

В.В.Соколов¹, В.И.Чиссов¹, Е.В.Филоненко¹, Л.В.Телегина¹, А.Х.Трахтенберг², Г.А.Франк¹, Н.Н.Булгакова²

Флуоресцентная диагностика раннего центрального рака легкого

¹ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена; ² Институт общей физики РАН, Москва

Наиболее перспективным направлением для повышения частоты выявления скрытых форм предрака и раннего рака слизистой оболочки бронхов является метод эндоскопической флуоресцентной диагностики (ФД) [1], чувствительность которого, по данным большинства ученых, существенно превышает возможности других методов.

Метод ФД злокачественных опухолей основан на следующем:

- на различиях в интенсивности и спектральном составе аутофлуоресценции здоровой и опухолевой ткани;
- избирательности накопления фотосенсибилизатора в ткани злокачественного новообразования и возможности его обнаружения по характерной флуоресценции из освещаемой лазерным излучением области.

Механизмы, отвечающие за селективность накопления фотосенсибилизаторов, до конца не выявлены, однако многочисленные исследования в этой области показали, что опухолетропность фотосенсибилизаторов детерминируется специфическими особенностями самой опухолевой ткани: высоким уровнем метаболизма, повышенной проницаемостью сосудов, высоким содержанием макрофагов и рецепторов к липопротеинам низкой плотности, пониженным значением рН и замедленным лимфотоком [2].

Существует 2 метода анализа флуоресценции биологических тканей. 1-й заключается в точечных измерениях спектров флуоресценции при освещении малого объема ткани возбуждающим лазерным излучением при контакте с тканью волоконно-оптического катетера, передающего лазерное излучение и принимающего излучение флуоресценции. Этот метод получил название точечной или локальной спектрофотометрии. 2-й метод состоит в регистрации панорамных флуоресцентных изображений при облучении больших площадей поверхности биологической ткани возбуждающим лазерным излучением. Последний метод составляет основу флуоресцентного эндоскопического исследования.

Первые активные исследования в области ФД рака легкого (РЛ) относятся к середине 1970-х гг. и совпадают с началом клинических испытаний метода фотодинамической терапии (ФДТ) [3]. В последующие десятилетия метод ФД активно развивался как в нашей стране, так и за рубежом, благодаря внедрению в клиническую практику

различных классов фотосенсибилизаторов, совершенствованию волоконной оптики и оптоэлектронной медицинской техники [2, 4].

По мере накопления клинического опыта в области ФД РЛ с предварительным введением таких экзогенных фотосенсибилизаторов, как Фотифрин (США—Канада), Фотогем (Россия), Фотосенс (Россия) и другие, стали очевидны ограничения в их использовании в скрининговых диагностических программах, обусловленные низкой оптической селективностью и замедленным выведением из организма с сохранением кожной фототоксичности в течение 4—8 нед. [3, 5].

По данным клинических исследований, проведенных в МНИОИ им. П.А.Герцена, оптическая селективность накопления фотосенсибилизаторов Фотогем и Фотосенс в опухолях трахеобронхиального дерева при их внутривенном введении в терапевтических дозах колеблется от 1,5 до 4 и в среднем составляет 2—2,5 [6]. Основываясь на 10-летнем клиническом опыте, мы пришли к выводу, что флуоресцентно-диагностическое исследование бронхов с препаратами Фотогем и Фотосенс показано только непосредственно перед сеансом ФДТ ранее диагностированного рака гортани, трахеи и бронхов с целью уточнения границ верифицированной опухоли и для выявления скрытых синхронных, первично множественных очагов рака.

Низкая оптическая селективность накопления в опухолях экзогенных фотосенсибилизаторов стимулировала ученых разных стран к возобновлению исследований по детектированию злокачественных опухолей на основе феномена лазериндуцированной аутофлуоресценции (АФ).

АФ злокачественных опухолей человека в красной области спектра впервые была описана Поликардом в 1924 г. [7]. Ее наличие автор объяснил присутствием в опухолях эндогенных порфиринов. Как показали современные исследования, накопление эндогенных порфиринов в некоторых типах злокачественных опухолей действительно может происходить на поздних стадиях их развития, особенно на стадиях распада и метастазирования [8]. На стадии предрака и раннего рака очаги патологии характеризуются резким падением интенсивности АФ в видимом диапазоне спектра относительно окружающих здоровых тканей [9, 10].

В настоящее время наибольший клинический материал в АФ-диагностике злокачественных

Авторы	Эффект БФС и АФ БФС в выявлении предрака и РЦРЛ					
	Точность		Чувствительность		Специфичность	
	БФС	АФ БФС	БФС	АФ БФС	БФС	АФ БФС
S.Lam et al. (2000) [12]	48,6 %	72,7 %	61,2 %	89,8 %	85,0 %	78,4 %
F.R.Hirsch et al. (2001) [18]			21,9 %	68,8 %	78,3 %	69,6 %
M.Sato et al. (2001)[19]			85,3 %	94,1 %		

опухолей накоплен именно при раннем центральном раке легкого (РЦРЛ) [11–13]. Предрак, включая тяжелую дисплазию, и рак *in situ* (CIS) слизистой оболочки бронхов, как правило, имеют незначительные размеры по плоскости (1–10 мм) и толщине (200–300 мкм). Поэтому возможность их обнаружения при обычной бронхоскопии в белом свете составляет, по данным литературы, около 36 %, т. е. 64 % из них остаются незамеченными. В 1992 г. группа ученых из Канады показала [14–15], что аутофлуоресцентное бронхоскопическое исследование при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 442 нм повышает частоту обнаружения дисплазии и CIS до 86 %. С целью изучения возможностей метода «Xillix Technologies Corp.» (Канада) совместно с фирмой «Olimpus» (Япония) был разработан первый в мире флуоресцентный бронхоскоп LIFE System (Lung Imaging Fluorescence Endoscopy System, в настоящее время не производится). В 1994–1999 гг. в 7 медицинских центрах США и Канады были проведены широкие клинические испытания АФ-бронхоскопии в диагностике раннего РЛ с использованием указанной аппаратуры [12]. При возбуждении флуоресценции излучением He-Cd-лазера (442 нм) установка регистрирует АФ-изображение внутренних слоев стенки бронха в диапазоне 480–800 нм. После компьютерной обработки и нормировки формируется псевдоизображение, являющиеся объектом диагностического анализа. Методика не включает в себя проведения локальных спектрально-флуоресцентных измерений.

