

·综述·

## 近红外二区荧光显影技术在肝胆外科中的应用

刘子豪<sup>1</sup> 尹大龙<sup>2</sup>

<sup>1</sup>安徽医科大学附属省立医院普通外科,合肥 230001;<sup>2</sup>中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)肝胆外科,合肥 230036

通信作者:尹大龙,Email:dalong48@163.com

**【摘要】** 近年来,近红外二区荧光显影技术已在临床应用获得进展。与近红外一区荧光显影技术比较,其在显现肝脏肿瘤和胆道系统中具有更高成像质量、肿瘤敏感性和深层显像能力。近红外二区荧光显影技术作为一种能够提供高信背比和更深组织穿透等特性的术中实时影像技术,能够在提高手术安全性和治疗效果的同时缩短手术时间,具有良好发展前景和拓展潜力。随着新型染料の開発,这项技术能够在肝癌靶向成像、胆管灌注评估和远端胆总管显像等方面发挥更大作用。笔者就近红外二区荧光显影技术应用于肝胆外科的研究进展进行综述。

**【关键词】** 肝肿瘤; 近红外二区; 胆道造影; 荧光显像; 吲哚菁绿

**基金项目:**国家自然科学基金(82172071);安徽省重点研究与开发计划(202104b11020025)

### Application of near infrared region II fluorescence imaging in hepatobiliary surgery

Liu Zihao<sup>1</sup>, Yin Dalong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China; <sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, University of Science and Technology of China, Hefei 230036, China

Corresponding author: Yin Dalong, Email: dalong48@163.com

**【Abstract】** Near infrared region II (NIR-II) fluorescence imaging has made progress in clinical application in recent years and has shown a higher image quality, tumor sensitivity and deeper tissue imaging capability compared to near infrared region I imaging in liver neoplasms and biliary tract system. As a real-time intraoperative imaging technology, which can provide high signal to background ratio and deeper tissue penetration, NIR-II is able to shorten the duration of operation while improve the safety and therapeutic effect of surgery. It has a great prospect and expanding ability. With the development of a bunch of novel NIR-II fluorophores, it is expected to play more important roles in hepatocellular carcinoma targeted imaging, evaluation of bile duct perfusion, distal choledochal imaging and so on. The authors review the progress in the application of NIR-II fluorescence imaging in hepatobiliary surgery.

**【Key words】** Liver neoplasms; Near infrared region II; Cholangiography; Fluorescence imaging; Indocyanine green

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (82172071); Key Research and Development Program of Anhui Province (202104b11020025)

自 2009 年 Ishizawa 等<sup>[1]</sup>首次将近红外荧光技术应用于肝细胞癌病人的肝切除术以来,近红外荧光显影技术在肝胆外科使用频率呈现逐年升高趋势,其功能与作用也不断得到开发和改进。无论肝肿瘤的定位切除还是胆管的识别显影,由近红外染料引导的实时荧光导航能够根据手术需

要,调整术前给药时间和给药方式满足不同手术需求,或精准定位肿瘤,或显示胆管系统走行,从而增加手术精准度和安全性,降低并发症发生率,提高手术治疗效果和病人术后生命质量。近红外荧光显影技术与常规肝胆外科影像学技术如 CT、术中胆道造影比较,具有成本低廉、使用简便、无

DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20210825-00414

收稿日期 2021-08-25

引用本文:刘子豪,尹大龙.近红外二区荧光显影技术在肝胆外科中的应用[J].中华消化外科杂志,2021,20(11):1237-1240. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20210825-00414.



