-30.
159. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине / С. Юденфренд. - М.: Мир, 1965.
160. Яковенко В. Д. К вопросу о причинно-следственных взаимосвязях в патогенезе хронического тонзиллита как инфекционно-аллергического процесса / В. Д. Яковенко, В.Ф. Филатов, И. Л. Дикий // Вестник оториноларингологии. - 1990.- №2.- С.52-56.
161. Ялымова Д. Л. Хронический тонзиллит в практике оториноларинголога и кардиолога / Д. Л. Ялымова, В. Н. Костюк, В. В. Вишняков и соавт. // Кардиосоматика.- 2014.- 3-4.-С. 60-65.
162. Abu Bakar M. Chronic tonsillitis and biofilms: a brief overview of treatment modalities / Abu Bakar M., McKimm J., Haque S.Z. et al. // J Inflamm Res. -2018.- 11:329–337.
163. Alan L. Acute pharyngitis: etiology and diagnosis / L. Alan // Pediatrics.- 1996.- P. 949–954.
164. Ali Momenpour T. Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy for the Detection of Glutamate and -Aminobutyric Acid in Serum by Partial Least Squares Analysis / Ali Momenpour T., Monfared Vidhu S., Tiwari Vance L. et al. // IEEE Photonics journal.- 2015.- 7:3.
165. Al-Mazrou K. A. Adherent biofilms in adenotonsillar diseases in children / Al-Mazrou K. A., Al-Khattaf A. S. // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.-2008.- 134. P.20–23.
166. Almond L. M. Endoscopic Raman spectroscopy enables objective diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus / L. M. Almond, J. Hutchings, G. Lloyd, H. Barr, N. Shepherd, J. Day, O. Stevens, S. Sanders, M. Wadley, N. Stone, C. Kendall // Gastrointest Endosc.- 2014.-79(1). P.37-45.
167. Anjos L. M. Streptococcal acute pharyngitis / L. M. Anjos, M. B. Marcondes, M. F. Lima et al. // Rev Soc Bras Med Trop. -2014.-47(4). P.409-13.

168. Ashraf M. J. Fine needle aspiration cytology of palatine tonsils: a study of 112 consecutive adult tonsillectomies / M. J. Ashraf, N. Azarpira, B. Nowroozizadeh et al. // *Cytopathology*.-2010. - 21(3).-170-5.
169. Babakurban S. T. Fractalkine receptor polymorphism and chronic tonsillitis / S. T. Babakurban, S. S. Erbek, Y. K. Terzi, F. Arslan, F. I. Sahin // *Eur Arch Otorhinolaryngol*.- 2014.-271(7):2045-2048.
170. Bentley J. N. Real-time image guidance for brain tumor surgery through stimulated Raman scattering microscopy / J. N. Bentley, M. Ji, X. S. Xie, D. A. Orringer // *Expert Rev Anticancer Ther*.- 2014.-14(4).-P. 359-61.
171. Bergholt M. S. Fiber-optic Raman spectroscopy probes gastric carcinogenesis in vivo at Endoscopy / M. S. Bergholt, W. Zheng, K. Y. Ho et al. // *J Biophotonics*. - 2013. -6.-P.49-59.
172. Bhat S. Application of HPLC combined with laser induced fluorescence for protein profile analysis of tissue homogenates in cervical cancer / S. Bhat, A. Patil, L. Rai et al. // *The Scientific World Journal*.- 2012.-2012:976421.
173. Branche A. R. Parainfluenza Virus Infection / A. R. Branche, A. R. Falsey // *Semin Respir Crit Care Med*.- 2016.-37(4):538-54.
174. Camp C. H. Jr. High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues / C. H. Jr. Camp, Y. J. Lee, J. M. Heddleston et al. // *Nat. Photonics* 8.- 2014.- P. 627–634.
175. C. J. De Grauw. Line-Scan Raman Microspectrometry for Biological Application / C. J. De Grauw, C. Otto, and J. Greve // *Appl. Spectrosc*. 51, 1607-1612 (1997).
176. Charlier-Bret N. Rapid antigen detection tests for diagnosis of group A streptococcal pharyngitis: comparative evaluation of sensitivity and practicability of 16 in vitro diagnostics medical devices performed in July 2002 by the French health products safety agency (Afssaps) as part of its market control mission / N. Charlier-Bret, B. Boucher, C. Poyart et al. // *Pathol Biol (Paris)*.- 2004.-52(8):438-43.