По результатам испытаний LIFE System в литературе представлен анализ более 1 000 клинических наблюдений. Результаты показали, что если при обычной бронхоскопии в белом свете детектируется в среднем около 40 % преинвазивного ЦРЛ, то комбинация обычной и АФ-бронхоскопии повышает чувствительность метода в среднем до 80 % [12, 16–19]. Особенно эффективна АФ-бронхоскопия в обнаружении предраковой патологии и ЦРЛ у пациентов, составляющих группу риска (таблица).

В то же время, по данным работы Y.Kusunoki et al. [20], в сравнении с результатами стандартной бронхофиброскопии (БФС) в белом свете, АФ-бронхоскопия не повышает процент выяв-

ления плоскоклеточной метаплазии и дисплазии бронхиального эпителия.

Согласно результатам клиническим исследований, начатых в США в 1990 г., для широкого применения метода ФД весьма перспективными являются препараты, селективно индуцирующие в анаплазированных и раковых клетках синтез эндогенных флуорохромов. К таким препаратам относится 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК), промежуточный продукт синтеза гема, который осуществляется в митохондриях клеток. Избыточное введение в организм (или в ткани отдельных органов) 5-АЛК приводит к ингибированию последнего этапа синтеза гема и накоплению эндогенного флуорохрома — протопорфирина IX (ППИХ) [21]. Известно, что в присутствии избыточной концентрации 5-АЛК опухолевые клетки способны к повышенному, относительно здоровых тканей, накоплению фотоактивного ППИХ. Это объясняется как большей активностью в анаплазированных клетках ферментов начального этапа синтеза гема, так и дефицитом феррохелатазы — фермента, контролирующего конечный этап синтеза, т. е. этап превращения ППИХ в гем. ППИХ накапливается в опухоли в течение нескольких часов после введения 5-АЛК и удерживается в течение 1–2 суток. При возбуждении одной из полос поглощения в синей или зеленой областях спектра ППИХ происходит интенсивная флуоресценция в красной области спектра (630–710 нм). Избыточное накопление ППИХ в очаге малигнизации слизистой оболочки бронха создает флуоресцентный контраст между опухолью и окружающей здоровой тканью. Этот феномен и составляет основу 5-АЛК-индуцированной ФД рака.

1-й клинический опыт применения 5-АЛК-индуцированной флуоресценции протопорфирина IX в диагностике ЦРЛ показал высокую чувствительность этого метода, достигающую 90 и 100 % [22]. В то же время столь высокая чувствительность достигается при низкой специфичности, которая для злокачественных опухолей ряда локализаций не превышает 50 % [23, 24].

Таким образом, 5-АЛК ФД в связи с ее высокой чувствительностью предпочтительно использовать для выявления скрытых, невидимых при бронхоскопии в белом свете очагов, с подозрени-

ем на преинвазивный или микроинвазивный рак бронхов. При этом завершающим этапом обследования остается морфологическое исследование материала, взятого из очагов флуоресценции.

Таким образом, методики ФД рака бронхов, основанные на анализе аутофлуоресцентных или 5-АЛК-индуцированных флуоресцентных изображений, обладают высокой чувствительностью и недостаточной специфичностью. Многие авторы указывают на то, что дополнительное использование локальных спектрально-флуоресцентных измерений во время выполнения флуоресцентной бронхоскопии должно повысить качество диагностики предрака и раннего рака. Однако работ, в которых были бы реализованы оба указанных диагностических подхода при РЛ, крайне мало [25, 30].

В данной работе представлены результаты 5-летних исследований, направленных нами на разработку методики комбинированной бронхоскопии (в белом свете, в режиме АФ, при 5-АЛК-индуцированной флуоресценции) в сочетании с лазер-индуцированной локальной спектродофотометрией.

Пациенты

В МНИОИ им. П.А.Герцена за период с 1984 по 2003 гг. при бронхоскопии в белом свете нами изучены макроскопические формы роста, размеры и локализация 166 очагов РЦРЛ. Значительных различий в частоте поражения правого и левого легкого не выявлено (56,8 % и 43,2 % соответственно). В 84 % случаев РЦРЛ был проявлением первично множественного рака легких и/или других органов. Опухоли локализовались преимущественно в сегментарных (64,6 %) и субсегментарных (17,8 %) бронхах, реже — в долевых (14,5 %) и главных (3,2 %) бронхах. Чаще РЦРЛ поражал слизистую оболочку верхних долей и верхушечных сегментов нижних долей (68,6 %). Преинвазивный ЦРЛ при бронхоскопическом исследовании в белом свете выглядел в виде локального утолщения слизистой оболочки с едва заметной зернистостью поверхности с потерей прозрачности и нечеткой видимостью сосудов и эластических волокон подслизистого слоя. Размер очагов *c-r in situ* колебался от 3 до 10 мм. Для микроинвазивного и малого инвазивного ЦРЛ характерны 3 основных макроскопические формы роста: поверхностная (стелющаяся), узелковая и полиповидная. Все выявленные формы РЦРЛ имели плоскоклеточный тип строения.

Флуоресцентное эндоскопическое исследование бронхов по новой, разработанной нами методике проведено у 28 пациентов (2002—2003 гг.) с предварительным диагнозом: центральный рентгено-позитивный РЛ (6); центральный рентгено-негатив-

ный РЛ (8); подозрение на остаточную опухоль или рецидив рака трахеи или бронха после операции (3); состояние после радикальной хирургической операции по поводу РЛ (3), распространенный стенозирующий центральный РЛ (8). У всех больных проведено бронхоскопическое исследование в белом свете с оценкой ауто- и 5-АЛК-индуцированной АФ в сочетании со спектродофотометрией.

Препарат Аласенс

В настоящее время ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» синтезирована по оригинальной технологии стандартная субстанция 5-АЛК, и на ее основе разработан лекарственный препарат Аласенс. За 2 ч до эндоскопического обследования больным проводили ингаляцию 10%-ного раствора Аласенса (10 мл, 30 мин).

Аппаратура для получения флуоресцентных изображений при бронхоскопии

Флуоресцентные изображения регистрировали в реальном времени в процессе бронхоскопии с использованием гибкого флуоресцентного бронхоскопа *D-Light / AF System* («Karl Storz GmbH», Германия) [26], который позволяет проводить эндоскопическое исследование в белом свете, в свете АФ тканей и в свете 5-АЛК АФ-индуцированной флуоресценции ППХ при возбуждении синим светом (380—460 нм и 380—440 нм соответственно). В качестве источника возбуждения в этой системе используется ксеноновая лампа с набором фильтров.

