

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

FLUORESCENT DIAGNOSTICS IN CLINICAL PRACTICE

**K. Korchagina
S. Gamayunov
S. Ivanov**

Summary. Fluorescence diagnostics is a non-invasive and sensitive diagnostic tool for planning and evaluating treatment outcomes in oncology. The method makes it possible to obtain images of pathological lesions invisible in white light, helps to identify relapses in the early stages, monitor photodynamic therapy and predict its effectiveness. The article presents the main directions of the use of fluorescence diagnostics in clinical practice.

Keywords: fluorescence diagnosis, photosensitizer, fluorescence contrast, photobleaching, monitoring.

Корчагина Ксения Сергеевна

Соискатель, МРНЦ им А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ
«НМИЦ радиологии»
Минздрава России (Обнинск)
Ksenija-korchagina@rambler.ru

Гамаюнов Сергей Викторович

К.м.н., МРНЦ им А. Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ
радиологии» Минздрава России (Обнинск)
Gamajnovs@mail.ru

Иванов Сергей Анатольевич

Д.м.н., профессор РАН, директор, МРНЦ имени
А. Ф. Цыба — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России (Обнинск)
oncurolog@gmail.com

Аннотация. Флуоресцентная диагностика — это неинвазивный и чувствительный диагностический инструмент для планирования и оценки результатов лечения в онкологии. Метод дает возможность получать изображение невидимых в белом свете патологических очагов, помогает выявлять рецидивы на ранних сроках, проводить мониторинг фотодинамической терапии и прогнозировать ее эффективность. В статье представлены основные направления использования флуоресцентной диагностики в клинической практике.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, фотосенсибилизатор, флуоресцентная контрастность, фотовыгорание, мониторинг.

Введение

Флуоресцентная диагностика (ФД) известна медицине с 40-х гг. XX в. (Auler H., 1942). Однако, в целом методы ФД получили широкое распространение в клинической практике лишь в конце XX вв. Определяющую роль в этом процессе сыграли синтез новых химически однородных фотосенсибилизаторов (ФС) с большими показателями селективности и разработка удобных в эксплуатации спектральных оптических и других диагностических приборов (Лощенов В.Б., 2013), (Ярославцева-Исаева Е.В., 2018), (Филоненко, 2014).

В основе метода лежит регистрация непродолжительного свечения вещества (флуорофора), возникающего после поглощения им светового излучения. Различают аутофлуоресценцию или эндогенную флуоресценцию, когда в качестве флуоресцирующих агентов выступают эндогенные молекулы (аминокислоты,

гемоглобин и др.), и экзогенную флуоресценцию, суть которой заключается во введении больному веществ — (ФС). Аутофлуоресценция не является темой данного обзора. ФД может выполняться как самостоятельный диагностический метод, так и в сочетании с фотодинамической терапией (ФДТ).

Благодаря способности ФС селективно накапливаться в злокачественных новообразованиях относительно окружающих здоровых тканей создается флуоресцентный контраст, достоверное детектирование которого и составляет основную задачу диагностического метода.

Флуоресцентная диагностика (ФД) с целью определения объема опухолевого поражения довольно широко используется в клинической практике (Филоненко Е.Ф., 2012)(Xiao Q, 2018). Другим, менее изученным направлением использования ФД, является мониторинг и планирование ФДТ.

1. Физические основы флуоресцентной диагностики

1.1. Взаимодействие фотонов с биотканью

Излучение, используемое при ФД, захватывает интервал от 400 до 900 нм, что соответствует видимой и ближней инфракрасной частям спектра (Kwiatkowski S., 2018). При прохождении электромагнитного излучения через среду световая энергия может рассеиваться или поглощаться.

Рассеяние света внутри тканей зависит от количества и размеров ее клеточных структур, а также других компонентов, обладающих различными показателями преломления.

Поглощение заключается в частичном переходе световой энергии в другие виды энергии или в оптическое излучение с другими спектральными характеристиками.

Основными поглотителями в биологических тканях являются вода и макромолекулы (белки, меланин, гемоглобин). К экзогенным хромофорам, относятся ФС, которые могут выступать как в роли диагностических, так и терапевтических агентов. Отсутствие сильных эндогенных молекул — хромофоров, поглощающих свет в интервале между 600 нм и 1200 нм, определяет границы «терапевтического окна», оптимального для проведения ФДТ и ФД (Mallidi S., 2016).

Распределение фотонов флуоресцентного излучения, возникающего в ходе фотохимических реакций, внутри биоткани подчиняется основным принципам, справедливым для падающего (возбуждающего) лазерного света (Лысенко, 2018). Следовательно, важными особенностями, которые влияют на измерение флуоресценции, являются: ослабление света по мере прохождения от глубоких слоев к поверхностным, наличие эндогенных флуорофоров, которые вызывают аутофлуоресценцию, поглощение, рассеяние, отражение света.

