

Г.В. Папаян, Н.Н. Петрищев, S.V. Kim, Н.Н. Kim, В.Б. Березин, Канг Ук

Возможности мультиспектральной аутофлуоресцентной визуализации злокачественных опухолей

ВОЗМОЖНОСТИ МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНОЙ АУТОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Г.В. Папаян^{1,2}, Н.Н. Петрищев^{1,2}, S.V. Kim³, Н.Н. Kim³, В.Б. Березин⁴, Канг Ук⁴¹Центр лазерной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова (ПСПбГМУ), г. Санкт-Петербург²ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», г. Санкт-Петербург³Seoul National University Bundang Hospital (SNUH), Seoul, Korea⁴Korea Electrotechnology Research Institute (KERI), Seoul, Korea

Резюме

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* продемонстрированы возможности мультиспектральной аутофлуоресцентной визуализации злокачественных новообразований. На модели мышинной опухоли ТС-1 показано, что по специфическим особенностям аутофлуоресцентной картины можно однозначно идентифицировать место формирования опухоли уже через двое суток после введения опухолевых клеток. Среди наблюдаемых эффектов новым является необычайно активный процесс ангиогенеза на ранней стадии формирования новообразования, сопровождающийся появлением атипических сосудов извилистой формы со скоростью роста до 3 мм/сут. Показано, что наряду с одноволновым возбуждением, которое традиционно проводится в сине-фиолетовой области спектра, перспективным при аутофлуоресцентной диагностике является двухволновое возбуждение, при котором используют одновременное лазерное возбуждение на длине волны 390 нм и 635 нм. Этот способ возбуждения флуоресценции позволяет детектировать повышенное содержание протопорфирина IX даже на начальной стадии канцерогенеза. Показано, что флуоресценция, обусловленная активным синтезом протопорфирина IX, коррелирует с плотностью расположения сосудов. Возрастание этой флуоресценции наблюдается также при асептическом воспалении, однако она носит диффузный характер, что позволяет отличать ее от локализованной картины флуоресценции в месте формирования опухоли. В эксперименте показана возможность успешного достижения высокого качества изображения при использовании мультиспектральной визуализации, а также оптимизации условий регистрации. На примере исследования операционного материала, полученного в клинических условиях, показаны возможности визуализации и количественной оценки аутофлуоресценции злокачественной ткани. Полученные результаты призваны помочь при разработке эндоскопических методов визуализации и аппаратуры для диагностики опухолей на ранней стадии роста.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, аутофлуоресценция, мультиспектральная видеосистема, злокачественные опухоли.

Введение

В онкологии все чаще применяются методы флуоресцентной диагностики (ФД), среди которых выделяют следующие: 1) аутофлуоресценция (АФ), обусловленная эндогенными флуорофорами – коллагеном, НАДН, флавинами и др.; 2) АЛК-индуцированная флуоресценция, вызванная увеличением синтеза эндогенного фотоактивного протопорфирина IX (ППИХ) за счет введения 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК); 3) экзогенная флуоресценция, вызванная введенными в организм агентами, в том числе, фотосенсибилизаторами [1]. Два последних типа ФД иначе называются фотодинамической диагностикой. Главным недостатком, тормозящим распространение данного вида диагностики, является необходимость проведения клинических исследований применяемых контрастирующих агентов, что требует большой затраты средств и может занять длительный период времени. В отличие от фотодинамической диагностики, проведение АФ диагностики не требует введения в организм лекарственных средств, что позволяет существенно упростить и удеше-

вить диагностическое исследование и делает его более доступным для клинического применения.

Становлению АФ диагностики злокачественных новообразований во многом способствовал метод локальной флуоресцентной спектроскопии при лазерном возбуждении (laser-induced fluorescence, LIF) [2, 3]. В качестве диагностических признаков при проведении данной процедуры используют сдвиг максимума спектра флуоресцентной эмиссии в сторону коротких длин волн и изменение его интенсивности, выражающееся снижением в сине-зеленой области спектра и повышением в красной области, что вызвано возрастанием уровня ППИХ. Для оптимальной регистрации концентрации ППИХ применяется возбуждение в его полосе поглощения с максимумом в районе 635 нм [4]. Ограничения метода локальной флуоресцентной спектроскопии обусловлены невозможностью оценки структурных изменений в очаге патологии и появлением нестабильных результатов вследствие неоднородности флуоресцентной картины.

Этих недостатков лишены методы, основанные на анализе снимков, полученных с помощью системы формирования изображений (imaging systems). Для этого могут использоваться либо флуоресцентные картины [5], либо их комбинация с изображениями, полученными в отраженном возбуждающем свете [6]. Применяют также совмещение методов локальной флуоресцентной спектроскопии и флуоресцентной визуализации [7].

Другой подход основан на использовании мультиспектральной регистрации, при которой изображения формируются одновременно в нескольких (чаще всего трех) полосах флуоресцентной эмиссии. При этом обеспечивается возможность цифровой обработки и количественного анализа изображений, а результаты отображаются на обычном цветном мониторе. Мультиспектральные изображения содержат в себе как спектральную, так и морфологическую информацию, что позволяет расширить возможности исследований [8–12].

Цель данной работы заключается в экспериментальной и клинической оценке возможностей метода мультиспектральной АФ диагностики, используемой для визуализации злокачественных опухолей на ранних стадиях роста.

Материалы и методы

Методика проведения исследования на опухолевой модели

Работа проводилась на мышах-самках линии С57BL/6G (12 животных), которым вводили полученную генно-инженерным способом тканевую опухолевую культуру TC-1 плоскоклеточной карциномы, содержащую онкопротеины E6 и E7 HPV-16 и ДНК последовательность онкогена c-Ha-ras. Опухолевая взвесь в количестве 5×10^5 клеток вводилась под кожу спины животного за 1 пассаж. Перевивка опухолей осуществлялась по общепринятой методике. Через неделю в месте введения взвеси опухолевых клеток пальпировался узел размером 3–4 мм, который через 3–4 недели увеличивался до 7–8 мм. Перевиваемость опухоли составляет 95–100%. Продолжительность жизни мышей после перевивки опухоли составляет 2–3 мес. Контрольным животным под кожу вводили физиологический раствор.