放射性、安全性高等优点<sup>[2-3]</sup>。近红外区根据光谱波长区划分为近红外一区(near-infrared-I, NIR-I)和近红外二区(near-infrared-II, NIR-II),波长范围分别为700~900 nm和900~1700 nm。目前国内主要使用NIR-I进行成像,其探测灵敏度和成像质量等方面还存在不足,需要改进提高。近年来有研究结果显示:NIR-II荧光显影技术的图像质量和临床适用性相较于NIR-I荧光显影技术有大幅提高,在前哨淋巴结和卵巢肿瘤的显像中已有初步应用<sup>[4-8]</sup>。

### 一、近红外荧光显影技术的原理

近红外荧光显影系统主要包括荧光团染料和激发光源和(或)接收相机。近红外荧光染料注入人体后具有较好的水溶性、血浆蛋白亲和力和药代动力学特性,同时生物毒性也较低,可经肝脏或肾脏排泄。荧光分子在近红外区(750~2 500 nm)有吸收,被照射光源激发后可发射近红外光,由接收器接收后生成与白光重叠的荧光融合图像。根据染料被激发后发射光的波峰所在区域可分为NIR-I染料和NIR-II染料。目前国内外开展的荧光引导手术使用的染料主要是以吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)为代表的菁染料类。ICG可被波长750~810 nm光激发,发射波长为830 nm的近红外光,由硅镜头接收后成像<sup>[9]</sup>。

### 二、NIR-I 荧光显影技术的现存问题

已有研究结果显示:利用NIR-I荧光显影技术生成的图像与在白光条件下进行肉眼检查比较,具有巨大优势和发展潜力,但仍有不足<sup>[10-11]</sup>。在肝癌手术中,NIR-I荧光显影技术虽然能够在术中提示术前影像学检查和白光条件下难以发现的微小病灶<sup>[12-13]</sup>。但其也仅能显示距肝表面较浅的癌变组织,深度>8 mm的肿瘤则很难检出<sup>[1,14]</sup>。此外,受限于ICG与肝细胞的高度亲和性和NIR-I较低的波长下限(700 nm),导致在术前静脉注射ICG后,肝癌结节的图像常受到肝脏背景硬化结节干扰,病灶边界和性质难以确定。

肝胆外科手术通常需要术者确定胆管的解剖位置和走行区域。使用NIR-I荧光显影技术进行胆管检查,同样由于前述肝脏的高自发荧光背景的原因,使肝门部胆管结构图像受到干扰而难以辨别,再加上胆管解剖变异、胆管炎性水肿和NIR-I荧光难以穿透较厚结缔组织,使得所获图像的信背比和分辨率较低,准确识别胆管走行十分困难<sup>[15]</sup>。无法有效降低医源性胆管损伤的高风险。因此,想要实现近红外荧光显影技术在肝胆外科更广的临床应用,近红外荧光显影技术的穿透性、信背比和空间分辨率需要进一步提高。

### 三、NIR-II 荧光显影技术的特点和临床可行性

已有研究结果显示:在NIR-II窗口进行成像,图像质量将会进一步提高<sup>[4,6]</sup>。这主要是NIR-II成像能减少深部组织的散射效应,提供厘米级别的探测深度和微米级别的空间分辨率,同时显著消除来自非目标部位的自发荧光,为术者提供清晰的目标轮廓<sup>[16-17]</sup>。NIR-II荧光显影技术进行临床转化的瓶颈主要在于以下方面:(1)缺乏被批准专门用于NIR-II荧光显影技术的染料,虽然已经开发出部分染料如

碳纳米管和小分子染料等,但仍处于临床试验阶段<sup>[18-21]</sup>。(2)NIR-II荧光显影技术所需的高分辨率砷化镓(InGaAs)摄像头并未大规模投入商业使用。已有的研究结果显示:部分发射波长较长(750~900 nm)的NIR-I染料(ICG、IRDye 800CW和IR-12N3)在NIR-II显示出长达1 500 nm的发射尾<sup>[22-23]</sup>。Starosolski等<sup>[24]</sup>构建小鼠模型证实ICG可以在NIR-II窗口进行高质量成像。上述结论提示:研究者进行NIR-II荧光显影技术研究,发射波长峰值位于NIR-II的特殊染料可能非必需,也可以选用较长发射尾的NIR-I染料,这样可以加快NIR-II的临床应用进程。