Понимание физики взаимодействия света с тканью требует сложного экспериментального и компьютерного моделирования для коррекции искажающего влияния оптических свойств. Это крайне важно при разработке оборудования и методик проведения ФД.

1.2. Основы генерации флуоресценции

Молекулы ФС, накопленные в ткани, являются флуорофорами, т.е. они способны не только к поглощению света, но и к излучению световой энергии. При этом длина волны лазерного излучения должна совпадать с пи-

ком поглощения используемого препарата (Kwiatkowski S., 2018).

Основное состояние молекулярных систем, характеризующееся наименьшей энергией и наибольшей стабильностью, — синглетное (S0). При поглощении одного фотона света молекула фотосенсибилизатора переводится в возбужденное синглетное состояние более высокого энергетического уровня, 1S* (Chilakamarthi U., 2017). Система в состоянии 1S* нестабильна и может инициировать фотохимические реакции или подвергаться межсистемному переходу в триплетное состояние, 3T*. Молекула от возбужденного состояния 1S* или 3T* может возвращаться к S0 посредством безызлучательного распада и генерации тепловой энергии или избавляться от избыточной энергии, испуская световое излучение.

Возвратившись в исходное состояние, ФС способны повторно вступать в химические реакции после поглощения нового кванта световой энергии. Однако после некоторого числа циклов флуорофор утрачивает способность участвовать в фотодинамической реакции. Этот эффект называется фотообесцвечиванием, или фотобличингом.

Спектр флуоресценции, возникающей в результате S1→S0 перехода ФС, сдвинут относительно спектра поглощения в длинноволновую область.

Известно наличие определенной взаимосвязи в количественном распределении энергии поглощенных фотонов между излучательными процессами и реализацией фотодинамических реакций с образованием фотопродуктов. Однако следует отметить, что вышеуказанные процессы не являются линейными и вклад каждого из них может варьировать.

2. Методы получения флуоресцентных изображений

Для реализации ФД в клинической практике используется два подхода: использование точечных регистраторов и цифровых камер (Herman, 2012). На данный момент существует несколько доступных установок российского производства, работающих по этим технологиям. Каждый из предложенных подходов для ФД имеет свои недостатки и преимущества. Так, например, точечная регистрация флуоресценции может регистрировать достаточно точные данные уровня флуоресценции, но не позволяет оценить границы опухоли и учитывать гетерогенность опухолевой ткани. В связи с этим, для получения достоверных результатов требуются множественные измерения в не-

скольких точках, что существенно усложняет диагностическую процедуру.

Системы, использующие камеру в качестве детектора, лишены вышеназванного недостатка. Однако регистрация только флуоресцентного изображения в свою очередь ухудшает качество этих изображений и, соответственно, не позволяет проводить достоверную количественную оценку.

К сожалению, следует отметить отсутствие на рынке оборудования для флуоресцентной диагностики, отвечающего всем требованиям эффективного клинического использования. Для успешной разработки алгоритмов расчета параметров светового воздействия на основании данных флуоресценции система должна сочетать следующие характеристики: точность и воспроизводимость получаемых результатов, возможность оценки параметров флуоресценции в режиме реального времени, возможность учета гетерогенности опухоли и окружающей здоровой ткани, легкость в интерпретации получаемого изображения и получаемых данных, относительно низкая себестоимость такой системы.

3. Определение границ для хирургии и биопсии

Визуализация границ опухолевого процесса для соблюдения радикальности хирургического вмешательства, выявление клинически не детектируемых очагов и навигация для прицельной биопсии составляют основную пласт показаний для проведения ФД.

Доступность анатомического расположения и высокая частота встречаемости злокачественных новообразований кожи (Shelton M. E., 2019) явились предпосылками к их активному изучению методом флуоресцентной диагностики. Основными задачами является уточнение границ поражения, выявление скрытых очагов, в том числе рака *in situ* и других облигатных предраковых состояний (Narayanamurthy V., 2018).

ФД активно применяется в нейрохирургической практике. Интраоперационная флуоресцентная диагностика у пациентов с глиомами позволяет эффективно выявлять зоны хирургического интереса (Stummer W., 2017). Некоторые исследования демонстрируют достоверно значимые различия уровня флуоресценции в зависимости от гистологической степени злокачественности новообразований головного мозга (Akimoto J., 2019).

Известно, что рак мочевого пузыря характеризуется высоким риском внутривезикулярного рецидива после

трансуретральных резекций (ТУР). Таким образом, динамическое наблюдение с использованием методик, позволяющих оценить полноту ТУР и выявлять опухоль на ранних этапах развития, особенно актуальны (Bochenek K., 2019).

ФД — эффективный, недорогой метод, позволяющий повысить чувствительность кольпоскопического исследования. Отдельные исследования демонстрируют близкую к 100% чувствительность и 77% специфичность при выявлении участков дисплазии эпителия шейки матки (Grant B. D., 2015).

В отличие от других методов визуализации, таких как ПЭТ, МРТ, компьютерная томография и т.д., ФД является поверхностно-чувствительным методом, однако позволяет детектировать даже незначительные по объему поражения.