Аппаратура для получения спектров флуоресценции

Для проведения локальной спектродофотометрии использовали разработанную нами спектрально-флуоресцентную диагностическую установку «Спектр-Кластер» (ООО «Кластер», ИОФ РАН, Москва) [27, 28] (рис. 1). В качестве источников возбуждения флуоресценции в данной работе применяли лазерное излучение с длинами волн 442 нм и 532 нм (для флуоресцентной бронхоскопии с препаратами Фотогем, Фотосенс и Радахлорин в установке «Спектр-Кластер» предусмотрено дополнительное использование лазерных источников с длинами волн генерации в диапазоне 510—633 нм). Спектры флуоресценции слизистой оболочки бронхов регистрировали в диапазоне 450—800 нм.

Для ФД злокачественных опухолей мы работали и применяем рассчитываемый по специальному алгоритму спектрально-флуоресцентный диагностический параметр D_f , который отображается на экране компьютера и позволяет



Рис. 1. Спектрально-флуоресцентная установка «Спектр-Кластер» (ООО «Кластер», Москва)

проводить количественную оценку и верификацию флуоресцентных изображений в реальном времени (патент № 2129273, приоритет от 26.11.97) [29, 30].

Методика локальных спектрально-флуоресцентных исследований во время бронхоскопии состоит в следующем: при обнаружении подозрительных на опухоль участков слизистой оболочки во время бронхоскопии в белом свете или очагов флуоресценции при осмотре в синем свете к указанным участкам бронхов через канал эндоскопа подводится У-образный ринговый волоконно-оптический катетер. При сканировании пятна возбуждающего лазерного излучения вдоль поверхности подозрительного участка в реальном времени проводится отображение на экране компьютера регистрируемых спектров и мониторинг величины диагностического параметра D_f . Очаги флуоресценции с отклонениями от «нормальных» средних значений величины D_f подвергаются биопсии или скарификации для морфологического исследования. Необходимо отметить, что разработанное специализированное программное обеспечение позволяет записывать в один файл неограниченное количество спектров. Реально в рамках 1 эндоскопического исследования записывается порядка 20–30 спектров флуоресценции, при этом запись 1 спектра происходит в течение 1–2 с. Таким образом, проведение спектральных измерений удлинит эндоскопическое обследование, как правило, не более чем на 2–3 мин.

Результаты флуоресцентной бронхоскопии

Аутофлуоресцентная бронхоскопия

При панорамном АФ-бронхоскопическом исследовании малигнизированные участки слизистой оболочки бронхов всегда визуализируются как затемненные участки на фоне яркой зеленой АФ нормальной слизистой оболочки бронха. Всего данным методом были обследованы 12 больных. Выявлены 5 очагов дисплазии и раннего рака бронхов, включая 2 очага, невидимых при стандартной бронхоскопии в белом свете.

На рис. 2 представлены результаты ФБС, АФ ФБС и локальной спектрофотометрии больного рентгеногегативным ранним ЦРЛ. При осмотре в белом свете опухоль не детектировалась. В АФ-изображении опухоль визуализировалась темным пятном, при локальной спектрофотометрии различия в максимальной интенсивности спектров АФ в максимуме излучения на 520 нм составляли от 5 до 20 (рис. 2).

В то же время при АФ бронхоскопии имеют место ложно-положительные результаты. Резкое падение интенсивности аутофлуоресценции регистрируется на месте недавно выполненной щипцовой биопсии, а также в послеоперационном рубце, на месте удаленной злокачественной опухоли (хирургическая операция, ФДТ, лазерная или аргонно-плазменная коагуляция и др.), т. е. после предшествующего лечения.

Спектр аутофлуоресценции биологических тканей в ультрафиолетовом и видимом диапазоне спектра формируется определенными биологическими молекулами (эндогенными флуорохромами), флуоресцирующими на различных длинах волн. В синей области спектра эффективно возбуждаются эластин, флавины, порфирины, НАДН, липиды, липо пигменты, витамины и другие молекулы, флуоресцирующие в диапазоне 450–700 нм [31].

Причины резкого падения интенсивности АФ в зоне малигнизации слизистой оболочки до конца не изучены, однако высказываются предположения, что снижение АФ в зонах предрака и раннего рака может быть обусловлено следующими факторами:

- уменьшением количества флуорохромов и / или изменением их функционального состояния в опухолевой ткани за счет особенностей окислительно-восстановительных процессов;
- изменением оптических свойств опухолевой ткани за счет повышения концентрации молекул, имеющих сильное поглощение в видимой части спектра [13, 14].

В то же время известно, что глубина проникновения в ткани возбуждающего излучения в ультрафиолетовой области спектра составляет по-