### 四、NIR-II 荧光显影技术在肝胆外科中应用的优势

#### (一)肿瘤探测

近年来,一种集成可见光和NIR-I/II的多光谱成像仪被用于肝癌病人的人体研究<sup>[25]</sup>。其结果显示:NIR-II荧光显影技术的空间分辨率、组织穿透性和屏蔽组织自发荧光的能力都显著优于NIR-I荧光显影技术,能够让术者获得分辨率和对比度更高的肿瘤图像,从而更好地确定肿瘤切缘<sup>[25]</sup>。此外,利用NIR-II进行原发性肝癌、肝内转移和肝外转移3种情况肝癌结节鉴别检查时,NIR-II荧光显影技术有更好的区分度,这可能成为外科医师在术中初步评估肝癌结节的重要检查手段。在这项研究中,NIR-II荧光显影技术发现NIR-I荧光显影技术没有检出的3枚肿瘤。能够检测出肉眼和NIR-I荧光显影技术遗漏的病变,NIR-II荧光显影技术无疑进一步提升肿瘤手术所需的精准性和根治性。NIR-II荧光显影技术的优越性还体现在手术室照明条件下成像质量不受干扰,而NIR-I荧光显影技术必须关闭照明才能正常运作,否则会影响成像清晰度。

#### (二)胆管识别

Wu等<sup>[26]</sup>构建小鼠胆管急性狭窄模型、胆管穿孔模型和横断模型,并在手术区域上覆盖新鲜猪脂肪组织,模拟现实胆道手术中可能的各种特殊情况如肥胖和炎症环境下增厚的结缔组织,探寻NIR-II胆管显像的临床可行性,并与NIR-I荧光显影技术效果进行横向对比。其结果显示:在猪脂肪组织遮挡手术部位的情况下,NIR-II荧光显影技术显示的胆管狭窄点、穿孔后的胆汁漏情况和胆管横断处图像的辨识度明显强于NIR-I荧光显影技术,且NIR-II荧光显影技术图像中肝脏背景荧光强度低于NIR-I荧光显影技术,这让肝门部胆管结构的辨识更加容易<sup>[26]</sup>。上述视觉进步使外科医师在术中寻找胆管损伤部位和胆汁漏点时,即使术区组织炎症水肿情况不理想或血液、胆汁污染手术视野时也能采取更准确、迅速地治疗措施。

Ishizawa等<sup>[27]</sup>于2009年首次通过NIR-I窗口进行的近红外荧光胆管造影检查运用于LC中,展示出其良好的安全性和实用性。但其主要问题是目前ICG的注射方式为术前30~45 min经静脉注射,短时间间隔会使胆管图像易受肝脏强荧光背景干扰。Verbeek等<sup>[28]</sup>的研究结果显示:ICG最佳注射时间为术前24 h。但长时间间隔会降低病人的管理效率,也不利于日间手术顺利进行。此外,需要行LC且伴有

胆囊炎或肥胖症的病人并不少见,这种情况下 NIR- I 成像质量将会受到极大影响。Liu 等<sup>[29-30]</sup>先后建立猪模型和人体模型,探讨将 ICG 直接注入胆囊进行 NIR- I 显像的可行性。其结果显示:胆囊颈、胆囊管和胆总管等胆道结构能够在注射后几秒内迅速显影。这样避免了静脉注射法需等待胆汁反流才能显示胆囊管的延迟性和不确定性<sup>[31]</sup>。同时经胆囊注射也避免了 ICG 和肝细胞的高亲和力结合,极大减弱了肝脏荧光背景干扰,这类研究成果为近红外荧光胆管造影术前给药方式提供了全新思路,有望解决术前 ICG 注射时机难以把控的难题。此外,Wu 等<sup>[26]</sup>还发现 ICG-胆汁混合溶液和 ICG-水溶液比较在 NIR- II 窗口中展现出了更高的量子产率和光稳定性。其他研究结果显示:这可能是由于胆汁溶液中各种蛋白质组分与 ICG 荧光团结合后降低了粒子扭转运动和三重态的形成,使其更稳定<sup>[32-33]</sup>。