Исследования флуоресценции в патологическом очаге выполнялись как с внешней стороны кожи после предварительной депиляции, так и изнутри – после иссечения лоскута размером 15×15 мм с частичным сохранением кровоснабжения. На каждом из контрольных сроков (через 2, 4, 6, 8, 10, 34 сут. после перевивки) в исследовании участвовали две мыши. Манипуляцию проводили под общим наркозом путем внутрибрюшинного введения 30 мкл кетамина. После окончания съемки животные забивались, опухоль иссекалась и помещалась на предметное стекло для дальнейших исследований.

Методика исследования операционного материала

В качестве операционного клинического материала использовали участок опухолевой ткани, полученный при выполнении лапароскопической проксимальной гастрэктомии по поводу умереннодифференцированной аденокарциномы кардиального отдела желудка. Материал исследовался через 3 ч после его извлечения. Транспортировка в лабораторию осуществлялась в термоконтейнере при температуре 40°C . Перед исследованием фрагменты опухоли промывались физиологическим раствором.

Исследование АФ проводилось на мультиспектральном флуоресцентном органоскопе «AnimaScore» [10]. Регистрация флуоресцентных изображений производилась при помощи высококачественной телевизионно-компьютерной системы с RGB-сенсором и разрешением 1280×1024 пикселей при различном возбуждении. Размер поля зрения в плоскости объекта – 25×20 мм. Источником излучения являлся комбинированный лампово-лазерный осветитель, в котором длина волны лампового излучения определялась переключаемыми фильтрами 360 нм, 390 нм, 430 нм; лазерного излучения – диодным лазером 635 нм. Регистрация результатов осуществлялась в виде мультиспектральных фото- и видеоизображений. Измерения сигналов r, g и b и их отношений r/b, r/g, b/g в спектральных каналах R, G и B мультиспектральной системы с максимумами спектральной чувствительности соответственно 620 нм, 540 нм и 480 нм проводилась в локальных участках и в целом кадре в реальном масштабе времени. Перед измерениями прибор калибровался по флуоресцентным стандартам.

Результаты

Исследование опухолевого роста на мышинной модели

Ниже представлены репрезентативные результаты проведенных экспериментов в выбранные сроки роста мышинной опухоли для 3 из 12 животных.

На рис. 1 показаны фрагменты фотографий дермы мыши, полученных изнутри лоскута, а также с внешней поверхности кожного покрова до формирования лоскута в режимах регистрации 360 нм и $390+635$ нм. Размеры представленных участков $8,8 \times 8,8$ мм. Съемки производили на разные сроки роста опухоли (через 2, 6 и 10 сут. после инъекции под кожу культуры клеток TC-1), а также в контрольном эксперименте (через 2 сут. после инъекции под кожу физиологического раствора).

В контроле (рис. 1а) в режиме 360 нм в месте введения физиологического раствора с внутренней стороны кожи имеется небольшое воспаление (темные участки в зоне 1), а в режиме $390+635$ нм в них наблюдается повышение красной флуоресценции (зона 2). При этом отчетливо видна неиз-