177. Christian K. Raman difference spectroscopy: a non-invasive method for identification of oral squamous cell carcinoma / K. Christian, M. Johanna, A. Werner et al. // *Biomed Opt Express*.-2014.-5(9):3252–3265.
178. Christoph Krafft. Multi-core fiber with integrated fiber Bragg grating for background free Raman sensing / Christoph Krafft, Sebastian Dochow, Ines Latka, et al. // *Proc. SPIE*.-2013.- 8577.- Optical Biopsy XI.
179. Cordero E. In-vivo Raman spectroscopy: From basics to applications / E. Cordero // *Journal of Biomedical Optics*. -2018. - 23(07).
180. Danchin M.H. Burden of acute sore throat and group A streptococcal pharyngitis in school-aged children and their families in Australia / M. H. Danchin, S. Rogers, L. Kelpie et al. // *Pediatrics*. – 2007. – №120. – P. 950-957.
181. Davey M. E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M. E. Davey, G. A. O'toole // *Microbiol Mol Biol Rev*. -2000.-64(4):847-67.
182. den Bakker MA *Ned Tijdschr Geneeskd*. Is histopathology still the gold standard? / M. A. den Bakker, *Ned Tijdschr Geneeskd* // *Ned Tijdschr Geneeskd*.-2017.-160:D981.
183. Depciuch J. Application of Raman Spectroscopy and Infrared Spectroscopy in the Identification of Breast Cancer / J. Depciuch, E. Kaznowska, I. Zawlik et al. // *Applied spectroscopy*.- 2016.-70(2). P. 251-263.
184. Dillon Schiff. Spectroscopic Method for Fast and Accurate Group A Streptococcus Bacteria Detection / Dillon Schiff, Hagit Aviv, Efraim Rosenbaum et al. // *Anal. Chem*.- 2016.- 88 (4).- PP 2164–2169.
185. Dochow S. Multicore fiber with integrated fiber Bragg gratings for background-free Raman sensing / Dochow S., Latka I., Becker M., Spittel R., Kobelke J., Schuster K., Graf A., Brückner S., Unger S., Rothhardt M., Dietzek B., Krafft C., Popp J. // *Opt Express*.-2012.-20(18):20156-69.
186. Drakaki E. Laser-induced fluorescence made simple: implications for the diagnosis and follow-up monitoring of basal cell carcinoma / E. Drakaki, C. Dessinioti, A. J. Stratigos et al. // *Journal of biomedical optics*.- 2014.-19(3):30901.

187. Ebell M.H. The rational clinical examination. Does this patient have strep throat? / M. H. Ebell; M. A. Smith; H. C. Barry; K. Ives, M. Carey // JAMA.- 2000.- 284(22), 2912-2918.
188. Effendi Widjaja. Classification of ENT Tissue Using Near-Infrared Raman Spectroscopy and Support Vector Machines / E. Widjaja, W. Zheng, Zh. Huang // Article in Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering.- 2005.
189. Esposito S. Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options / S. Esposito, G. De Simone // Infez Med.- 2017.- 25(4).-PP 301-310.
190. Evans C. L. Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy / C. L. Evans, E. O. Potma, M. Puoris'haag, D. Côté , C. P. Lin, X. S. Xie // Proc Natl Acad Sci U S A.-2005.-102(46):16807-12.
191. Fontes M. J. Early diagnosis of streptococcal pharyngotonsillitis: assessment by latex particle agglutination test / M. J. Fontes, F. B. Bottrel, M. T. Fonseca et al. // J Pediatr (Rio J).- 2007.- 83(5):465-70.
192. Furuncuoglu Yavuz. Acute exudative tonsillitis in adults: the use of the Centor score and some laboratory tests / Furuncuoglu Yavuz , Filiz Saglam, Ahmet Kutluhan // Turkish Journal of Medical Sciences.-2016.-1755-1759.
193. Galli J. Biofilm formation by Haemophilus influenzae isolated from adenotonsil tissue samples, and its role in recurrent adenotonsillitis / J. Galli, L. Calò, F. Ardito, et al. // Acta Otorhinolaryngol Ital.-2007.-27(3):134–138.
194. Georgalas CC., Tolley NS, Narula PA. Tonsillitis // BMJ Clin Evid.- 2014.- 2014:0503.
195. Gerber MA. Rapid diagnosis of pharyngitis caused by group A streptococci / C. C. Georgalas, N. S. Tolley, P. A. Narula // Clin Microbiol Rev.- 2004.-17:571-80.
196. Gogiashvili K.T. Laser induced fluorescence spectroscopy for detection of Erlikh adenocarcinoma (a pilot study) / K. T. Gogiashvili, M. M. Zarmukhtashvili., M. Z. Tsiklauri, I. M. Imnadze, I. D. Amiranashvili I.D. // Georgian medical news.- 2013.- (223):76-80.

