



Лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп: доклиническая апробация на экспериментальной опухолевой модели

Н.Н. Булгакова¹, В.В. Смирнов¹, В.И. Фабелинский¹, А.Г. Федотов²,
Н.И. Казачкина³, Г.Д. Капанадзе⁴

¹ – Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

² – ООО «Инлайф», Москва

³ – Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

⁴ – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область

Контактная информация: к.м.н. Голубев Сергей Владимирович, golubev@aetechnologies.ru

В данной работе представлены результаты доклинической апробации макета лазерного спектрально-флуоресцентного кольпоскопа (ЛСФК), разработанного для аутофлуоресцентной диагностики ранних форм рака шейки матки (РШМ). Оценка эндогенного (аутофлуоресцентного) и экзогенного флуоресцентного контраста на примере экспериментальной опухолевой модели показала, что выбранные и реализованные технические решения адекватны поставленной медицинской задаче, и, в то же время, возможности созданного прибора существенно шире. Высокое качество регистрации флуоресцентных изображений и спектральных данных позволит использовать ЛСФК для целей флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с экзогенными фотосенсибилизаторами из класса порфиринов и хлоринов.

Ключевые слова: рак шейки матки, аутофлуоресценция, флуоресцентная диагностика, кольпоскоп, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия.

На протяжении последних лет наблюдается тревожная тенденция роста заболеваемости раком шейки матки (РШМ) среди молодых женщин в возрастной группе до 40 лет, т.е. в репродуктивно значимой и социально активной части населения. В настоящее время доказано, что более 99% случаев РШМ вызывается высокоонкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ), распространенность которого в мире увеличилась более чем в 10 раз, причем основной кон-

тингент составляют женщины детородного возраста [8, 11].

Развитию рака шейки матки предшествуют различные стадии цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN I, CIN II, CIN III), особенностью которых является отсутствие специфических визуально и пальпаторно выявляемых изменений [9, 10].

На первой стадии диспансеризации населения для выявления неоплазии применяется метод цитологического скри-

нинга, или ПАП-тест. Данный метод достаточно прост, однако обладает низкой специфичностью. Количество ложноположительных результатов варьирует, по данным разных авторов, от 15 до 40%. В случае подозрения на развитие CIN проводится кольпоскопическое исследование, предсказательная ценность которого весьма ограничена. Для окончательной диагностики CIN требуется выполнение биопсии шейки матки с последующим гистологическим исследованием. Для улучшения диагностической ценности кольпоскопического исследования и уменьшения количества необоснованных биопсий необходима разработка новых подходов к неинвазивной диагностике ранних форм РШМ [8].

В настоящее время в различных областях медицины и, в первую очередь, в онкологии, большое развитие получают методы диагностики, основанные на регистрации различий во флуоресцентном излучении патологических очагов и окружающих нормальных тканей, которые возникают при освещении поверхности ткани светом определенной длины волны УФ или видимого диапазонов спектра [15, 12]. Эти различия, для описания которых используется термин «флуоресцентный контраст», могут иметь эндогенное или экзогенное происхождение. В первом случае метод называется аутофлуоресцентной диагностикой (АФД). В его основе — различия в интенсивности и спектральном составе эндогенного (аутофлуоресцентного) излучения нормальных и патологических тканей. Как показано во многих клинических исследованиях, при возбуждении в УФ и синей области спектра интенсивность аутофлуоресцентного излучения в очагах рака намного меньше, чем в нормальных тканях (эффект «темного