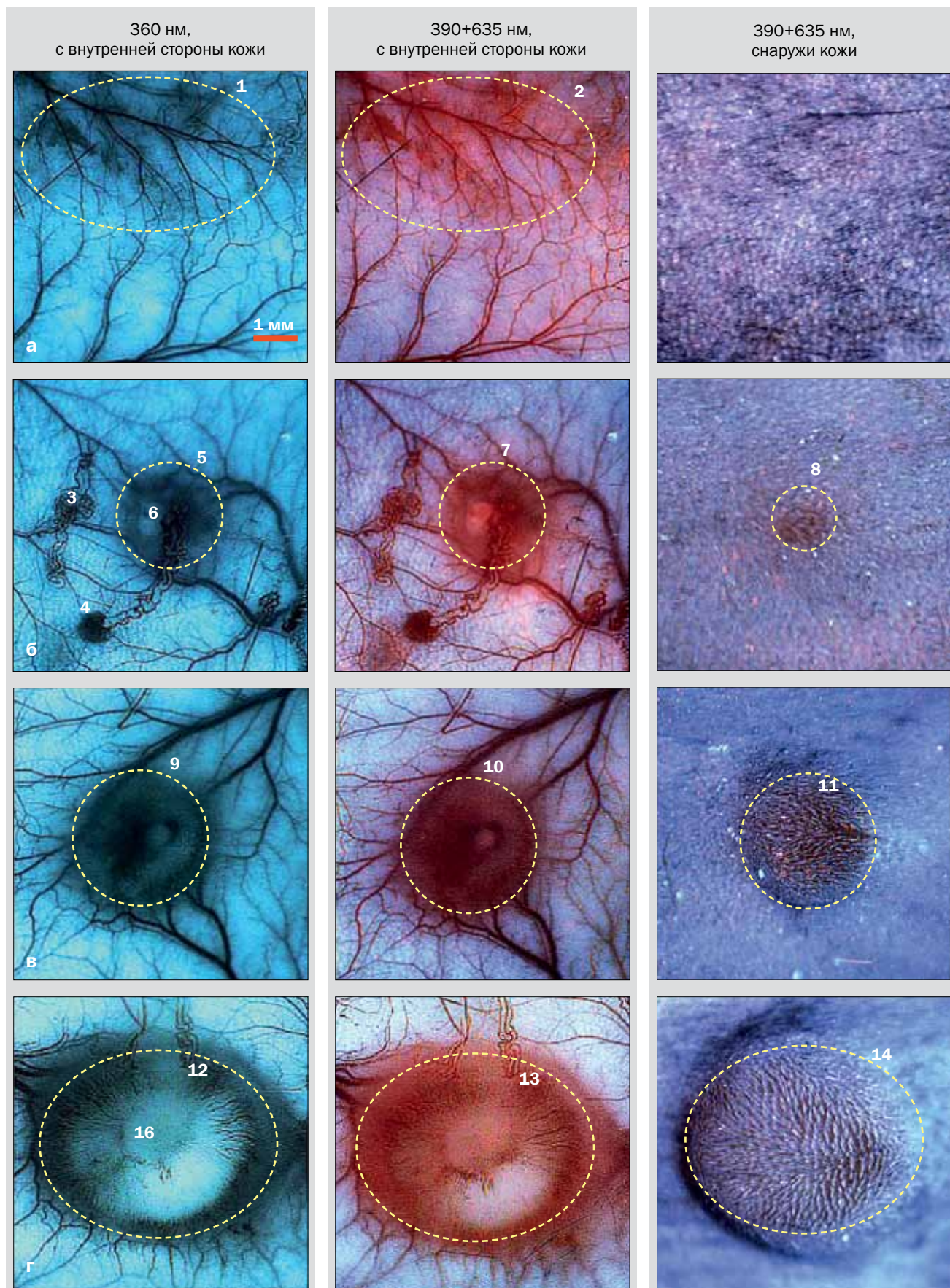


Рис. 1. Изменение мультиспектральной картины кожи в свете АФ изнутри и снаружи кожи в режимах 360 нм и 390+635 нм по мере роста опухоли, в разные сроки после перевивки клеток
 а – контроль, через 2 сут. после инъекции физраствора; б – опыт, через 2 сут. после инъекции ТС-1;
 в – опыт, через 6 сут. после инъекции ТС-1; г – опыт, через 10 сут. после инъекции ТС-1

мененная сосудистая сеть обычной древовидной формы. Снаружи кожи место инъекции в режиме 390+635 нм никак себя не проявляет.

Через 2 сут. после введения опухолевых клеток (рис. 1б) сосудистый рисунок существенно изменяется. Вблизи места инъекции наблюдаются сосуды аномально извилистой формы (зигзагообразные сосуды (3) или капиллярная сеть в виде клубочков и гнезд (4)); ткань выглядит более темной (зона 5), а там, где находится остаток введенной клеточной культуры ТС-1, наоборот – более светлой (зона 6)). В режиме 390+635 нм фокус опухоли обладает повышенной красной флуоресценцией (зона 7). Красная флуоресценция наблюдается даже через толщу кожи (зона 8). Судя по участку затемнения, рост опухоли через двое сут. после перевивки распространяется на площади диаметром около 3 мм.

По мере роста (6-ые сутки – рис. 1в, 10-ые сутки – рис. 1г) в режиме 390+635 нм наблюдается нарастание красной компоненты, в результате чего опухоль все более отчетливо обнаруживается не только с внутренней стороны кожи (участки 10, 13), но и снаружи ее (участки 11, 14). Что касается режима 360 нм, то выявляемые в данном режиме особенности в процессе опухолевого роста претерпевают некоторые изменения: сосуды извилистой формы на 6-ые и 10-ые сутки наблюдаются реже, а в участках затемнения (9, 12) все отчетливее просматриваются светлые зоны (15, 16).

На рис. 2 представлены изображения двух удаленных опухолей (мышы №9 и №10) через 10 сут. после введения клеток ТС-1 при длинах волн возбуждения 360 нм и 390+635 нм. Эти съемки подтверждают приведенные выше закономерности. Собственная флуоресценция на поверхности опухоли (№9) в синие-зеленой области имеет участки как повышенной яркости, так и сильно затемненные. Это особенно отчетливо видно при возбуждении 360 нм. В режиме 390+635 нм к этому излучению добавляется интенсивное крас-

ное свечение всей поверхности опухоли. В отличие от флуоресцентной картины со стороны поверхности, на срезе опухоли (№10) регистрируется только синие-зеленая компонента, а красная практически полностью отсутствует.

Описанные особенности АФ злокачественной опухоли, уменьшение яркости в синие-зеленой области и увеличение красной компоненты, служащие признаками перерождения ткани при АФ диагностике, выявлялись в данном случае только при исследовании ее поверхности. Если проводить исследование опухоли глубже, эти признаки пропадают и, наоборот, в ее глубине наблюдается высокая синие-зеленая флуоресценция и практически полностью отсутствует красная флуоресценция.

Интерес представляет ответ на вопрос – насколько картина, полученная в модельном эксперименте, может соответствовать реальным опухолям человека. В качестве примера приведем результат исследования операционного материала.

Пример исследования операционного материала

Аденокарцинома желудка: локализация опухоли – верхняя треть желудка, малая кривизна; гистологический тип – тубулярная аденокарцинома; гистологическая градация – мало дифференцированная; гистологический тип по Лоурену – кишечный; размер опухоли – 2,5x2,5x0,9 см; глубина инвазии – субсерозная оболочка (pT3 by AJCC 7thEd); края опухоли по Мингу – инфильтративные; стромальная реакция – десмоплазия.

На рис. 3 показаны фотографии операционного материала со стороны слизистой оболочки при различных условиях регистрации. Участок (1) – место взятия биопсии при эндоскопическом осмотре, на основании которой поставлен диагноз. Фокус новообразования (2), имеющий вид кратера размером около 1,5 см, обладает существенно более низкой флуоресценцией по сравнению с окружающей



Рис. 2. АФ изображения опухолей, удаленных у мышей №9 и №10 через 10 сут. после перевивки ТС-1 при длинах волн возбуждения 360 нм и 390+635 нм. Размер опухолей: № 9 – 4x6 мм, а № 10 – около 6 мм. Опухоль №10 показана целой и в разрезе