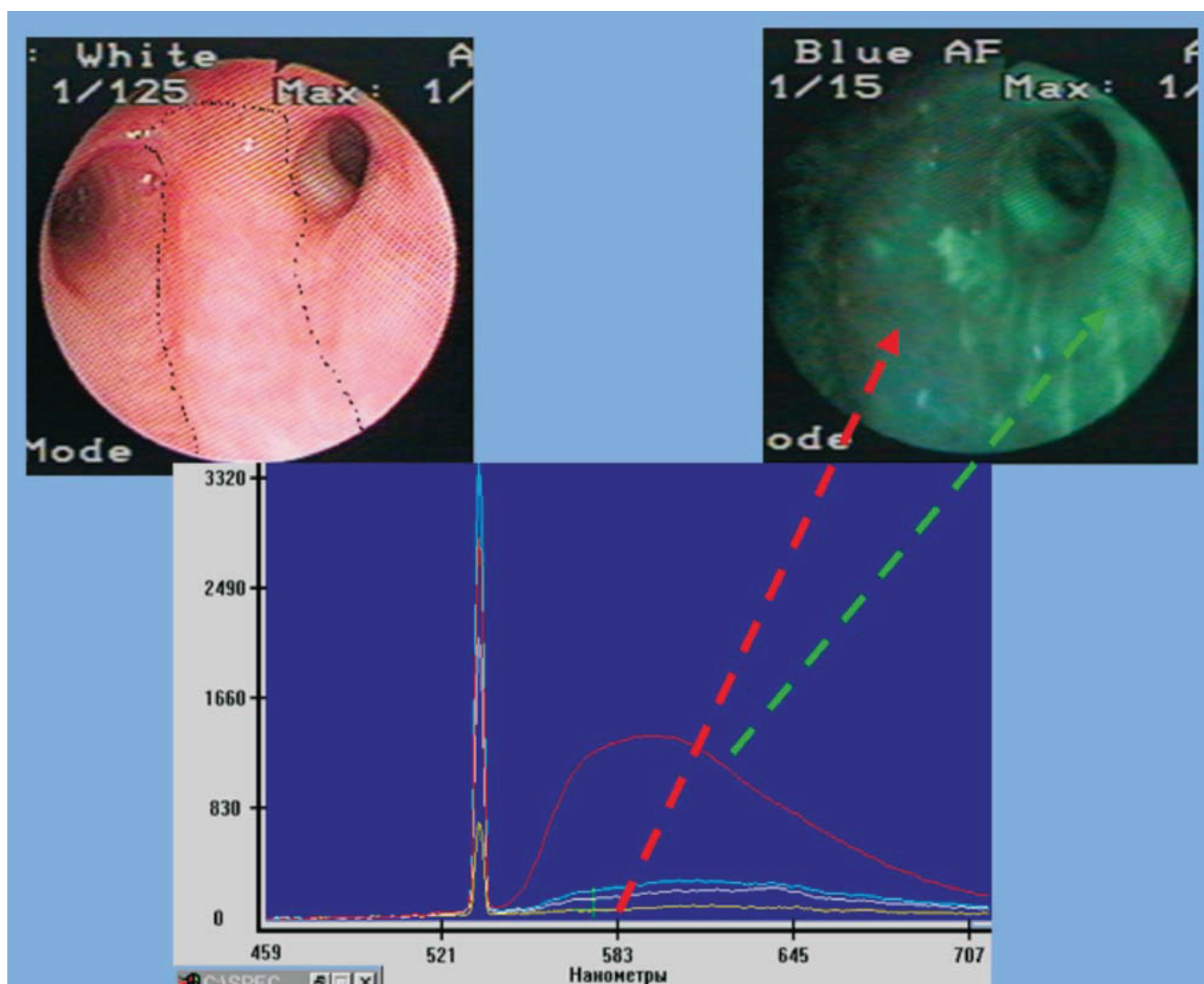


Рис. 2. Аутофлуоресцентная бронхоскопия и локальная спектрофотометрия пациента с диагнозом ранний рентгенонегативный рак легкого (правый в/д бронх)

Слева — изображение бронха в белом свете; справа — изображение бронха в свете аутофлуоресценции при возбуждении в синей области спектра (380–460 нм) («Karl Storz GmbH», Германия). Видна зеленая аутофлуоресценция нормальной слизистой оболочки бронха, в зоне опухоли — затемнение. Внизу представлены спектры аутофлуоресценции нормальной слизистой оболочки бронха и опухоли, измеренные при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 442 нм. Как видно из данных локальной спектрофотометрии, интенсивность аутофлуоресценции в зоне злокачественного поражения в 10 раз ниже, чем в нормальной слизистой бронха.

рядка 1–10 мкм, а при возбуждении в зеленой области — не более 1 мм. Изучение флуоресценции замороженных срезов тканей бронхов показало, что при возбуждении в синей области спектра эпителиальный слой слизистой оболочки бронха флуоресцирует крайне слабо, подслизистый слой флуоресцирует более ярко, в основном за счет своего поверхностного слоя, который флуоресцирует существенно выше, чем нижележащий [32–34].

Основным фактором, определяющим падение интенсивности АФ при раннем раке слизистой оболочки бронхов, по-видимому, является утолщение респираторного эпителия в очагах облигатного предрака и раннего рака. Теоретически показано [32], что при утолщении бронхиального эпителия от 50 мкм до 200 мкм интенсивность АФ, детектируемая *in vivo* с поверхности

слизистой, может снижаться до 2,5 раз. Реально при ранней стадии рака происходит утолщение бронхиального эпителия более чем на 200 мкм, что фактически приводит к «тушению» АФ подслизистого слоя. В результате этого в зоне злокачественной трансформации слизистая оболочка теряет свою прозрачность и визуализируется в АФ-изображении в виде темного пятна неоднородной структуры.

Что касается ложноположительных результатов при АФБ, полученные нами результаты полностью согласуются с результатами других авторов [35]. Понижение уровня АФ, наблюдаемое после предшествующего лечения, по-видимому, обусловлено уменьшением толщины эпителиального покрова и резким изменением оптических свойств подслизистого слоя ткани бронха после травмирующего воздействия.