197. Gonzales R. (2001). Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States / R. Gonzales, D. Malone, J. Maselli, M. A. Sande // *Clin. Infect Dis.* 33(6): 757-762.
198. Haapasalo K. The Psoriasis Risk Allele HLA-C*06:02 Shows Evidence of Association with Chronic or Recurrent Streptococcal Tonsillitis / K. Haapasalo, L. L. E. Koskinen, J. Suvilehto et al. // *Infect Immun.*- 2018.- 21;86(10).
199. Haj-Hosseini N, Richter J, Andersson-Engels S, Wardell K. Optical touch pointer for fluorescence guided glioblastoma resection using 5-aminolevulinic acid / N. Haj-Hosseini, J. Richter , S. Andersson-Engels, K. Wardell // *Lasers Surg Med.*- 2010.-42: 9–14.
200. Haka A. S. et al. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy / A. S. Haka AS // *Proc Natl Acad Sci USA.*- 2005.-102:12371–12376.
201. Hamada M. Development of a ligase detection reaction/CGE method using a LIF dual-channel detection system for direct identification of allelic composition of mutated DNA in a mixed population of excess wild type DNA / M. Hamada, K. Shimase, K. Noda, K. Tsukagoshi, M. Hashimoto // *Electrophoresis.* - 2013.-34(9-10):1415-1422.
202. Hamada M. Discriminative detection of low-abundance point mutations using a PCR/ligase detection reaction/capillary gel electrophoresis method and fluorescence dual-channel monitoring / M. Hamada, K. Shimase, K. Tsukagoshi, Hashimoto M. // *Electrophoresis.*- 2014.-35(8):1204-1210.
203. Harabuchi Y. Recent advances in the immunological understanding of association between tonsil and immunoglobulin A nephropathy as a tonsil-induced autoimmune/inflammatory syndrome / Y. Harabuchi, M. Takahara // *Immun Inflamm Dis.*- 2019.-7(2):86–93.
204. Harris A. T. Raman spectroscopy in head and neck cancer / A. T. Harris, A. Rennie, H. Waqar-Uddin et al. // *Head & Neck Oncology.*- 2010.-2:26.
205. Herbert B. Allen. Psoriasis, Chronic Tonsillitis, and Biofilms: Tonsillar Pathologic Findings supporting a MicrobialHypothesis / Herbert B. Allen, Saagar

- Jadeja, Rina M. Allawh, Kavita Goyal // *Ear, Nose & Throat Journal*. 2018.- №97 (3); P. 79-82.
206. Hidayat Qarqani Bukhari et al. El-Sayed Hidayat Qarqani Bukhari et al / Prevalence study of acute tonsillitis among paediatrics age groups // *International Journal of Medical Reviews and Case Reports*.-2019.
207. Hollon T. Improving the accuracy of brain tumor surgery via Raman-based technology / T. Hollon, S. Lewis, C. W. Freudiger, Xie X Sunney, D. A. Orringer // *Neurosurg Focus*.-2016.-40(3):E9.
208. Horsnell J. Raman spectroscopy--a new method for the intra-operative assessment of axillary lymph nodes / J. Horsnell, P. Stonelake, J. J. Christie-Brown, G. Shetty, J. Hutchings J, C. Kendall, N. Stone. *Analyst*.-2010.-135(12):3042-7.
209. Howell S. Laser raman spectroscopy as a potential chair-side microbiological diagnostic device / S. Howell, A. Haffajee, T. Pagonis T. et al. // *J. Endod*.- 2011.- 37 (7): 968-972.
210. Huang Z. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer / Z. Huang, A. McWilliams, H. Lui, D. I. McLean, S. Lam, H. Zeng // *Int J Cancer*.- 2003.-107(6):1047-52.
211. Ikram M. et al. The histopathology of routine tonsillectomy specimens: results of a study and review of literature / M. Ikram, M. A. Khan, M. Ahmed, et al. // *Ear Nose Throat J*.- 2000.- 79(11):880-2.
212. Jensen A. Molecular mapping to species level of the tonsillar crypt microbiota associated with health and recurrent tonsillitis / A. Jensen, H. Fagö-Olsen, C. H. Sørensen, et al. // *PLoS One*. -2013.- 8(2):e56418.
213. Jermyn M. Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans / M. Jermyn, K. Mok, J. Mercier, et al. // *Sci Transl Med*. -2015.- 7(274):274.
214. Jiajian Xu. Epstein-Barr virus (EBV) encoded latent membrane protein 1 (LMP-1) triggered inflammatory response through NFκB p65 signaling pathway in tonsils / Jiajian Xu , Zhenyun Huang, Dabo Liu, et al. // *Int J Clin Exp Pathol*.- 2017.- 10(1):537-543.