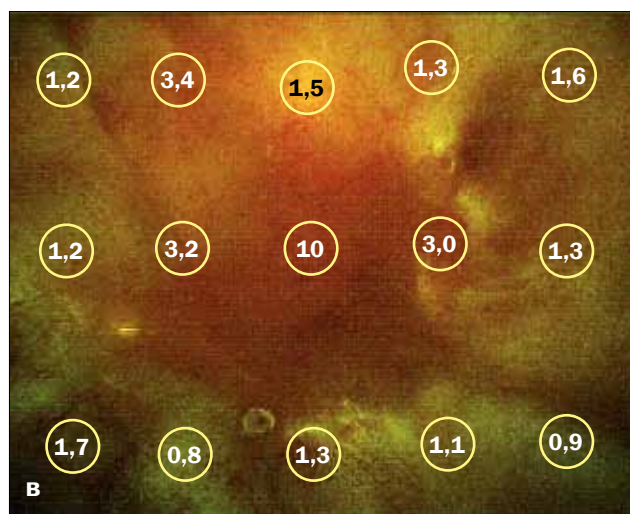
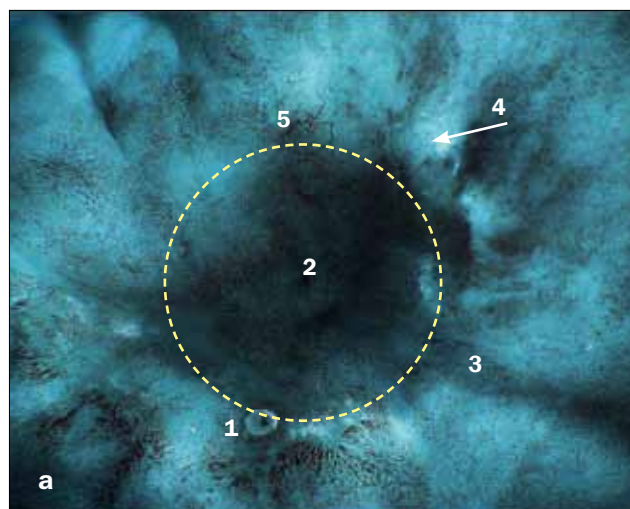


Рис. 3. АФ изображения операционного материала аденокарциномы желудка со стороны слизистой оболочки размером 25х20 мм при различных условиях регистрации. Кружками обозначены места количественной оценки флуоресценции. Внутри кружков указана величина r/b
 а – 360 нм;
 б – 430 нм;
 в – 390+635 нм

тканью. Затемнение наблюдается также в складках слизистой оболочки (3). Вокруг фокуса наблюдаются локальные просветления (4). В стороне от фокуса на расстоянии 2 см находится граница атипичной ткани. Тонкие морфологические отличия, позволяющие легче увидеть эту границу, получаются в режиме 430 нм (рис. 3б). Наибольший цветовой контраст, облегчающий обнаружение самой опухоли обеспечивает режим 390+635 нм (рис. 3в). Это можно делать как визуально, так и с использованием количественных характеристик. При мультиспектральной регистрации наиболее информативным параметром является отношение сигналов из различных каналов. Для режима 390+635 нм им служит отношение r/b : оно в максимальной степени отражает различия опухолевого участка от окружающей здоровой ткани, поскольку в процессе злокачественного роста в двухволновом режиме красная флуоресценция возрастает, а синяя падает.

Результаты измерений r/b , выполненные в трех различных зонах операционного материала (нормальная слизистая оболочки желудка, область гипертрофического гастрита, область опухоли), показаны на рис. 4. Схема измерений, обеспечивающая возможность получения данных в различных точках указанных зон, показана на рис. 3в. Видно, что величина r/b существенным образом зависит от места измерения: наибольшее ее значение в зоне опухоли получено в фокусе, а на ее периферии – приближается к нормальным значениям.

Таким образом, на примере исследования операционного материала в случае аденокарциномы желудка подтверждаются основные закономерности, полученные в эксперименте. Кроме явлений, связанных с модуляцией яркости флуоресценции в зоне опухолевого роста, со стороны слизистой оболочки в свете аутофлуоресценции обнаруживаются морфологические изменения, не видимые или слабо заметные при обычном наблюдении.

Обсуждение

Необходимый контраст при АФ диагностике достигается за счет двух эффектов. Первый из них заключается в снижении флуоресценции в синезеленой области спектра (450–550 нм) при возбуждении коротковолновым излучением (350–450 нм). Второй – в повышении красной флуоресценции (650–750 нм), вызванной накоплением ППХ. Флуоресценция может возбуждаться в различных полосах поглощения порфиринов, из которых самая длинноволновая имеет максимум на длине волны 635 нм. Полезная для диагностики информация может также содержаться в измененной морфологической картине, которая в свете АФ заметно отличается от таковой в белом свете. Ниже рассматривается, как эти аспекты проявились в данном исследовании.

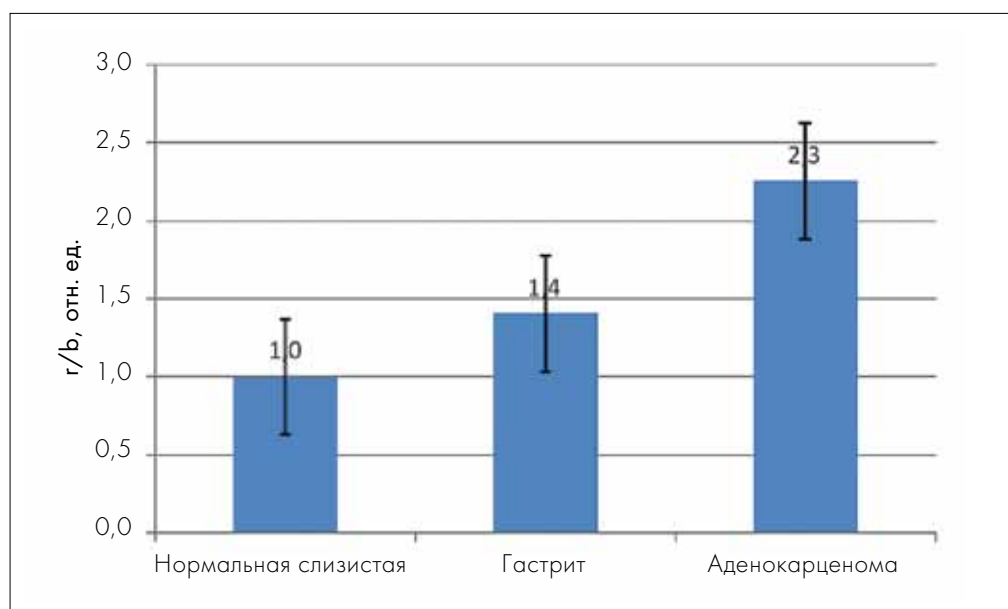


Рис. 4. Оценка спектральных различий в режиме 390+635 нм с помощью отношения сигналов r/b. Измерения проводились в различных зонах операционного материала по схеме, показанной на рис. 3в