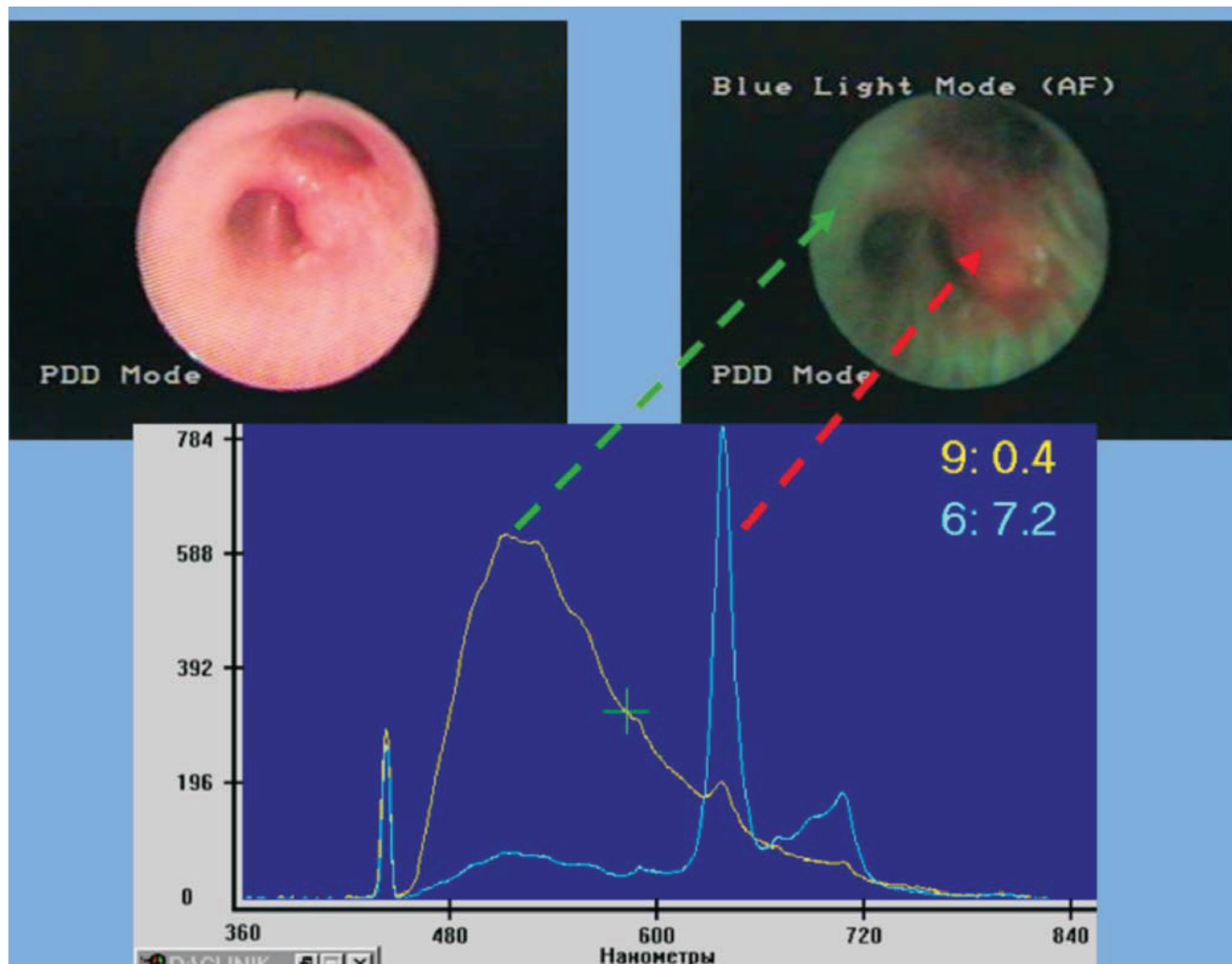


Рис. 3 Флуоресцентная бронхоскопия пациента с ранним рентгенонегативным раком верхней доли правого легкого (В2) через 2 ч после ингаляции с препаратом Аласенс

Слева — изображение бронха в белом свете, справа — флуоресцентное изображение при возбуждении в синей области спектра («Karl Storz GmbH», Германия). Во флуоресцентном изображении видна зеленая аутофлуоресценция нормальной слизистой оболочки бронха, опухоль проявляется по красной флуоресценции эндогенного ППХ. Внизу представлены данные локальной интенсивности аутофлуоресценции с максимумом на 520 нм, величина диагностического параметра $D_f = 0,4$. Спектры флуоресценции злокачественного поражения характеризуются крайне низким уровнем аутофлуоресценции в видимой области спектра и высокой интенсивностью флуоресценции индуцированного ППХ с максимумами на 635 нм и 705 нм. Величина диагностического параметра D_f в опухоли возрастает до 7.2.

Флуоресцентная бронхоскопия после ингаляции 10%-ного раствора Аласенса

Типичное изображение, регистрируемое при флуоресцентной бронхоскопии с препаратом Аласенс (при использовании режимов АФ и 5-АЛК ФД), — умеренная красная флуоресценция опухоли на фоне яркой зеленой АФ, окружающей нормальную слизистую оболочку бронха. В спектрах, измеренных от нормальной слизистой бронха, превалирует АФ с максимумом на 520 нм, для которой характерная величина диагностического параметра D_f составляет 0,4. Индуцированная красная флуоресценция ППХ в спектрах нормальной слизистой бронха практически отсутствует либо выражена незначительно, о чем свидетельствует возрастание величины диагно-

стического параметра D_f до 0,9—1,5. Напротив, в спектрах злокачественных поражений на фоне крайне низкой интенсивности АФ в диапазоне 460—700 нм регистрируется высокая интенсивность флуоресценции индуцированного ППХ в красном диапазоне (630—700 нм). Поскольку параметр D_f интегрирует оба феномена, его величина в зоне малигнизации слизистой оболочки бронха резко возрастает (до 7 и выше). На рис. 3 представлены характерные спектры флуоресценции различных участков слизистой оболочки бронхов, измеренные в ходе эндоскопического обследования.

Флуоресцентная БФС была проведена у 16 больных. В ходе исследований были выявлены 4 очага предрака, раннего и местнораспространенного рака бронхов.

У 3 пациентов проведение флуоресцентной бронхоскопии позволило выявить ранний рентгенонегативный РЛ, не детектируемый при бронхоскопии в белом свете и другими методами диагностики. При флуоресцентной бронхоскопии у таких пациентов визуализировалась зона неоднородного неяркого красного свечения. При мониторинге величины диагностического параметра D_f внутри этой зоны была выявлена значительная неоднородность распределения величины D_f . Так, если в среднем величина D_f в этой зоне была повышена и составляла 1,5–2, то в отдельных «горячих» точках величина D_f была существенно выше и достигала 7 (рис. 4). Биопсия слизистой оболочки и гистологическое исследование подтвердили наличие рака в местах с высоким значением величины D_f .

На рис. 5 представлены результаты флуоресцентной бронхоскопии, в ходе которой был обнаружен ранний рентгенонегативный РЛ. Как видно из данных локальной спектрофотометрии, формы спектров флуоресценции и величины диагностического параметра D_f в опухоли, на ее границе и в здоровой слизистой оболочке бронха имеют яркие

различия. Так, в спектре, измеренном от подозрительного участка, на фоне очень низкой интенсивности АФ четко выражен пик флуоресценции индуцированного ППХ с максимумом на 635 нм. В спектре флуоресценции, измеренном от нормальной слизистой оболочки бронха, четко выражен пик АФ с максимумом на 520 нм, флуоресценция индуцированного ППХ в красной области спектра практически отсутствует. На границе подозрительного участка и здоровой ткани интенсивность АФ так же велика, как и в здоровой ткани, а интенсивность флуоресценции ППХ ниже, чем в спектре, измеренном от подозрительного участка. Величина параметра D_f варьируется от 0,4 — в здоровой слизистой, до 9 — в опухоли, на границе опухоли этот параметр составляет 1,5.

У 1 пациента в ходе флуоресцентной бронхоскопии было обнаружено 4 опухоли легкого. Все опухоли показали очень интенсивную красную флуоресценцию ППХ. Величина диагностического параметра D_f варьировалась в опухолях от 7 до 9, в то время как в нормальной слизистой оболочке (на расстоянии 5 мм от опухолей) она составляла 0,6.