пятна»). Во втором случае флуоресцентный контраст возникает в результате селективного окрашивания патологических очагов экзогенными красителями или флуоресцирующими маркерами. Прежде всего, к ним относятся фотосенсибилизаторы, которые применяются для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических и неонкологических заболеваний. В результате избирательного накопления фотосенсибилизаторов патологические очаги ярко флуоресцируют в красной области спектра (630-670 нм). Для описания этого метода применяется термин «фотодинамическая диагностика», или «фотодиагностика». Флуоресцентные методы диагностики ранних форм рака обладают крайне высокой чувствительностью, достигающей 90%, и существенно меньшей специфичностью [15, 12-14]. Поскольку глубина проникновения возбуждающего излучения крайне мала, они позволяют выявлять патологические очаги, расположенные только в поверхностных слоях кожи или слизистых оболочек полых органов. Источником диагностической информации является визуальная оценка флуоресцентных изображений либо количественный анализ спектров лазериндуцированной флуоресценции при измерениях *in vivo* в точке поверхности ткани (метод локальной флуоресцентной спектроскопии, ЛФС). При наблюдении флуоресцентных изображений подозрительные очаги выявляются по аномальной интенсивности флуоресценции на фоне флуоресцентного излучения здоровой ткани в зеленой области спектра. Верификация флуоресцентных изображений при проведении ЛФС повышает предсказательную ценность флуоресцентных методов диагностики [13, 14, 19].

Развитие методов флуоресцентной диагностики ранних форм РШМ сдерживалось ввиду отсутствия на рынке специальной кольпоскопической аппаратуры. Ранее нами были проведены исследования, направленные на разработку метода аутофлуоресцентной диагностики ранних форм РШМ [2, 4], и описан разрабатываемый лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп (ЛСФК), предназначенный для реализации данного метода [1, 3]. При его разработке предусматривалось выполнение следующих функций:

1. Обычная визуализация ШМ и, в том числе, патологических очагов при освещении ее поверхности сверхяркими светодиодами белого света с помощью высокочувствительной и высококачественной фото/видеокамеры. Наложение электронного зеленого фильтра на изображение предоставляет дополнительную возможность контрастирования сосудистой структуры.

2. Регистрация и анализ флуоресцентного изображения той же фото/видеокамерой. Одновременный качественный анализ сосудистой структуры, цветного и флуоресцентного изображений позволяет выявлять подозрительные участки.

3. Измерения спектров лазериндуцированной флуоресценции в локальной точке ткани при возбуждении на длине волны ~ 407 нм с помощью волоконно-оптического зонда, регистрация спектра в диапазоне 420–800 нм и его отображение на экране монитора компьютера в реальном времени.

В данной работе представлены результаты доклинической апробации ЛСФК на примере экспериментальной опухолевой модели. **Целью** работы была оценка возможностей разрабатываемого ЛСФК в регистрации как эндогенного (аутофлуо-

ресцентного), так и экзогенного флуоресцентного контраста опухоли-норма.

Материалы и методы

Состав прибора. Состав прибора и основные задачи, которые решались при его разработке, описаны ранее в работе [1]. Кратко необходимо отметить, что прибор состоял из видеокамеры с объективом с переменным фокусным расстоянием (zoom), источников белого и синего света, блока светофильтров, блока питания источников света, решеточного спектрометра, лазерного источника излучения с длиной волны ~ 407 нм, волоконно-оптического зонда.

Однако к настоящему моменту прибор претерпел заметное изменение. Вместо видеокамеры с матрицей 1360×1040 пикселей и zoom-объективом теперь устанавливается фотокамера Canon EOS550D с матрицей 5184×3456 пикселей и макрообъективом с фиксированным фокусным расстоянием 100 мм. Такое сочетание матрицы и объектива дает возможность получить настолько высококачественные изображения, позволяющие рассмотреть мельчайшие детали, что применение объективов с переменным фокусным расстоянием для последовательного детального изучения объекта теперь представляется излишним.

Используемая фотокамера способна постоянно выводить «живое» телевизионное изображение в формате HD видео, которое наблюдается врачом на экране монитора и обеспечивает возможность настройки положения и «прицеливание» головки кольпоскопа.

Проведенная модификация позволяет резко сократить время исследования, вследствие чего работа с данным прибором становится значительно более удобной для врача-кольпоскописта.