Эффект повышения красной флуоресценции

Повышение красной АФ, связанной с увеличением содержания порфиринов в опухоли, было впервые описано Альбертом Поликарпом в 1924 г. [13]. С того времени эффект преимущественного накопления порфиринов в неопластической ткани описывали многие исследователи. Сейчас можно считать доказанным, что он вызван повышенным синтезом эндогенного ППХ в зоне злокачественного роста. Наиболее широко этот факт используется в клинике для визуализации глиальных опухолей при операциях на головном мозге [14] и в диагностике поверхностного рака мочевого пузыря [15]. При этом для усиления синтеза эндогенного ППХ используют метод 5-АЛК-индуцированной флуоресценции.

Существует также метод диагностики, который позволяет обойтись без ввода 5-АЛК («non-ALA method») [10, 11, 16]. Он предполагает одновременное возбуждение флуоресценции двумя различными длинами волн. Одна из них (красная) предназначена для преимущественного возбуждения порфиринов, а другая (фиолетовая) – для формирования обычной АФ картины. Их сочетание позволяет визуализировать слабую порфириновую флуоресценцию на фоне обычной АФ изображения, связать ее наличие с определенными морфологическими структурами и ввести информативную количественную характеристику – отношение спектральных сигналов r/b или r/g. В данном исследовании этот метод реализован в режиме 390+635 нм.

В контрольном эксперименте при введении под кожу физиологического раствора в режиме 390+635 нм наблюдался рост порфириновой флуоресценции. Диффузный характер ее распределения заметно

отличался от такового в месте перевивки опухоли, который имеет четкую локализацию. При этом повышение красной флуоресценции наблюдалось также и вокруг близлежащих к опухоли атипических сосудов. Таким образом, повышенный синтез порфирина имеет место как при активной тканевой пролиферации клеток опухоли в зоне асептического воспаления. Флуоресцентное покраснение снаружи наблюдается с некоторым запозданием относительно внутренней стороны, что объясняется ослаблением в коже возбуждающего излучения и потерями света флуоресценции. Тем не менее, несмотря на низкую прозрачность кожи, после депиляции красное возбуждающее излучение проникает через нее на глубину, достаточную для надежной визуализации места расположения подкожной опухоли на 4–6-е сутки после перевивки. С внутренней стороны кожи это можно сделать уже через двое суток. Таким образом, в эксперименте на мышинной модели канцерогенеза двухволновой режим способствовал обнаружению опухоли на ранней стадии ее роста. При перенесении полученных данных в клинику нужно иметь в виду, что интенсивность синтеза ППХ зависит от «агрессивности» и стадии развития злокачественной опухоли. Это наблюдение согласуется с результатами исследования опухолей головного мозга, в котором показано, что концентрация ППХ пропорциональна пролиферативному индексу Ki-67 [17].

Эффект снижения сине-зеленой аутофлуоресценции

Феномен снижения интенсивности собственного свечения малигнизированной ткани в сине-зеленой области спектра, по-видимому, впервые количе-

ственно описан в 1982 г. [18]. В указанной работе проводилось измерение АФ сигналов, обусловленных пиридиннуклеотидами (НАДН) и флавопротеидами (ФП) в опухолях желудка, прямой кишки, тела и шейки матки. Исследования показали, что сигналы от малигнизированной ткани значительно слабее, чем для здоровой ткани: для НАДН в 2–4,8 раза, а для ФП – в 1,7–4,6 раза. Наличие эффекта снижения яркости АФ было подтверждено в аналогичных исследованиях, выполненных методом локальной флуоресцентной спектроскопии [19, 20].

Позже для визуализации очага патологии на основании этого эффекта стали применять изображающие системы [21], что послужило основой для выпуска ряда аутофлуоресцентных эндоскопических систем. При этом для облегчения визуализации области потемнения используется ее искусственное окрашивание в красный цвет, что создает впечатление наличия порфириновой флуоресценции.

Причину падения интенсивности АФ в очаге патологии объясняют утолщением эпителиального слоя, уменьшающим глубину проникновения света [22]. Однако считается, что данный фактор не способен обеспечить наблюдаемую высокую контрастность в свете флуоресценции, поскольку «рассматривать ткань через поверхность слизистой оболочки – это на самом деле видеть строму сквозь прозрачный слой поверхностного эпителия» [23]. С нашей точки зрения явление потемнения скорее объясняется поглощением расположенных на поверхности опухоли в ее строме новообразованных сосудов с повышенным кровенаполнением, что приводит к экранированию флуоресцентного свечения за счет поглощения гемоглобина. Наиболее отчетливо это наблюдается на выделенной опухоли при сравнении картин, полученных с ее поверхности и с разреза (рис. 2). Сопоставление показывает, что высокая яркость наиболее светлых участков поверхности соответствует яркости паренхимы опухоли и наоборот, слабо флуоресцирующие участки поверхности оказываются расположенными в местах сосудистой сети.

Факт высокой яркости АФ в месте среза известен давно. В работе [24] было показано, что интенсивность АФ инфильтративных опухолей желудка значительно сильнее на срезе, чем со стороны слизистой оболочки в очаге патологии, причем она была в несколько раз меньше, даже по сравнению со здоровыми тканями. Этот факт, по-видимому, объясняется увеличением доли соединительной ткани в строме и ухудшением кровоснабжения в глубине опухоли. Следовательно, в наблюдаемых нами картинах в свете флуоресценции со стороны поверхности слизистой именно изменение кровоснабжения является основной причиной модуляции ее яркости. Причем в местах снижения флуоресценции в синезеленой области, наоборот, наблюдается повышение красной компоненты.