215. Jordan R. W. Sensitivities, specificities, and predictive values of microbiological culture techniques for the diagnosis of prosthetic joint infection / R. W. Jordan, N. A. Smith, A. Saithna et al. // *Biomed Res Int.*- 2014.-2014:180416.
216. Judith M. Martin. Pharyngitis and Streptococcal Throat Infections / Judith M. Martin // *Pediatric Annals.*-2010.- 39(1):22-7.
217. Kalra M.G. Common Questions About Streptococcal Pharyngitis / M. G. Kalra, K. E. Higgins, E. D. Perez // *Am Fam Physician.*- 2016.-1. 94 (1)-P. 24–31
218. Kanniyappan U. An in vitro diagnosis of oral premalignant lesion using time-resolved fluorescence spectroscopy under UV excitation- a pilot study / U. Kanniyappan, P. Aruna, D. Koteeswaran et al. // *Photodiagnosis and photodynamic therapy.*- 2016.- pii: S1572-1000(16)30014-X.
219. Kelvin W. C. Poon. Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human blood plasma using Raman spectroscopy / Kelvin W. C. Poon, Fiona M. Lyng, Peter Knief, et al. // *Analyst.* -2012.-8.
220. Kendall C. Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics / Kendall C., Isabelle M., Bazant-Hegemark F., Hutchings J., Orr L., Babrah J., Baker R., Stone N. // *Analyst.* -2009.-134(6):1029-45.
221. Kendall C. Raman spectroscopy, a potential tool for the objective identification and classification of neoplasia in Barrett's oesophagus / Kendall C., Stone N., Shepherd N., Geboes K., Warren B., Bennett R., Barr H. // *J Pathol.*-2003.-200(5):602-9.
222. Khijwania S. K. Optimized fiber optic bioprobe with high spectral contrast exploiting laser-induced fluorescence for malignancy diagnosis / S. K. Khijwania, C. K. Kim, J. P. Singh, S. C. Burgess // *Applied optics.*- 2008.-47(35):6615-6624.
223. Kinalwa M. Determination of protein fold class from Raman or Raman optical activity spectra using random forests / M. Kinalwa, E. W. Blanch, A. J. Doig // *Protein Sci.*- 2011.- 20 (10): 1668-1674.
224. Kindo A. J. Role of surface swab, core swab and fine needle aspiration in isolating the core bacteria in inflammed tonsils / A. J. Kindo, L. Somu, P. Srikanth, et al. // *Indian J Pathol Microbiol.*- 2001 Jul.-44(3):293-5.

225. Kirsch M. Advances in optical biopsy—correlation of malignancy and cell density of primary brain tumors using Raman microspectroscopic imaging / M. Kirsch, G. Schackert, C. Krafft, et al. // *Analyst*. -2012.- 137 (2012) 5533–5537.- P.121–134.
226. Koljenovic S. Discriminating vital tumor from necrotic tissue in human glioblastoma tissue samples by Raman spectroscopy / S. Koljenovic, Choo-Smith, L. P. Schut, T. C. B., Kros, J. M., van den Berge. H. J., G. S. Puppels // *Lab. Invest.* - 2002. - 82. 1265.
227. Kong L. A rapidly modulated multifocal detection scheme for parallel acquisition of Raman spectra from a 2-D focal array / L. Kong, J. Chan // *Anal. Chem.* - 86. 2014. - 6604–6609.
228. Kong K. Increasing the speed of tumour diagnosis during surgery with selective scanning Raman microscopy / K. Kong, C. J. Rowlands, S. Varma et al. // *J. Mol. Struct.*-2014.- 1073.-58.
229. Kong K. Towards intraoperative diagnosis of tumours during breast conserving surgery by selective sampling Raman micro-spectroscopy / K. Kong, F. Zaabar, E. Rakha, et al. // *Phys. Med. Biol.* 59.- 2014.- 6141–6152.
230. Kume T. Assessment of coronary arterial plaque by optical coherence tomography / T. Kume, T. Akasaka, T. Kawamoto, N. Watanabe, E. Toyota, Y. Neishi, et al. // *Am J Cardiol.*- 2006.-97.-P. 1172–1175.
231. Kunnamo A. Tonsillitis in children: unnecessary laboratory studies and antibiotic use / A. Kunnamo, M. Korppi, M. Helminen // *World J Pediatr.*- 2016.- 12(1):114-7.
232. M. Larraona-Puy. Development of Raman microspectrometry for automated detection and imaging of basal cell carcinoma / M. Larraona-Puy, A. Ghita, A. Zoladek, W. Perkins, S. Varma, I. H. Leach, A. A. Koloydenko, H. Williams, I. Notingher // *J. Biomed. Opt.*-2009. - 14, 054031.
233. Lattermann A. Characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman and FTIR imaging / A. Lattermann, C. Matthäus, N. Bergner, et al. // *J Biophotonics.* - 2013. - 6.1, P. 110–121.