Прибор управляется компьютером со специально разработанным многофункциональным программным комплексом, который, в том числе, обеспечивает детальную визуализацию любых фрагментов изображения с помощью «электронного увеличения».

Регистрация цветного изображения осуществляется при освещении рабочего поля белыми сверхяркими светодиодами, в то время как для получения флуоресцентных изображений применяются синие светодиоды, обеспечивающие плотность мощности возбуждающего излучения на поверхности ткани 1-2 мВт/см². Для наблюдения флуоресцентных изображений перед объективом устанавливается светофильтр, отсекающий свет синих светодиодов и пропускающий излучение флуоресценции в диапазоне 420 — 800 нм.

ЛФС осуществляется решеточным спектрометром с интегрированным лазерным источником возбуждения флуоресценции, оптимизация длины волны которого была проведена ранее в работе [4]. Источник представляет собой лазерный диод с длиной волны 407±5 нм и волоконно-оптическим выходом. Для доставки возбуждающего излучения к исследуемой поверхности и сбора флуоресцентного излучения используется волоконно-оптический зонд длиной до двух метров. Максимальная мощность лазерного излучения на выходе зонда — 2 мВт.

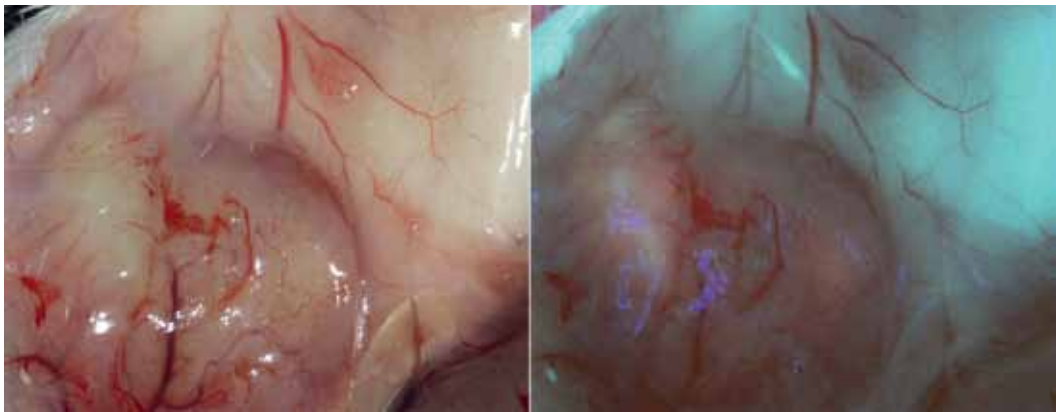
Опухолевая модель. В качестве экспериментальной опухолевой модели использовали аденокарциному толстой кишки мыши (Акато). В работе использовались мыши линии BALB/c, самцы, 18 г, разведения питомника РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Опухоль прививали подкожно в количестве 75 мг опухолевой ткани на мышь. Исследование проводили на 8-ой

день роста. Для получения изображений и измерения спектров животное умерщвляли дислокацией шейных позвонков и выделяли опухоль с участком кожи. Фотосенсибилизатор (хлорин еб) вводили внутривенно в дозе 2 мг/кг в.т. за 3 ч до проведения исследования.

Измерения спектров и фотосъемку проводили в затемненном помещении.