Изменение морфологической картины

Прежде всего, среди морфологических изменений обращает на себя внимание процесс формирования новых кровеносных сосудов. Сосудистый рисунок лучше всего визуализируется в режиме 360 нм [12]. Интересно, что заметные изменения наблюдаются уже через двое суток после перевивки опухоли ТС-1. Все необычные по форме сосуды расположены в непосредственной близости от центра опухоли. Возможно, что стремительный рост извилистых сосудов, о которых здесь идет речь, вызван не появлением новых сосудов, а увеличением в диаметре существующих. Природу и закономерности данного феномена предстоит исследовать в дальнейшем.

К особенностям морфологической картины также следует отнести неоднородность яркости флуоресценции на поверхности опухоли, вызванной, предположительно, вариацией локальной плотности капиллярной сети. В результате на фоне темных участков наблюдаются яркие лакуны, которые также могут служить признаком наличия злокачественной опухоли.

Операционный материал

Описанные выше закономерности – повышение красной компоненты и снижение синезеленой АФ в очаге патологии – отчетливо наблюдаются в двухволновом режиме и также при изучении операционного материала. При этом обращает на себя внимание гетерогенный характер распределения флуоресценции в пределах опухоли, где темный кратер в ее центре обрамлен яркими желто-зелеными пятнами на периферии. При этом из-за различного проявления эффектов покраснения и потемнения недалеко друг от друга могут находиться участки различного цвета, что объясняет сложности, с которыми метод локальной флуоресцентной спектроскопии сталкивается при клиническом применении.

Новым в наблюдаемой морфологической картине операционного материала в зоне опухолевого роста является смена хаотичного рисунка вблизи фокуса на регулярные структуры в области нормальной слизистой оболочки. Этот признак, наряду с особенностями сосудистого рисунка и наличием яркого венчика вокруг темного ядра опухоли, можно использовать для идентификации опухоли и определения границ ее распространения.

Количественный анализ (рис. 4) показывает, что красно-синее отношение, полученное в режиме смешанного освещения, может служить количественной характеристикой опухоли. Ее преимуществами являются высокая чувствительность к злокачественному процессу благодаря противоположной направленности красной и синезеленой компоненты, а также слабая зависимость от геометрии освещения и от расстояния до объекта. Учитывая гетерогенный характер картины, этим инструментом нужно пользоваться с осторожностью, используя при измерении оценку,

преимущественно вблизи центра опухоли, что при наличии мультиспектрального АФ изображения делать несложно.

Выводы

Мультиспектральная АФ визуализация является методом диагностики, не требующим применения экзогенных агентов для оптического контрастирования. При этом для анализа предоставляется информация одновременно спектрального и морфологического характера.

Проведенные исследования роста мышинной опухоли ТС-1 показывают, что по специфическим особенностям АФ картины можно однозначно идентифицировать место формирования опухоли уже через двое суток после введения опухолевых клеток. Среди наблюдаемых эффектов новым является необычайно активный процесс ангиогенеза на ранней стадии формирования новообразования. Он сопровождается появлением атипических сосудов извилистой формы со скоростью роста до 3 мм/сут.

Показано, что наряду с одноволновым возбуждением, которое традиционно проводится в сине-фиолетовой области спектра, перспективным при АФ диагностике является двухволновое возбуждение, при котором, одновременно с возбуждением в указанной области, используется лазерное возбуждение с длиной волны 635 нм. Этот способ освещения позволяет привлечь для визуального и количественного анализа ППХ без использования препаратов, содержащих 5-АЛК. В этом случае на фоне характерной для собственной флуоресценции сине-зеленой картины,

хорошо просматривается красная компонента, обусловленная наличием ППХ даже на начальной стадии канцерогенеза. Ее присутствие особенно заметно благодаря наличию в зоне опухолевого роста затемненных участков.

Сравнительный анализ флуоресцентных картин с поверхности опухоли и в ее разрезе показывает, что известный эффект падения яркости АФ в очаге патологии объясняется не столько метаболическими особенностями опухолевых клеток, сколько усилением кровоснабжения опухоли за счет повышения плотности приповерхностной сосудистой сети.

С густотой расположения сосудов коррелирует также флуоресценция, обусловленная активным синтезом ППХ. Возрастание этой флуоресценции наблюдается также при асептическом воспалении, однако, она носит диффузный характер, что позволяет отличать ее от локализованной картины в месте формирования опухоли.

Для использования морфологической информации, содержащейся в изображении, важно его высокое качество. Добиться этого при регистрации АФ картины, учитывая дефицит света, непросто, однако, как показывает опыт, при использовании мультиспектральной визуализации, а также оптимизации условий регистрации эта задача успешно решается.

На примере исследования полученного в клинических условиях операционного материала показаны возможности визуализации и количественной оценки АФ злокачественной ткани. Полученные результаты могут служить основой при разработке эндоскопических методик и аппаратуры для АФ диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pierce M.C., Javier D.J., Richards-Kortum R. Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer // *Int. J. Cancer*. – 2008. – №1. – 123(9). – P. 1979–1990.
2. Дадвани С.А., Харнас С.С., Чилингарида К.Е., Лощенов В.Б., Ветшев С.П. Лазерная аутофлуоресцентная спектроскопия – новый метод экспресс-диагностики в хирургии (Обзор) // *Хирургия*. – 1999. – №10. – С. 75–79.
3. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 1996. – 47 (1). – P. 555–606.
4. Лощенов В.Б., Стратонников А.А., Волкова А.И., Прохоров А.М. Портативная спектроскопическая система для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией // *Российский химический журнал*. – 1998. – №2. – XLII. – С. 50.
5. Palcic, B., Lam S., Hung J., MacAulay C. Detection and localization of early lung cancer by imaging techniques // *Chest*. – 1991. – 99 (3). – P. 742–743.
6. Папаян Г.В., Канг Ук. флуоресцентная эндоскопическая видеосистема // *Оптический журнал*. – 2006. – №10. – С. 94–99.
7. В.В. Соколов, Е.В. Филоненко, Л.В. Телегина, Н.Н. Булгакова, В.В. Смирнов. Комбинация флуоресцентного изображения и локальной спектрофотометрии при флуоресцентной диагно-