可以预见,如果将经胆囊直接注射 ICG 的给药方式与 NIR- II 荧光显影技术联合应用,所得胆管荧光图像的质量将会进一步提高,胆囊管、胆囊颈和肝门部胆管会更清晰地展现,在面对炎症包裹、各种解剖变异等特殊临床情况时能够更好地帮助术者观察胆道结构。这可为 LC 提供明确的解剖学参考点,提高手术安全性并缩短手术时间。

#### 五、NIR- II 荧光显影技术目前存在的问题

NIR- II 荧光显影技术虽然能提高病人恶性肿瘤检出率,但自身仍有局限性。尽管 NIR- II 荧光显影技术的探测深度较 NIR- I 荧光显影技术有所提升,但与术中超声检查比较,深在的肿瘤依然难以显示,容易出现假阴性。因此,同样要重视术中超声检查的运用和术前传统影像学检查,3 者相互印证、相互补充,可使遗漏原发灶或转移灶的可能性最小化。其次 NIR- II 显像同样会发生假阳性,即在显示恶性病变的同时,也会将肝硬化增生结节等良性病变标记为高亮,这容易扩大手术切除范围。通常这类肝硬化病人肝代偿能力已经受损,扩大切除术后病人出现肝功能不全和各种并发症的风险增加。因此,术中新发现荧光高亮显示而术前影像学检查又未能提示的病灶,要根据术中超声和快速冷冻病理学检查结果等决定手术方案,在追求彻底清除癌灶的同时确保手术安全性<sup>[34]</sup>。

#### 六、小结

NIR- II 荧光显影技术展现了比 NIR- I 荧光显影技术更好的穿透深度、空间分辨率和抗自发背景荧光干扰能力,具有更强的临床适用性和应用拓展能力。在肿瘤探测方面,以 ICG 荧光团介导的肝癌 NIR- I 荧光显影技术采用以胆汁排泄障碍原理为基础的非特异性成像方式,目前一批特定 NIR- II 发射区间的染料正受到密切关注,这类荧光团具有良好的化学结合性和生物相容性,不仅能够用于非特异性肿瘤成像,也可以与相关肿瘤抗体或肽分子结合而实现肿瘤追踪。已有研究实现小鼠乳腺癌实时靶向 NIR- II 荧光显影技术<sup>[35]</sup>。这为今后实现肝脏和胆道肿瘤的近红外荧光实时靶向显影奠定了基础;在血管灌注方面,已有研究实现以小分子介导的小鼠肿瘤 NIR- II 三维血管灌注成像<sup>[20]</sup>。将

NIR- II 血管灌注成像技术应用于胆道重建术中的灌注效果评估,有望提高胆道重建手术的成功率<sup>[36]</sup>。在胆总管成像方面,NIR- II 荧光显影技术具有的高组织穿透性和高信背比有潜力克服十二指肠和胰腺遮挡,实现远端胆总管显示,这有望成为一种用于术中诊断胆总管结石和壶腹周围癌的新型影像学工具。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参 考 文 献