Результаты и их обсуждение

Изображения, полученные при освещении тканей белым (А) и синим (Б) светом (аутофлуоресценция), представлены на рис. 1. Прежде всего, следует отметить высокое качество изображений поверхности и сосудистой структуры тканей, а также ярковыраженный контраст между опухолью и окружающей нормальной тканью при освещении синим светом. Как можно видеть на рис. 1Б, подкожно-жировая клетчатка имеет однородное зеленоватое свечение. Свечение опухолевой ткани неоднородно и имеет красноватый оттенок, что позволяет определить четкие границы опухоли. Визуальный аутофлуоресцентный контраст подтверждается данными ЛФС. Как можно видеть на рис. 2, в спектрах, измеренных в нормальной ткани, присутствует широкая полоса излучения в области 450-750 нм с максимумом в зеленой области на 500 нм. Форма спектров аутофлуоресценции нормальной ткани имеет высокую воспроизводимость, ошибка измерений в локальной точке не превышает 3-5%. Спектры, измеренные в зоне опухоли, имеют ярковыраженные отличия. Прежде всего, следует отметить, что спектральная интенсивность аутофлуоресцентного излучения опухоли в диапазоне 420-600 нм значительно меньше, чем в нормальной ткани, причем в зеленой об-



А

Б

Рис. 1. Изображения опухоли на фоне окружающей нормальной ткани при освещении белым (А) и синим (Б) (аутофлуоресценция) светом.

ласти — почти на порядок (рис. 2). Во-вторых, в области 630-650 нм присутствует небольшой пик флуоресценции с максимумом на 635 нм, наличие которого объясняет красноватый оттенок аутофлуоресцентного излучения опухолевой ткани. Положение максимума на 635 нм свидетельствует о присутствии

в опухоли эндогенного протопорфирина 9. Действительно, эффект накопления эндогенных порфиринов может происходить в тканях злокачественной опухоли, имеющих высокую активность метаболизма и большую плотность микрососудов, как в стадии активного роста и васкуляризации, так и в результате

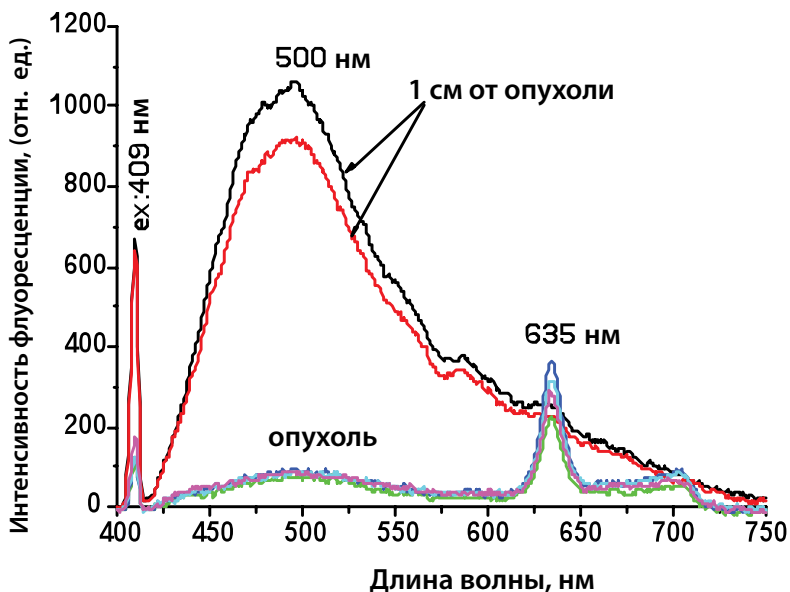


Рис. 2. Спектры лазер-индуцированной аутофлуоресценции, измеренные в зоне опухоли и в 1 см от опухоли.

возникновения в них очагов ишемии и некроза [12].

Изображения, полученные при освещении тканей белым (А) и синим (Б) светом после введения фотосенсибилизатора, представлены на рис. 3. Можно видеть, что разработанный макет ЛСФК позволяет с высокой точностью и качеством изображения регистрировать не только эндогенный, но и экзогенный контраст, обусловленный селективным накоплением в опухоли фотосенсибилизатора. Пораженный участок и его границы, за исключением зоны слева от опухоли, четко очерчены и визуализируются по яркой красной флуоресценции фотосенсибилизатора, при этом отчетливо виден сосудистый рисунок опухоли (рис. 3А и 3Б). Зеленое свечение окружающей нормальной ткани свидетельствует об отсутствии в ней фотосенсибилизатора.