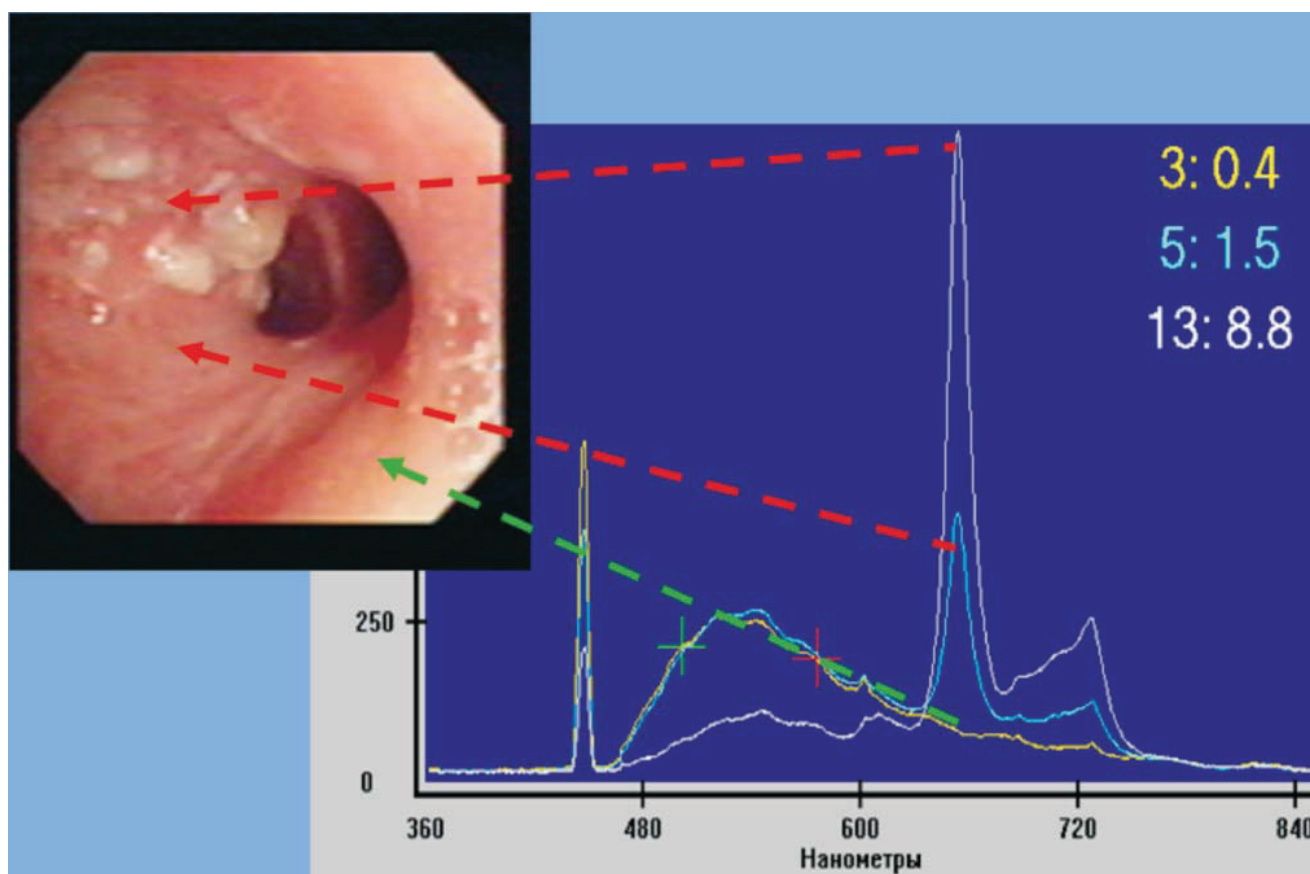


Рис. 4. Бронхоскопия и локальная спектрофотометрия пациента с ранним рентгенонегативным раком верхней доли правого легкого (B2) через 2 ч после ингаляции с препаратом Аласенс

Слева — изображение бронха в белом свете, справа — данные локальной спектрофотометрии. Спектры флуоресценции нормальной слизистой оболочки бронха характеризуются высоким уровнем интенсивности аутофлуоресценции с максимумом на 520 нм, величина диагностического параметра составляет $D_f = 0,4$. Спектры флуоресценции плоскоклеточного рака характеризуются низким уровнем аутофлуоресценции в видимой области спектра и высокой интенсивностью флуоресценции ППХ с максимумами на 635 нм и 705 нм. Величина диагностического параметра D_f в зоне опухоли возрастает до 8,8. В спектрах, измеренных на границе опухоли и нормальной слизистой оболочки, диагностический параметр D_f снижается до 1,5.