234. Lennart Johansson. Rapid test, throat culture and clinical assessment in the diagnosis of tonsillitis / L. Johansson, N.-O. Månsson // *Family Practice*.-2003.- V. 20, Issue 2.-P. 108–111.
235. Linder J.A. Antibiotic treatment of children with sore throat / J. A. Linder; D. W. Bates; G. M. Lee; J. A. Finkelstein // *JAMA*.- 2005.- 294(18), 2315- 2322.
236. Lorenzo M. P. Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: application to bipolar disorder study / M. P. Lorenzo, A. Villaseñor, A. Ramamoorthy, et al. // *Electrophoresis*. - 2013.- 34(11):1701-1709.
237. Luciana Guedes Vilela. Tonsillar hyperplasia and recurrent tonsillitis: clinical-histological correlation / Luciana Guedes Vilela et al. // *Braz. j. Otorhinolaryngol.* - 2013.- vol.79, n.5.- PP.603-608.
238. Lundin M. S. Lemierre's syndrome and 2016 American College of Physician guidelines for pharyngitis: no to empiric coverage for bacterial pharyngitis. While no role for routine *Fusobacterium* PCR, keep suspicion for this pathogen / M. S. Lundin, S. Bastakoti, D. Havlichek et al. // *BMJ Case Rep*.- 2018.- 19.
239. Mahajan G. D. Study of common bacterial isolates in acute tonsillitis in India / G. D. Mahajan, Mayur Ingale // *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research Otorhinolaryngology*.- 2017.- 6 (2), 59-62.- P59-62.
240. Malini R. Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study / R. Malini, K. Venkatakrishna, J. Kurien et al. // *Biopolymers*. -2006.-81(3).-PP. 179-93.
241. Mallia R.J. In vivo temporal evolution of ALA-induced normalized fluorescence at different anatomical locations of oral cavity: application to improve cancer diagnostic contrast and potential / R. J. Mallia, N. Subhash, P. Sebastian et al. // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. - 2010.-7(3):162-75.
242. Marcu Laura. Fluorescence Lifetime Techniques in Medical Applications / L. Marcu // *Annals of Biomedical Engineering*. -2012. - 40.2 (2012).-PP. 304–331.

243. Matousek P. Recent advances in the development of Raman spectroscopy for deep non-invasive medical diagnosis / P. Matousek, N. Stone // *J. Biophotonics* 6.-2013.- PP. 7–19.
244. Meyer T. Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis / T. Meyer, N. Bergner, C. Bielecki, C. Krafft, D. Akimov, B. F. Romeike, R. Reichart, R. Kalff, B. Dietzek, J. Popp // *J. Biomed. Opt.*-2011.-16(2):021113.
245. Millington A. J. Current trends in tonsillitis and tonsillectomy / A. J. Millington, J. S. Phillips // *Ann R Coll Surg Engl.*-2014.-96(8):586-9.
246. Mogoantă C. A. Chronic tonsillitis: histological and immunohistochemical aspects / C. A. Mogoantă, E. Ioniță, D. Pirici et al. // *Rom J Morphol Embryol.*-2008.-49(3):381-6.
247. Monfared A. M. T. Raman spectroscopy for clinical-level detection of heparin in serum by partial least-squares analysis / A. M. T. Monfared, V. S. Tiwari, M. M. Tripathi, H. Anis. // *J. Biomed. Opt.* -2013.-18(2), 027010.
248. Morijama T. Tonsillectomy and steroid pulse therapy for IgA nephropathy / T. Morijama, K. Nitta // *Tohoku J Exp Med.*-2011.-224(4):243-50.
249. Murray R. C. Chronic streptococcal and non-streptococcal pharyngitis / R. C. Murray, S. K. Chennupati // *Infect. Disord. Drug Targets.* -2012. - Vol. 12, № 4. - PP. 281-285.
250. Mycek M.-A. Handbook of biomedical fluorescence / Mycek M.-A., Pogue B.W.// N.Y.: Marcel Dekker Inc.-2003.-665 p.
251. Naina P. et al. Chronic pharyngitis: role of atypical organisms: a case control study from South India / P. Naina et al. // *Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* -2012.-147(5):894-899.
252. Nakhoul G. N. Management of adults with acute streptococcal pharyngitis: minimal value for backup strep testing and overuse of antibiotics / G. N. Nakhoul, J. J. Hickner // *Gen Intern Med.*-2013.-28(6):830-4