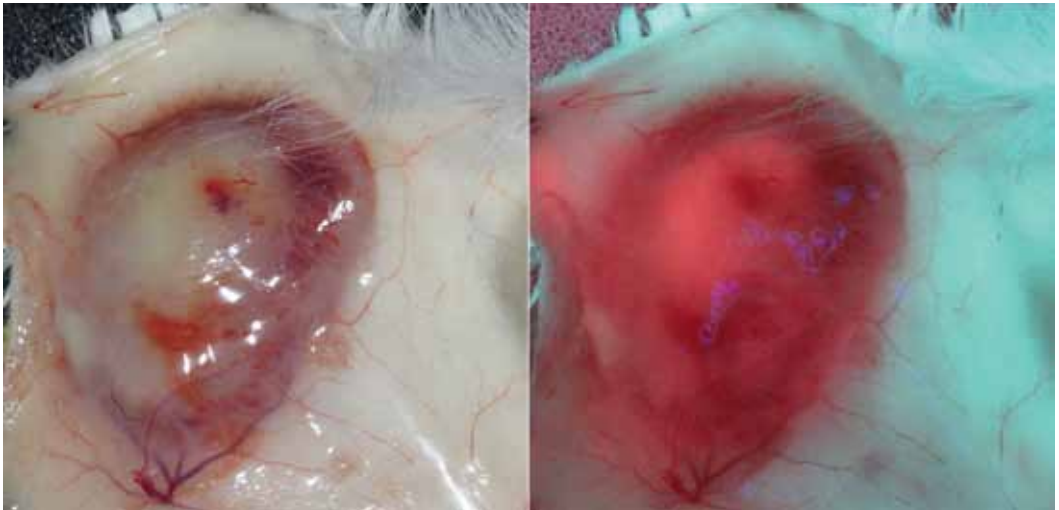
Данные ЛФС, представленные на рис. 4, также полностью подтверждают визуальные оценки. Можно видеть, что в спектрах, измеренных в зоне опухоли,

присутствует пик флуоресценции фотосенсибилизатора с максимумом 667 нм, интенсивность которого резко падает на границе опухоли.

Выводы

Проведенная доклиническая апробация созданного макета ЛСФК показала, что выбранные и реализованные технические решения адекватны поставленной медицинской задаче, в то же время, возможности созданного прибора существенно шире. Очевидно, что прибор может применяться не только для разработки метода АФД ранних форм РШМ. Высокое качество регистрации экзогенного флуоресцентного контраста «опухоль-норма» позволит использовать ЛСФК для целей флуоресцентной диагностики и ФДТ РШМ.

Метод ФДТ, клинический опыт применения которого в гинекологии обобщен в ряде обзоров, вызывает большой интерес гинекологов [17, 5]. Проведенные исследования выявили большой потенциал



А

Б

Рис. 3. Изображения опухоли на фоне окружающей нормальной ткани при освещении белым (А) и синим (Б) светом после введения фотосенсибилизатора.