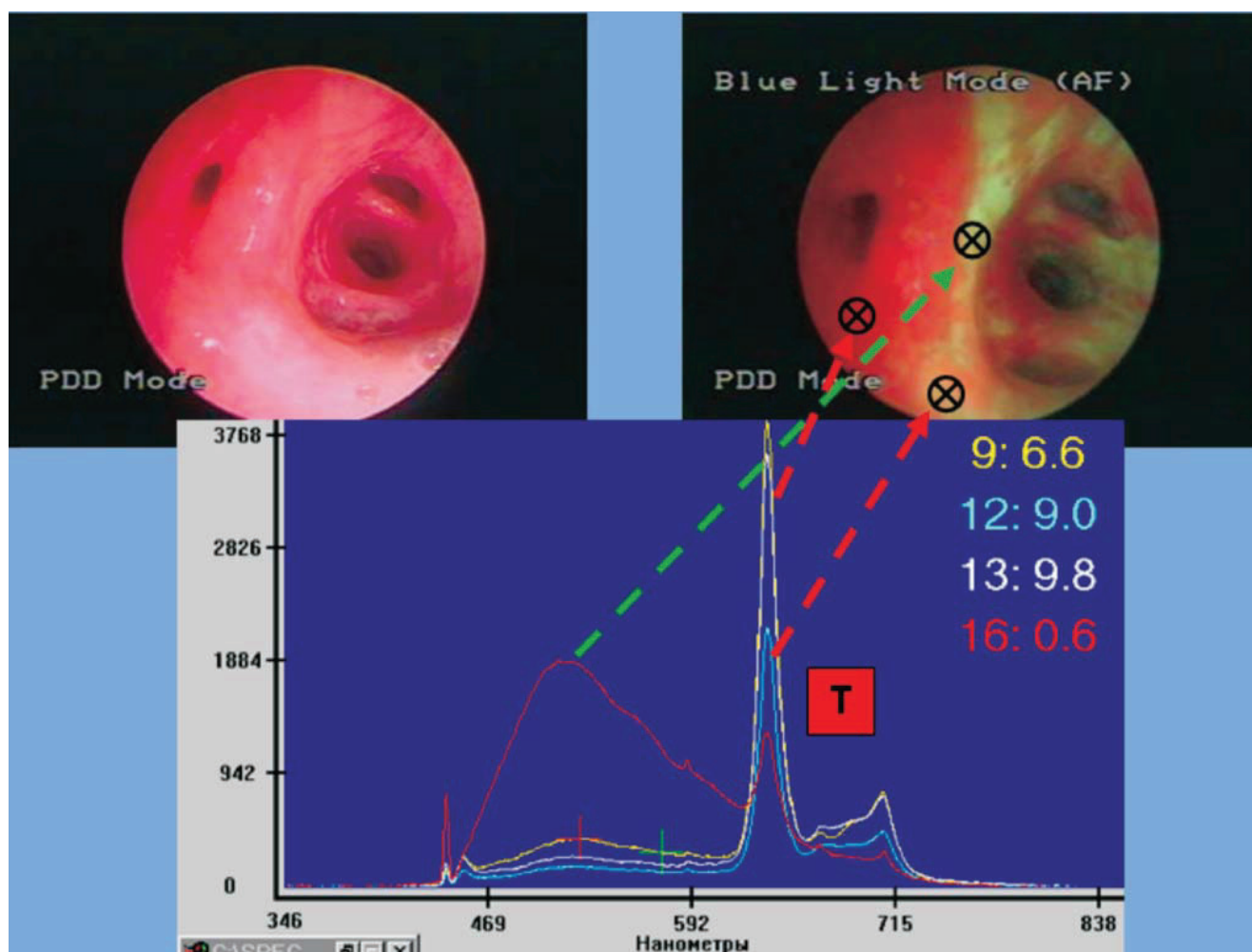


Рис. 5. Флуоресцентная бронхоскопия пациента с первично-множественным раком нижней доли правого легкого (В7, 8,9) через 2 ч после ингаляции с препаратом Аласенс
 Слева — изображение бронха в белом свете, справа — флуоресцентное изображение при возбуждении в синей области спектра («Karl Storz GmbH», Германия). В флуоресцентном изображении видны отдельные сегменты зеленой аутофлуоресценции неповрежденной слизистой оболочки бронха, опухоли проявляются красной флуоресценцией ППХ. Внизу представлены данные локальной спектрофотометрии. Спектры флуоресценции здоровой слизистой оболочки бронха характеризуются высоким уровнем интенсивности аутофлуоресценции с максимумом на 520 нм, величина диагностического параметра на расстоянии 5 мм от опухоли составляет $D_f = 0,6$. Спектры флуоресценции в зоне злокачественного поражения характеризуются крайне низким уровнем аутофлуоресценции и высокой интенсивностью флуоресценции ППХ с максимумами на 635 нм и 705 нм. Величина диагностического параметра D_f в опухолевых поражениях варьируется от 7 до 9.

Особый интерес для нашего исследования представляла оценка возможности флуоресцентного детектирования предраковых очаговых изменений слизистой оболочки бронхов: плоскоклеточной метаплазии, дисплазии разной степени выраженности, не видимых при бронхоскопии в белом свете. Исследования показали, что комплексная флуоресцентная бронхоскопия позволяет выявлять скрытую предраковую патологию слизистой оболочки гортани и бронхов. Во флуоресцентном изображении очаги предраковой патологии, развивающиеся на фоне хронических воспалительных процессов, детектируются по красной флуоресценции ППХ, интенсивность которой колеблется от слабой до умеренной. Величина диагностического параметра D_f при хронических воспалительных процессах в участках метаплазии возрастает, но не достигает значений, характерных для опухолевого процесса. В участ-

ках тяжелой дисплазии, CIS и инвазивного рака величина разработанного нами диагностического параметра D_f достигала максимальных значений и варьировалась от 4 до 21 (в среднем — 7—9), в зависимости от длины волны возбуждающего излучения.

В ходе исследований также были выявлены ложно-положительные результаты. Ложноположительная флуоресценция 5-АЛК-индуцированного ППХ визуализировалась в зоне очагового или диффузного воспаления слизистой оболочки бронха и по линии резекции долевого бронха в течение 3—4 мес. после лобэктомии. Однако, по данным локальной спектрофотометрии, величина диагностического параметра D_f при ложно-положительной флуоресценции не достигала пороговых значений, характерных для опухолевого поражения.

Сопоставление результатов морфологического исследования с данными локальной спектрофо-

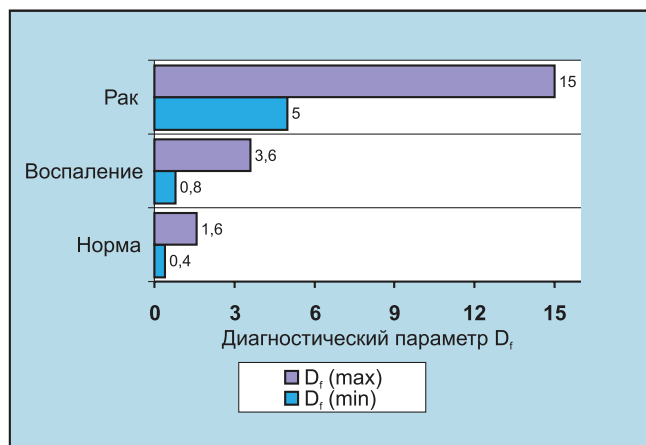


Рис. 6. Зависимость величины диагностического параметра D_f от состояния слизистой оболочки бронха при возбуждении флуоресценции лазерным излучением с длиной волны 442 нм. Представлены данные по результатам 9 ФБС (анализ 287 спектров), проведенных через 2 ч после ингаляции с препаратом Аласенс.

тометрии позволило выявить пороговые значения величины диагностического параметра D_f при различных состояниях слизистой оболочки бронха (рис. 6). Анализ результатов влечет за собой вывод, что проведение в ходе ФБС локальной спектрофотометрии и мониторинг диагностически значимых спектральных параметров, в частности, относительного параметра D_f , позволяет объективизировать данные визуальной оценки, а это способствует повышению надежности прицельной биопсии в зоне флуоресцирующего пятна.

Выводы

Суммируя полученные результаты, необходимо отметить, что комбинация бронхоскопии в белом свете и в режиме АФ показана при обследовании групп риска по РЛ, у лиц с позитивным результатом цитологического исследования мокроты, у больных раком гортани или легкого (для выявления скрытых синхронных очагов предрака и раннего рака бронхов). Однако, по нашему мнению, более перспективным представляется сочетанное использование ауто- и 5-АЛК-индуцированной флуоресценции.