REFERENCES

1. Pierce M.C., Javier D.J., Richards-Kortum R. Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer, *Int. J. Cancer*, 2008, № 123 (9), pp. 1979-90.
2. Dadvani S.A., Kharnas S.S., Chilingaridi K.E., Loshchenov V.B., Vetshev S.P. Lazernaya autofluorescentnaya spektroskopiya – novyi metod ekspress-diagnostiki v khirurgii (obzor) (Laser autofluorescence spectroscopy – a new method of instant diagnosis in surgery (Review)), *Khirurgiya*, 1999, № 10, pp. 75–79.
3. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis, *Annual Review of Physical Chemistry*, 1996, № 47(1), pp. 555–606.
4. Loshchenov V.B., Stratonnikov A.A., Volkova A.I., Prokhorov A.M. Portativnaya spektroskopicheskaya sistema dlya flyuorescentnoi diagnostiki opukholei i kontrolya za fotodinamicheskoi terapii (Hand-carried spectroscopic system for fluorescence diagnosis of tumors and monitoring the photodynamic therapy), *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 1998, № 2, XLII, p. 50.
5. Palcic, B., Lam S., Hung J., MacAulay C. Detection and localization of early lung cancer by imaging techniques, *Chest*, 1991, № 99 (3), pp. 742–3.
6. Papayan G.V., Kang Uk. Flyuorescentnaya endoskopicheskaya videosistema (Fluorescence endoscopic video system), *Opticheskii zhurnal*, 2006, №. 10, pp. 94–9.
7. Sokolov V.V., Filonenko E.V., Telegina L.V., Bulgakova N.N., Smirnov V.V. Kombinatsiya flyuorescentnogo izobrazheniya i lokal'noi

- стике раннего рака гортани и бронхов // Квант. Электроника. – 2002. – 32 (11). – С. 963–969.
8. Benavides, J. M., Chang S., Park S. et al. Multispectral digital colposcope for in vivo detection of cervical cancer // *Optics Express*. – 2003. – 11. – P. 1223–36.
 9. Канг Ук, Папаян Г.В., Бэ С.Д. и др. Флуоресцентный видеодерматоскоп // *Оптический журнал*. – 2008. – №1. – С. 32–38.
 10. Канг Ук, Папаян Г.В., Березин В.Б., Бае Соо-Жин, Ким С.В., Петрищев Н.Н. Мультиспектральный флуоресцентный органоскоп – прибор для прижизненных исследований лабораторных животных и их органов // *Оптический журнал*. – 2011. – №9. – С. 82–90.
 11. Папаян Г.В., Петрищев Н.Н., Панченко А.В., Канг Ук, Ким С.В., Березин В. Б. Мультиспектральная аутофлуоресцентная диагностика рака шейки матки на экспериментальных моделях // *Сборник научных трудов под ред. Н.Н.Петрищева*. – СПб.: Лань, 2011. – С. 273–281.
 12. Петрищев Н.Н., Ким С.В., Березин В. Б., Папаян Г.В. Аутофлуоресцентная визуализация сосудов микроциркуляторного русла // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2010. – №4. – С.75–77.
 13. Policard. A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Woods C. R. // *Soc. BioL.* – 1924. – 91. – P. 1423–1425.
 14. Горяйнов С.А., Потапов А.А., Лощенов В.Б., Савельева Т.А. Флуоресцентная навигация и лазерная спектроскопия в хирургии глиом головного мозга. – М.: МедиаСфера, 2014. – 152 с.
 15. Соколов В.В., Русаков И.Г., Булгакова Н.Н., Ульянов Р.В., Теплов А.А. Флуоресцентные методы в диагностике поверхностного рака мочевого пузыря // *Сибирский онкологический журнал*. – 2007. – №4 (24). – С. 117–126.
 16. Kang Uk, Papayan G.V. Apparatus for photodynamic therapy and photodetection. Патент US8382812.
 17. Valde's P.A., Kim A., Brantsch M. et al. δ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: the need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy // *Neuro-Oncology*. – 2011. – 13(8). – P. 846–856.
 18. Папаян Г.В., Барский И.Я., Титов В.В., Сафиулина С.С., Шедрунов В.В., Лебедев О.Е., Грухие Ю.А., Гуш В.В. Микрофлуориметр для медицинских исследований // *Оптико-механическая промышленность*. – 1982. – №7. – С. 34–37.
 19. Alfano, R. R., D. B. Tata, J. Cordero, P. et al. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue // *IEEE J. Quant. Electron.* – 1984. – 20. – P. 1507–1511.
 20. Anderson-Angels S., Ankerts J., Brun A. et al. Tissue diagnostics using laser-induced fluorescence // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* – 1989. – №93. – P. 335–342.
 21. Andersson-Engels S., Klintederg C., Svanberg K., Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics // *Phys. Med. Biol.* – 1997. – Vol.42. – P. 815–824.
 22. Leonhard M. New Incoherent Autofluorescence/Fluorescence System for Early Detection of Lung Cancer // *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*. – 1999. – Vol. 5. – 3. 71–75.
 23. Маршетта Ж., Декамп Ф. Кольпоскопия. Метод и диагностика // пер. с франц. – М.: МЕДпресс-информ, 2014. – 200 с.
 24. Лисовский В.А., Шедрунов В.В., Барский И.Я., Папаян Г.В., Самойлов В.О., Гуш В.В., Грухин Ю.А., Шуленин А.Н., Соловьев В.Н. Люминесцентный анализ в гастроэнтерологии. – Л.: Наука, 1984. – 234 с.
 - спектрофотометрии при флуоресцентной диагностике раннего рака гортани и бронхов (Combination of fluorescent image with local spectrophotometry for fluorescence diagnosis of early laryngeal and bronchial cancer), *Квант. Электроника*, 2002, № 32 (11), pp. 963–9.
 8. Benavides, J. M., Chang S., Park S. et al. Multispectral digital colposcope for in vivo detection of cervical cancer, *Optics Express*, 2003, No. 11, pp. 1223–36.
 9. Kang Uk, Papayan G.V., Be S.D. et al. Flyuorestsentnyi videodermatoskop (Fluorescence video dermatoscope), *Opticheskii zhurnal*, 2008, No. 1, pp. 32–8.
 10. Kang Uk, Papayan G.V., Berezin B.B., Bae Soo-Jin, Kim S.V., Petrishchev N.N. Multispektral'nyi flyuorestsentnyi organoskop – pribor dlya przhiznennykh issledovaniy laboratornykh zhivotnykh i ikh organov (Multispectral fluorescent organoscope – the device for in vivo study of laboratory animals and its organs), *Opticheskii zhurnal*, 2011, № 9, pp. 82–90.
 11. Papayan G.V., Petrishchev N.N., Panchenko A.V., Kang Uk, Kim S.V., Berezin V.B. Multispektral'naya avtoflyuorestsentnaya diagnostika raka sheiki matki na eksperimental'nykh modelyakh (Multispectral autofluorescence diagnosis of cervical cancer on experimental models), *Sbornik nauchnykh trudov pod red. N.N. Petrishcheva*, SPb.: Lan', 2011, pp. 273–81.
 12. Petrishchev N.N., Kim S.V., Berezin V. B., Papayan G.V. Avtoflyuorestsentnaya vizualizatsiya sudov mikrotsirkulyatornogo rusla (Autofluorescence imaging of microvasculature), *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*, 2010, № 4, pp. 75–7.
 13. Policard. A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Woods C. R., *Soc. BioL.*, 1924, № 91, pp. 1423–5.
 14. Goryainov S.A., Potapov A.A, Loshchenov V.B., Savel'eva T.A. Flyuorestsentnaya navigatsiya i lazernaya spektroskopiya v khirurgii gliom golovnogo mozga (Fluorescence guidance and laser spectroscopy in surgery of brain gliomas), M.: MediaSfera, 2014, pp. 1–152.
 15. Sokolov V.V., Rusakov I.G, Bulgakova N.N., Ul'yanov R.V., Teplov A.A. Flyuorestsentnye metody v diagnostike poverkhnostnogo raka mochevogo puzrya (Fluorescent methods in diagnosis of superficial bladder cancer), *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*, 2007, № 4 (24), pp. 117–26.
 16. Kang Uk, Papayan G.V. Apparatus for photodynamic therapy and photodetection. Patent US8382812.
 17. Valde's P.A., Kim A., Brantsch M. et al. δ -aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: the need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy, *Neuro-Oncology*, 2011, № 13 (8), pp. 846–56.
 18. Papayan G.V., Barskii I.Ya., Titov V.V., Safiulina S.S., Shchedrunov V.V., Lebedev O.E., Grukhiye Yu.A., Gushch V.V. Mikroflyuorimetr dlya meditsinskikh issledovaniy (Microfluorimeter for medical studies), *Optiko-mekhanicheskaya promyshlennost'*, 1982, No. 7, pp. 34–7.
 19. Alfano, R. R., D. B. Tata, J. Cordero, P. et al. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue, *IEEE J. Quant. Electron.*, 1984, № 20, pp. 1507–11.
 20. Anderson-Angels S., Ankerts J., Brun A. et al. Tissue diagnostics using laser-induced fluorescence, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1989, № 93, pp. 335–42.
 21. Andersson-Engels S., Klintederg C., Svanberg K., Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics, *Phys. Med. Biol.*, 1997, Vol. 42, pp. 815–24.
 22. Leonhard M. New Incoherent Autofluorescence/Fluorescence System for Early Detection of Lung Cancer, *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*, 1999, Vol. 5, pp. 71–5.
 23. Marshetta Zh., Dekamp F. Kol'poskopiya. Metod i diagnostika, per. s frants., (Method and diagnosis. Translated from French), M.: MEDpress-inform, 2014, pp. 1–200.
 24. Lisovskii V.A., Shchedrunov V.V., Barskii I.Ya., Papayan G.V., Samoilov V.O., Gushch V.V., Grukhin Yu.A., Shulenin A.N., Solov'ev V.N. Lyuminestsentnyi analiz v gastroenterologii (Luminescence analysis in gastroenterology), L.: Nauka, 1984, pp. 1–234.