253. Neugebauer U. S. Fast differentiation of SIRS and sepsis from blood plasma of ICU patients using Raman spectroscopy / U. Neugebauer, S. Trenkmann, T. Bocklitz, D. et al. // *J Biophotonics*.- 2014.- 7(3-4):232-40.
254. Okoye E. L. Epidemiological Survey of Tonsillitis Caused By *Streptococcus pyogenes* among Children in Awka Metropolis (A Case Study of Hospitals in Awka Community, Anambra State) / E. L. Okoye, C. J. Obiweluzor, B. O. Uba, F. N. Odunukwe // *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. - 2016.-11 (3). PP. 54-58.
255. Önerci T. M. Acute Tonsillopharyngitis / T. M. Önerci // In: *Diagnosis in Otorhinolaryngology*. Springer, Berlin, Heidelberg. -2009.
256. Pandey R. Discerning the differential molecular pathology of proliferative middle ear lesions using Raman spectroscopy / R. Pandey, S. K. Paidi, J. W. Kang, et al. // *Sci Rep*. 2015.- 5:13305.
257. Patil A. Ultra-sensitive high performance liquid chromatography-laser-induced fluorescence based proteomics for clinical applications / A. Patil, S. Bhat, K. M. Pai et al. // *Journal of proteomics*.- 2015.-127(Pt A). PP. 202-210.
258. Pence I. Clinical instrumentation and applications of Raman spectroscopy / I. Pence, Mahadevan-Jansen A. // *Chem Soc Rev*.- 2016.-45(7):1958–1979.
259. Pichichero M. E. Group A streptococcal tonsillopharyngitis: Cost-effective diagnosis and treatment / M. E. Pichichero // *Ann. Emerg. Med.* - 1995.- 25(3). PP. 390-403.
260. Poon K.W. C. Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human blood plasma using Raman spectroscopy / K. W. C. Poon, F. M. Lyng, P. Knief et al. // *The Analyst*.- 2012.- 137.- 1807-1814.
261. Prati F. Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis / F. Prati, E. Regar, G. S. Mintz, A. Arbustini, C. Di Mario, I. K. Jang, T. Akasaka, M. Costa, et al. // *Eur Heart J*.- 2010.- 31(4).-PP. 401–415.

262. Rajaram N. Pilot clinical study for quantitative spectral diagnosis of non-melanoma skin cancer / N. Rajaram, J. S. Reichenberg, M. R. Migden et al. // *Lasers in surgery and medicine.* - 2010.-42(10):716-27.
263. Raju G. Evaluation of microbial flora in chronic tonsillitis and the role of tonsillectomy / G. Raju G., Esther Mary Selvam // *Bangladesh Journal of Otorhinolaryngology.* - 2012.- Vol 18, No 2.
264. Regar E. Optical coherence tomography in cardiovascular research / E. Regar, P. W. Serruys, T. Ge. Van Leeuwen // London: Informa Healthcare.- 2007.
265. Renner B. Environmental and non-infectious factors in the aetiology of pharyngitis (sore throat) / B. Renner, C. A. Mueller, A. Shephard // *Inflamm Res.*- 2012.-61(10):1041–1052.
266. Rogatkin D. Laser-based non-invasive spectrophotometry – an overview of possible medical application / D. Rogatkin, V. Shumskiy, S. Tereshenko, P. Polyakov // *Photonics & Laser in Medicine.*- 2013.- V. 2. № 3. PP. 225–240.
267. Rūta Pribušienė. Correlation between throat-related symptoms and histological examination in adults with chronic tonsillitis / R. Pribušienė, V. Šarauskas, A. Kuzminienė et al. // *Medicina.*- 2015.-V. 51, Issue 5.-P. 286-290.
268. Saad Musbah Alasil. Evidence of Bacterial Biofilms among Infected and Hypertrophied Tonsils in Correlation with the Microbiology, Histopathology, and Clinical Symptoms of Tonsillar Diseases / Saad Musbah Alasil, Rahmat Omar, Salmah Ismail et al. // *Int J Otolaryngol.*- 2013.-408238.
269. Saar B. G. Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering / B. G. Saar, C. W. Freudiger, J. Reichman, C. M. Stanley, G. R. Holtom, X. S. Xie // *Science.*-2010.-330(6009):1368-70.
270. Saetti R. Efficacy of autofluorescence videoendoscopy in the diagnosis of laryngeal lesions / R. Saetti, F. Derosas, M. Silvestrini et al. // *Acta otorhinolaryngologica Italica.*- 2007.- 27(4):181-185.
271. Sahin M. S. Prevalence of rheumatic heart disease in patients with recurrent tonsillitis and elevated anti-streptolysin O titers / M. S. Sahin, M. Ulvi Yalcin, D. Kocyigit // *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology.*- 2016.