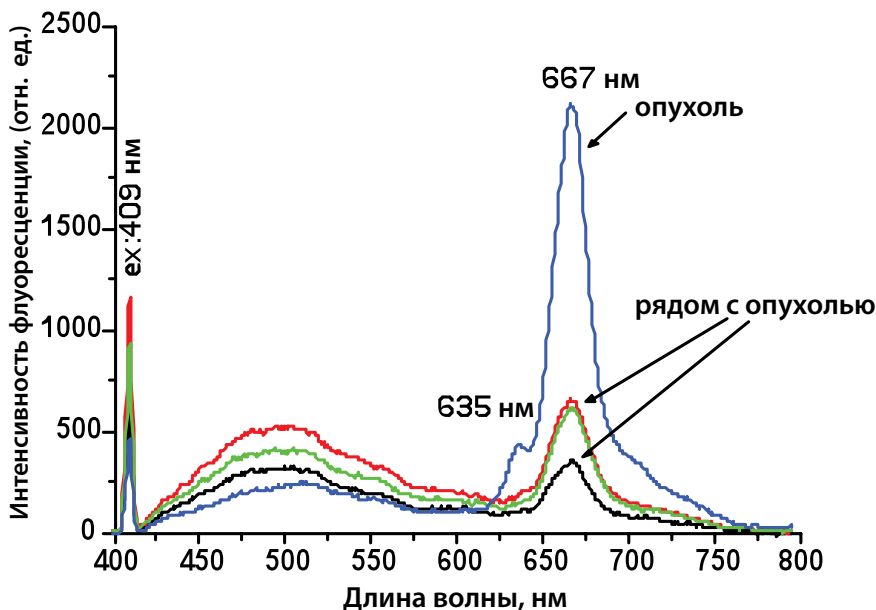


Рис. 4. Спектры флуоресценции опухолей и окружающей ткани рядом с опухолью, измеренные через 3 ч после внутривенного введения фотосенсибилизатора.

ФДТ в лечении как онкологической патологии, так и фоновых и предраковых заболеваний вульвы и шейки матки при использовании фотосенсибилизаторов из класса порфиринов, хлоринов, фталоцианинов. Анализ литературы показывает, что ввиду отсутствия специальной кольпоскопической аппаратуры, многие клинические разработки ФДТ проводились без флуоресцентных исследований [20]. При этом следует отметить, что флуоресцентное сопровождение является крайне важным аспектом при разработке и применении таких методик, поскольку позволяет оптимизировать время проведения ФДТ [18], проводить диагностическое исследование и выявлять границы опухолевого поражения и (или) обнаруживать дополнительные, скрытые очаги патологии [6, 16, 7].

Разработанный нами ЛСФК полностью подходит для клинических исследований в этой области, поскольку позволяет реализовывать все указанные выше

задачи. Прибор может применяться для разработки методик флуоресцентной диагностики и ФДТ онкологической и неонкологической патологии вульвы, влагалища и шейки матки с фотосенсибилизаторами из класса порфиринов и хлоринов. Более того, возможна адаптация прибора для целей интраоперационной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Настоящая работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного контракта № 16.522.12.2005 от «04» июля 2011.

Список литературы

1. Булгакова Н.Н., Смирнов В.В., Фабелинский В.И. и соавт. Спектрально-флуоресцентный кольпоскоп // Биомедицинская радиоэлектроника, 2013 (в печати).
2. Булгакова Н.Н., Трушина О.И., Новикова Е.Г. и соавт. К методу