APPLICATIONS OF MULTISPECTRAL AUTOFLUORESCENCE IMAGING OF MALIGNANT TUMORS

Papayan GV^{1,2}, Petrishchev NN^{1,2}, Kim SV³, Kim Hyung Ho³, Berezin VB⁴, Kang Uk⁴

¹Center of Laser Medicine, First I.P. Pavlov Federal Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg

²Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg

³Seoul National University Bundang Hospital (SNUH), Seoul, Korea

⁴Korea Electrotechnology Research Institute (KERI), Seoul, Korea

The applications of multispectral autofluorescence imaging of malignant tumor was shown in in vitro and in vivo experiments. Using TC-1 mouse tumor model it was demonstrated that the location of tumor formation can be clearly identified as early as 2 days after injection of tumor cells. Among observed effects the new one is an unusually active angiogenesis at early stage of tumor formation accompanied by atypical tortuous vessels with growth rate up to 3 mm/day. Two-wave excitation simultaneous laser with excitation on wavelength of 390 nm and 635 nm is shown to be promising for autofluorescence diagnosis along with single-wave excitation which is conventionally performed in the violet-blue region of the spectrum. This mode of excitation allows detecting the increased level of protoporphyrin IX even at early stage of carcinogenesis. The fluorescence due to active synthesis of protoporphyrin IX was shown to correlate with density of vessels. Increase of this fluorescence is observed also for aseptic inflammation but it has diffuse pattern which allows differentiating it from local fluorescence image at the site of tumor formation. The possibility of successful achievement of high-quality image using multispectral imaging and also optimization of registration settings were demonstrated in the experiment. The study of surgical specimen showed capabilities of imaging and measurement of autofluorescence in tumor tissue. The obtained results are intended to help in the development of endoscopic methods of imaging and devices for diagnosis of early tumors.

Keywords: fluorescence diagnosis, autofluorescence, multispectral video system, malignant tumor.

Контакты: Папаян Г.В. E-mail: pgarry@mail.ru