- [1] Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging[J]. *Cancer*, 2009, 115(11): 2491-2504. DOI:10.1002/cncr.24291.
- [2] Quaresima S, Balla A, Palmieri L, et al. Routine near infrared indocyanine green fluorescent cholangiography versus intraoperative cholangiography during laparoscopic cholecystectomy: a case-matched comparison[J]. *Surg Endosc*, 2020, 34(5): 1959-1967. DOI:10.1007/s00464-019-06970-0.
- [3] 迟崇巍,王宏光,许寅喆,等. 光学分子影像"点亮"肝胆胰外科精准手术[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2017, 23(11): 735-740. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2017.11.004.
- [4] Zhu S, Tian R, Antaris AL, et al. Near-infrared-II molecular dyes for cancer imaging and surgery[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(24): e1900321. DOI:10.1002/adma.201900321.
- [5] Ding B, Xiao Y, Zhou H, et al. Polymethine thiopyrylium fluorophores with absorption beyond 1 000 nm for biological imaging in the second near-infrared subwindow[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(4): 2049-2059. DOI:10.1021/acs.jmedchem.8b01682.
- [6] Wu K, Zhao H, Sun Z, et al. Endogenous oxygen generating multifunctional theranostic nanoplateform for enhanced photodynamic-photothermal therapy and multimodal imaging[J]. *Theranostics*, 2019, 9(25): 7697-7713. DOI:10.7150/thno.38565.
- [7] Sun Y, Ding M, Zeng X, et al. Novel bright-emission small-molecule NIR-II fluorophores for in vivo tumor imaging and image-guided surgery[J]. *Chem Sci*, 2017, 8(5): 3489-3493. DOI:10.1039/c7sc00251c.
- [8] Zhu S, Herraiz S, Yue J, et al. 3D NIR-II molecular imaging distinguishes targeted organs with high-performance NIR-II bioconjugates[J]. *Adv Mater*, 2018, 30(13): e1705799. DOI:10.1002/adma.201705799.
- [9] Landsman ML, Kwant G, Mook GA, et al. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green[J]. *J Appl Physiol*, 1976, 40(4): 575-583. DOI: 10.1152/jappl.1976.40.4.575.
- [10] Dip F, LoMenzo E, Sarotto L, et al. Randomized trial of near-infrared incisionless fluorescent cholangiography[J]. *Ann Surg*, 2019, 270(6): 992-999. DOI:10.1097/SLA.0000000000003178.
- [11] 卢鹏,王宏光. 吡啶菁绿荧光引导腹腔镜解剖性肝段切除术[J]. *中华消化外科杂志*, 2020, 19(2): 139-144. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2020.02.006.
- [12] 刘毅,尹新民,廖春红,等. 吡啶菁绿荧光显影技术在肝癌肝切除术中的应用价值[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2019, 25(2):