272. Sahu A. Serum based diagnosis of asthma using Raman spectroscopy: an early phase pilot study / A. Sahu, K. Dalal, S. Naglot et al. // *PLoS One.* - 2013.- 8(11):e78921.
273. Salzer R. Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brainmetastases / R. Salzer, C. Krafft // *Anal. Bioanal. Chem.*-2010. - 398. - 1707–1713.
274. Scheuer-Karpin R. Cytology of the tonsils / Scheuer-Karpin R., Baudach A. // *Lymphology.*- 1970.-3(3):109-14.
275. Schlücker S. Raman microspectroscopy: a comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies / S. Schlücker, M. D. Schaeberle, S. W. Huffman et al. // *Anal Chem.* -2003.-75(16):4312-8.
276. Schwedler C. Identification of 34 N-glycan isomers in human serum by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence allows improving glycan biomarker discovery / C. Schwedler, M. Kaup, S. Weiz et al. // *Analitical and bioanalitical chemistry.*- 2014.-406(28):7185-7193.
277. Sebastian Wachsmann-Hogiu. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy--from single cells to humans / Sebastian Wachsmann-Hogiu, Tyler Weeks, Thomas Huser // *Curr Opin Biotechnol.*- 2009.- 20(1):63-73.
278. Serdar Uğraş. Chronic tonsillitis can be diagnosed with histopathologic findings / S. Uğraş, A. Kutluhan // *Eur J Gen Med.*-2008.-5(2):95-103. P 1-9
279. Singh S. P. Recent advances in optical diagnosis of oral cancers: Review and future perspectives / S. P. Singh, O. Ibrahim, H. J. Byrne, J. W. Mikkonen, A. P. Koistinen, A. M. Kullaa, F. M. Lyng // *Head and neck.*- 2015.
280. Shim M. G. In vivo near-infrared Raman spectroscopy: demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy / M. G. Shim, L. M. Song, N. E. Marcon, B. C. Wilson // *Photochem Photobiol.*- 2000.-72:146–150.
281. Shulman S. T. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Management of Group A Streptococcal Pharyngitis: 2012 Update by the Infectious Diseases Society of America / S. T. Shulman, A. L. Bisno, H. W. Clegg et al. // *Clin. Infect. Dis. Adv. Access.*-2012.