Комплексное использование указанных диагностических методов повышает процент выявления скрытых очагов предрака и раннего рака и позволяет уменьшить количество биопсий. Комбинированный подход, основанный на регистрации флуоресцентного изображения и локальной спектрофотометрии со сканированием в зоне «флуоресцентного пятна», играет важную роль для правильного выбора места биопсии.

Таким образом, полученный клинический опыт позволил нам выделить несколько вариантов использования ФД исследования слизистой оболочки дыхательных путей.

1. Флуоресцентная бронхоскопия и спектрофотометрия с препаратами Фотогем и Фотосенс применяются перед началом сеанса ФДТ для следующих процедур:
 - для мониторинга содержания фотосенсибилизатора в опухоли;
 - определения флуоресцентной контрастности между опухолевыми и окружающими здоровыми тканями;
 - уточнения границ опухоли по плоскости;
 - выявления синхронных скрытых очагов рака гортани и бронхов.
2. Комбинированная бронхоскопия в белом свете, в режимах АФ, 5-АЛК-индуцированной флуоресценции ППХ в сочетании с *in situ* спектрофотометрией должна широко использоваться при обследовании групп повышенного онкологического риска:
 - злостных курильщиков;
 - лиц, работающих с асбестом и радоном;
 - больных хроническим бронхитом, пневмонией, туберкулезом;
 - больных хроническим бронхитом с наличием атипических клеток в мокроте;
 - онкологических больных с диагнозом рак гортани, пищевода, легкого (для выявления скрытых очагов предрака и раннего синхронного рака гортани, трахеи или бронхов);
 - онкологических больных III клинической группы, перенесших радикальное лечение рака гортани, пищевода или легкого (для выявления скрытых очагов предрака и раннего метасинхронного рака гортани, трахеи или бронхов).

Увеличение частоты выявления облигатного предрака и РЦРЛ стимулирует поиск новых щадящих методов лечения, к которым относятся методики эндобронхиальной терапии.

Литература

1. Hirsch F.R., Franklin W.A., Gazdar A.F., Bunn P.A. Jr. Clin. Cancer Res. 2001; 7: 5—22.
2. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W. et al. J. Natl. Cancer Inst. 1998, 90: 889—915.
3. Profio A.E., Doiron D.R., Balchum O.J. Phys. Med. Biol. 1977; 22: 949—957.
4. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. и др. Хирургия 1995; 5: 37.
5. Zharkova N.N., Kozlov D.N., Smirnov V.V. et al. SPIE 1994; 2325 (Photodynamic Therapy of Cancer 11): 400—403.
6. Sokolov V., Chissov V.I., Trakhtenberg A.K. et al. SPIE 1996; 2728: 39.
7. Policard A. C. R. Soc. Biol. 1924; 91: 1423.
8. Stroka R., Baumgartner R., Buser A. et al. SPIE 1991; 1641: 99.
9. Delank W., Khanavkar B., Nakhosteen J.A., Stoll W. Laryngoscope 2000; 110 (3, pt 1): 368.
10. Lam S., MacAulay C., LeRiche J. SPIE 1994; 2324: 2.

11. Häußinger K., Stanzel F., Huber R.M. et al. *Diagnost. Ther. Endoscopy* 1999; 5: 105.
12. Lam S., MacAulay C., le Riche J.C., Palcic B. *Cancer* 2000; 89 (11, suppl.): 2468.
13. MacAulay Qu J., Lam S., Palcic B. *Optic Engineering* 1995; (34): 3334.
14. Hung J., Lam S., LeRiche J. *Lasers Surg. Med.* 1991; 11: 99.
15. Lam S., Hung J.Y., Kennedy S.M. et al. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146 (6): 1458.
16. Kennedy T.C., Lam S., Hirsch F.R. *Oncologist* 2001; 6 (3): 257.
17. Kurie J.M., Lee J.S., Morice R.C. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90 (13): 991.
18. Hirsch F.R., Prindiville S.A., Miller Y.E. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001; 93 (18): 1385—1391.
19. Sato M., Sakurada A., Sagawa M. et al. *Lung Cancer* 2001; 32 (3): 247—253.
20. Kusunoki Y., Imamura F., Uda H. et al. *Chest* 2000; 118 (6): 1776—1782.
21. Ackerman G., Abels C., Baeumer W. et al. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1998; 47: 121.
22. Baumgartner R., Huber R.M., Schulz H. et al. *Photochem. Photobiol.* 1996; 36 (2): 169—174.
23. Stepp H. In: 10-th Congress of the European society for photobiology: Abstract book. Vienna; 2003. 56.
24. Messmann H., Kullmann F., Wild T. et al. *Endoscopy* 1998; 30 (4): 333—338.
25. Boulgakova (Zharkova) N., Sokolov V.V. et al. In: World congress of the International photodynamic association. Miyazaki; 2003. 49.
26. Leonhard M. et al. *Diagn. Ther. Endoscopy* 1999; 5: 71—75.
27. Zharkova N., Kozlov D., Polivanov Yu. et al. *SPIE* 1994; 2328: 196.
28. Чиссов В.И., Соколов В.В., Жаркова Н.Н. и др. В кн.: Материалы Международной конф. и Научно-практической конф. Северо-Западного региона России «Лазерные и информационные технологии в медицине XXI.» СПб.; 2001. 513.
29. Соколов В.В., Жаркова Н.Н., Филоненко Е.В. Пат. РФ 219273 на изобретение «Способ эндоскопической флуоресцентной диагностики злокачественных опухолей полых органов» с приоритетом от 26.11.1997.
30. Соколов В.В., Филоненко Е.В., Телегина Л.В. и др. *Квант. электроника* 2002; 11: 963—969.
31. Bottiroli G., Croce A.C. In: Palumbo G., Pratesi R. eds. *Lasers and current optical techniques in biology. Comprehensive series in photosciences. Vol. 5. London; 2004 (in press).*
32. Lam S., MacAulay C., LeRiche J. *SPIE* 1994; 2324: 2.
33. Bottiroli G., Croce A.C., Locatelli D. et al. *Lasers Surg. Med.* 1995; 16 (1): 48—60.
34. Zonios G., Cothren R., Arendt J. et al. *SPIE* 1994; 2324: 9.
35. Khanavkar B. J. *Bronchol.* 2000; 7 (1): 60—66.

Поступила 06.04.04
© Коллектив авторов, 2005
УДК 616.24-006.6-073