- аутофлуоресцентной диагностики ранних форм рака шейки матки: особенности эндогенной флуоресценции покровного эпителия шейки матки // Московский хирургический журнал. 2012. т. 6. № 28. С. 28-32.
3. **Булгакова Н.Н., Трушина О.И., Новикова Е.Г. и соавт.** Лазерный спектрально-флуоресцентный кольпоскоп. Патент на ПМ № 104836.
 4. **Булгакова Н.Н., Трушина О.И., Новикова Е.Г. и соавт.** Разработка метода аутофлуоресцентной диагностики ранних форм рака шейки матки: оптимизация длины волны лазерного возбуждения, Московский хирургический журнал. 2011. т. 6. № 22. С. 30-34.
 5. **Денисова Е.Д., Аполихина И.А., Булгакова Н.Н.** Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия: возможности применения при заболеваниях нижних отделов половых путей // Акушерство и гинекология. 2010. № 3. С. 17-21.
 6. **Денисова Е.Д., Аполихина И.А., Булгакова Н.Н.** Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия остроконечных кондилом вульвы с препаратом аласенс // Акушерство и гинекология. 2011. № 8. С. 112-116.
 7. **Денисова Е.Д., Булгакова Н.Н., Аполихина И.А. и соавт.** Исследование кинетики накопления протопорфирина IX в тканях вульвы после перорального приема 5-аминолевулиновой кислоты // Акушерство и гинекология. 2012. № 4-2. С. 83-87.
 8. **Козаченко А.В.** Новые направления в диагностике и лечении микрокарциномы шейки матки // Акушерство и гинекология. 2006. № 5 С. 56-59.
 9. **Кулаков В.И., Прилепская В.И., Минкина Г.Н. и соавт.** Профилактика рака шейки матки. Руководство для врачей. М. 2007.
 10. **Минкина Г.Н., Минкина Г.Н., Манухин И.Б., Франк Г.А.** Предрак шейки матки. М. 2008.
 11. **Роговская С.И.** Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки. – «Гэотар-Медиа». 2007. 141 с.
 12. **Русаков И.Г., Соколов В.В., Булгакова Н.Н. и соавт.** Флуоресцентные методы диагностики и поверхностный рак мочевого пузыря: современное состояние проблемы // Урология. 2008. № 3. С. 67-71.
 13. **Соколов В.В., Булгакова Н.Н., Дронова О.Б. и соавт.** «Флуоресцентные методы в эндоскопической диагностике тяжелой дисплазии и раннего рака пищевода Барретта» (Обзор литературы) // Российский онкологический журнал. 2008. № 3. С. 46-54.
 14. **Соколов В.В., Чиссов В.И., Филоненко Е.В. и соавт.** Флуоресцентная диагностика начального центрального рака легкого // Пульмонология, 2005, № 1, С. 107-11.
 15. **Чиссов В.И., Соколов В.В., Булгакова Н.Н. и соавт.** Флуоресцентная эндоскопия, дермаскопия и спектрофотометрия в диагностике злокачественных опухолей основных локализаций, // Российский биотерапевтический журнал. 2003. Т. 2. № 4. С. 45-56.
 16. **Чулкова О.В., Новикова Е.Г., Соколов В.В. и др.** Диагностика и лечение фоновых и предраковых заболеваний вульвы. Практическая онкология. 2006. Т. 7. № 4. С. 197-204.
 17. **Ascencio M., Collinet P., Cosson M. et al.** The place of photodynamic therapy in gynecology // Gynecol. Obstetr.

- Fertil.. 2007. v.35(11). P.1155-1165.
18. *Hillemanns P., Wang X., Hertel H., et al.* Pharmacokinetics and selectivity of porphyrin synthesis after topical application of hexaminolevulinate in patients with cervical intra-epithelial neoplasia // Am. J. Obstetr. Gynecol. 2008. v.198(3). P. 300-307.
19. *Hillemanns P., Weingandt H., Baumgartner R., et al.* Photodetection of cervical intra-epithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence // Cancer. 2000. v.15;88(10):2275-82.
20. *Trushina O.I., Novikova E.G., Sokolov V.V., et al.* Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2008. v. 5(4). P. 256-259.

Laser spectral fluorescence colposcope: preclinical testing on experimental mice tumor

N.N. Bulgakova, V.V. Smirnov, V.I. Fabelinsky, A.G. Fedotov,
N.N. Kazachkina, G.D. Kapanadze

The preclinical testing of laser spectral-fluorescence colposcope developed for autofluorescence detection of cervical neoplasia has been performed using experimental mice tumor. The capability to detect malignant lesions has been tested before (by autofluorescence) and three hours after the injection of a chlorine-based photosensitizer. It was shown that technical solutions which have been implemented in this equipment are adequate for detection of both endogenous (autofluorescence) and exogenous fluorescence contrast between a malignant lesion and normal tissue. High quality fluorescence imaging and excellent reproducibility of local spectral fluorescence measurements are promising for further applications of this equipment for fluorescence diagnosis and in course of photodynamic therapy of cancer in gynecology.

Key words: cervical carcinoma, autofluorescence, fluorescence diagnostics, colposcope, photosensitisers, photodynamic therapy.