282. Sieroń A. The role of fluorescence diagnosis in clinical practice / A. Sieroń, K. Sieroń-Stołtny, A. Kawczyk-Krupka, et al. // *Onco Targets Ther.* -2013.-6:977–982.
283. Singh S. P. Recent advances in optical diagnosis of oral cancers: Review and future perspectives / S. P. Singh, O. Ibrahim, H. J. Byrne, et al. // *Head and neck.* -2015.
284. Smith J. Raman spectral mapping in the assessment of axillary lymph nodes in breast cancer / J. Smith, C. Kendall, A. Sammon, J. Christie-Brown, N. Stone // *Technol Cancer Res Treat.*-2003.-2(4):327-32.
285. Spinks A. Antibiotics for sore throat / A. Spinks, P. P. Glasziou, C. B. Del Mar // *Cochrane Database Syst Rev.*-2013.
286. Stone N. Raman spectroscopy for early detection of laryngeal malignancy: preliminary results / N. Stone, P. Stavroulaki, C. Kendall et al. // *Laryngoscope.*-2000.-110(10 Pt 1):1756-63.
287. Strola S. A. Single bacteria identification by Raman spectroscopy / S. A. Strola, J. C. Baritoux, E. Schultz et al. // *J Biomed Opt.*- 2014.-19(11):111610.
288. St. Sauver J. L. Population-based prevalence of repeated group A- hemolytic streptococcal pharyngitis episodes / J. L. St. Sauver; A. L. Weaver; L. J. Orvidas; R. M. Jacobson; S. J. Jacobsen // *Mayo Clin. Proc.*- 2006.- 81.- 1172-1176.
289. Susanna Esposito. Acute Tonsillopharyngitis Associated with Atypical Bacterial Infection in Children: Natural History and Impact of Macrolide Therapy / Susanna Esposito, Samantha Bosis, Enrica Begliatti et al. // *Clinical Infectious Diseases.*-2006.- V. 43, Issue 2.-P.206–209.
290. Szekeres G. P. SERS Probing of Proteins in Gold Nanoparticle Agglomerates / G. P. Szekeres, J. Kneipp // *Front Chem.* - 2019.-7:30.
291. Takahara M. Treatment outcome and prognostic factors of tonsillectomy for palmoplantar pustulosis and pustulotic arthro-osteitis: A retrospective subjective and objective quantitative analysis of 138 patients / M. Takahara, Y. Hirata, T. Nagato, K. Kishibe, A. Katada, T. Hayashi, M. Kishibe, A. Ishida-Yamamoto, Y. Harabuchi // *J Dermatol.*-2018.-45(7):812-823.

292. Tewfik T.L. Tonsillopharyngitis: clinical highlights / T. L.Tewfik, M. Al Garni // *J Otolaryngol.* -2005.-34 Suppl 1:S45-9.
293. Theodoros Skevas. Measuring Quality of Life in Adult Patients with Chronic Tonsillitis / Theodoros Skevas , Christoph Klingmann, Serkan Sertel, Peter K. Plinkert, Ingo Baumann // *The Open Otorhinolaryngology Journal.*- 2010.- 4.-PP. 34-46.
294. Toledano-Sierra P. et al. Usefulness of clinical data and rapid diagnostic tests to identify bacterial etiology in adult respiratory infections / P. Toledano-Sierra et al. // *Medwave.*- 2015.- 15(1):e6067.
295. Uckermann O. Label-free delineation of brain tumors by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy in an orthotopic mouse model and human glioblastoma / O. Uckermann, R. Galli, S. Tamosaityte, et al. // *PLoS One.*- 2014.-8; 9(9):e107115.
296. Wessels M. R. Clinical practice. Streptococcal pharyngitis / M. R. Wessels // *N Engl J Med.*-2011.-364(7):648-55.
297. Winiarski P. Autofluorescence spectroscopy in the differentiation of laryngeal epithelial lesions - preliminary results / P. Winiarski, K. Szewczyk-Golec, P. Orłowski, et al. // *Acta-otolaryngologica.*- 2016.- 16:1-5.
298. Wong Kee Song L. M. Optical spectroscopy for the detection of dysplasia in Barrett's esophagus / L. M. Wong Kee Song // *Clin Gastroenterol Hepatol.*-2005.-3 (7 Suppl 1):S2-7.
299. Xie Y. Relationship between tonsils and IgA nephropathy as well as indications of tonsillectomy / Y. Xie, X. Chen, S. Nishi, I. Narita, F. Gejyo // *Kidney Int.*-2004.-65(4):1135-44.
300. Yabushita H. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography / H. Yabushita, B. E. Bouma, S. L. Houser, H. T. Aretz, I. K. Jang, K. H. Schlendorf et al. // *Circulation.*- 2002.-106(13): 1640–1245.
301. Yaliang Yang. Differential diagnosis of breast cancer using quantitative, label-free and molecular vibrational imaging / Yaliang Yang, Fuhai Li, Liang Gao, Zhiyong Wang, Michael J. Thrall, Steven S. Shen, Kelvin K. Wong, and Stephen T. C. Wong // *Biomedical Optics Express.*-2011.-№2 (8).- PP. 2160-2174.

302. Yingyun Tan. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for the diagnosis of the oral squamous cell carcinoma / Yingyun Tan, Bing Yan , Lili Xue et al. // *Lipids in Health and Disease*.- 2017.- 16:73.