- 131-135. DOI:10.3760/cma.jissn.1007-8118.2019.02.014.
- [13] Kudo H, Ishizawa T, Tani K, et al. Visualization of subcapsular hepatic malignancy by indocyanine-green fluorescence imaging during laparoscopic hepatectomy[J]. *Surg Endosc*, 2014, 28(8): 2504-2508. DOI: 10.1007/s00464-014-3468-z.
- [14] 刘兵, 迟崇巍, 袁静, 等. 吲哚菁绿近红外荧光显像技术在肝细胞癌肝切除术中的应用价值[J]. *中华消化外科杂志*, 2016, 15(5): 490-495. DOI: 10.3760/cma.jissn.1673-9752. 2016.05.017.
- [15] Altieri MS, Brunt LM. Elimination of bile duct injury in cholecystectomy[J]. *Adv Surg*, 2019, 53: 145-160. DOI: 10.1016/j.yasu.2019.04.018.
- [16] He S, Song J, Qu J, et al. Crucial breakthrough of second near-infrared biological window fluorophores: design and synthesis toward multimodal imaging and theranostics[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(12): 4258-4278. DOI: 10.1039/c8cs00234g.
- [17] Hong G, Antaris AL, Dai H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging[J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1(1): 10. DOI: 10.1038/s41551-016-0010.
- [18] Robinson JT, Hong G, Liang Y, et al. In vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window with long circulating carbon nanotubes capable of ultrahigh tumor uptake[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134(25): 10664-10669. DOI: 10.1021/ja303737a.
- [19] Cheng K, Chen H, Jenkins CH, et al. Synthesis, characterization, and biomedical applications of a targeted dual-modal near-infrared- II fluorescence and photoacoustic imaging nanoprobe[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(12): 12276-12291. DOI: 10.1021/acsnano.7b05966.
- [20] Wan H, Yue J, Zhu S, et al. A bright organic NIR- II nano-fluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1171. DOI: 10.1038/s41467-018-03505-4.
- [21] Antaris AL, Chen H, Cheng K, et al. A small-molecule dye for NIR- II imaging[J]. *Nat Mater*, 2016, 15(2): 235-242. DOI: 10.1038/nmat4476.
- [22] Antaris AL, Chen H, Diao S, et al. A high quantum yield molecule-protein complex fluorophore for near-infrared II imaging[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15269. DOI: 10.1038/ncomms15269.
- [23] Zhu S, Yung BC, Chandra S, et al. Near-infrared- II (NIR- II) Bioimaging via off-peak NIR- I fluorescence emission[J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4141-4151. DOI: 10.7150/thno.27995.
- [24] Starosolski Z, Bhavane R, Ghaghada KB, et al. Indocyanine green fluorescence in second near-infrared (NIR-II) window[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187563. DOI: 10.1371/journal.pone.0187563.
- [25] Hu Z, Fang C, Li B, et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows[J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(3): 259-271. DOI: 10.1038/s41551-019-0494-0.
- [26] Wu D, Xue D, Zhou J, et al. Extrahepatic cholangiography in near-infrared II window with the clinically approved fluorescence agent indocyanine green: a promising imaging technology for intraoperative diagnosis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3636-3651. DOI: 10.7150/thno.41127.
- [27] Ishizawa T, Tamura S, Masuda K, et al. Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green: a biliary road map for safe surgery[J]. *J Am Coll Surg*, 2009, 208(1): e1-4. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2008.09.024.
- [28] Verbeek FP, Schaafsma BE, Tummers QR, et al. Optimization of near-infrared fluorescence cholangiography for open and laparoscopic surgery[J]. *Surg Endosc*, 2014, 28(4): 1076-1082. DOI: 10.1007/s00464-013-3305-9.
- [29] Liu YY, Kong SH, Diana M, et al. Near-infrared cholecystocholangiography with indocyanine green may secure cholecystectomy in difficult clinical situations: proof of the concept in a porcine model[J]. *Surg Endosc*, 2016, 30(9): 4115-4123. DOI: 10.1007/s00464-015-4608-9.
- [30] Liu YY, Liao CH, Diana M, et al. Near-infrared cholecystocholangiography with direct intragallbladder indocyanine green injection: preliminary clinical results[J]. *Surg Endosc*, 2018, 32(3): 1506-1514. DOI: 10.1007/s00464-017-5838-9.
- [31] Dip F, Roy M, Lo Menzo E, et al. Routine use of fluorescent incisionless cholangiography as a new imaging modality during laparoscopic cholecystectomy[J]. *Surg Endosc*, 2015, 29(6): 1621-1626. DOI: 10.1007/s00464-014-3853-7.
- [32] Nairat M, Konar A, Kaniecki M, et al. Investigating the role of human serum albumin protein pocket on the excited state dynamics of indocyanine green using shaped femto-second laser pulses[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2015, 17(8): 5872-5877. DOI: 10.1039/c4cp04984e.
- [33] Desmettre T, Devoisselle JM, Mordon S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography[J]. *Surv Ophthalmol*, 2000, 45(1): 15-27. DOI: 10.1016/s0039-6257(00)00123-5.
- [34] 尹大龙, 张树庚. 吲哚菁绿荧光实时引导技术在肝胆外科中的应用[J]. *肝胆外科杂志*, 2019, 27(4): 246-248. DOI: 10.3969/j.jissn.1006-4761.2019.04.004.
- [35] Zhang RR, Schroeder AB, Grudzinski JJ, et al. Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(6): 347-364. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.212.
- [36] Coubeau L, Frezin J, Dehon R, et al. Indocyanine green fluoroscopy and liver transplantation: a new technique for the intraoperative assessment of bile duct vascularization[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2017, 16(4): 440-442. DOI: 10.1016/S1499-3872(17)60040-7.