Использование флуоресцентной визуализации в качестве диагностического инструмента позволяет повысить чувствительность стандартных методик, увеличить радикальность хирургических вмешательств и в конечном итоге привести к увеличению показателей выживаемости и качества жизни (Tirirneni K. E., 2017).

4. Флуоресцентная диагностика для планирования и мониторинга фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия является одним из высокотехнологичных методов современной медицины (Agostinis P., 2011), основанном на цитотоксическом действии активных форм кислорода, генерирующихся при взаимодействии фотосенсибилизатора, селективно накопившегося в опухолевой ткани, со светом определенной длины волны.

Безусловными преимуществами метода являются: селективная деструкция патологических очагов, отсутствие лимитирующих кумулятивных доз фотосенсибилизатора и светового воздействия и хорошие косметические результаты.

К числу недостатков метода относятся ограниченная глубина терапевтического воздействия и эмпирический характер подбора режимов лазерного воздействия без учета различий в фармакокинетике ФС и оптических свойствах тканей (Middelburg T. A., 2015). Более того, при проведении ФДТ в облучаемой ткани происходит много сложно прогнозируемых фотофизических, метаболических и молекулярных изменений. Это означает, что одни и те же параметры терапевтического воздействия могут приводить в конечном счете к различным результатам лечения (James N. S., 2018).

В качестве инструмента мониторинга и средства обеспечения обратной связи — реакции на лечение — наиболее развитым и легко доступным методом является измерение уровня флуоресценции.

Несомненно, кроме мониторинга фотодинамических реакций большой интерес представляет связь полученных данных флуоресцентной диагностики с клиническими результатами.

Описанные механизмы генерации флуоресценции позволяют по ее уровню косвенно судить о концентрации ФС в биологической ткани (Лощенов В.Б., 2013). Оценка накопления препарата до лечения с определением величины контрастности опухоль/норма играет важную роль в определении оптимального времени начала процедуры.

По мере прохождения фотодинамических реакция происходит уменьшение уровня флуоресценции фотосенсибилизатора (фотобликинг). Считается, что основную роль в данном процессе играет молекулярный кислород, который приводит к необратимым фотоокислительным модификациям ФС и потере способности флуорофора флуоресцировать (James N.S., 2018). С этой точки зрения показатель фотовыгорания может служить суррогатным маркером динамики синглетного кислорода, а следовательно, коррелировать с эффективностью прохождения фотодинамических реакций.

Целый ряд экспериментальных и клинических работ продемонстрировал актуальность исследования уровня флуоресценции в качестве предиктивного маркера ответа опухоли на ФДТ.

Ascencio M. и соавт. (Ascencio M., 2008) изучали корреляцию фотобликинга протопорфирина IX с выраженностью тканевого ответа после проведения ФДТ с гексаминолевуленатом (HAL-PDT) на модели рака яичника NuTu 19. Выраженное выгорание протопорфирина IX соответствовало хорошему ответу опухоли на воздействие (некроз 3–4), в то время как при отсутствии выгорания отмечали слабый ответ (некроз 0–2) ($P < 0.05$).

Voere I. A. и соавт. при изучении эффективности ФДТ с 5-ALA при пищеводе Барретта (Barrett's esophagus (BE)) на крысиных моделях выявили выраженную гетерогенность показателей фотобликинга протопорфирина IX. Сообщается о корреляции выраженного фотобликинга с абляцией предопухолевых тканей. В тоже время, при отсутствии выгорания протопорфирина IX в процессе лазерного воздействия повреждения эпителия не наблюдалось. На основании полученных данных авторы делают вывод о возможности использования кинетики фотобликинга в качестве предиктора

тканевого ответа на проведение ALA-PDT (Voere, и др., 2006).

Небольшая клиническая работа была проведена Kate C. Blanco и коллегами (Blanco K.C., 2015) и включала 8 пациентов с базальноклеточным раком кожи. При анализе результатов показана корреляция неполного ответа опухоли на лечение с низкими уровнями накопления PpIX до лечения ($p = 0,0153$). Данное исследование отмечает предиктивную роль накопления ФС в отношении результатов лечения.

Sharwani A и соавт. оценивали использование метода флуоресцентной визуализации для мониторинга концентрации протопорфирина IX (PpIX) на модели базальноклеточного рака кожи (Sharwani A., 2014). Результаты также продемонстрировали роль показателя флуоресценции до воздействия как предиктивного маркера эффективности.

В исследовании, проведенном Brian W. Pogue продемонстрирована зависимость кинетики фотовыгорания от режимов облучения. Так, фракционированное лазерное воздействие света через 1-минутные интервалы увеличивало фотообесцвечивание в ткани пищевода Барретта человека на 25% больше, в сравнении со стандартным непрерывным ($p < 0,001$) (Pogue B.W., 2008).

Существуют исследования, результаты которых не подтвердили предиктивной роли параметров флуоресценции в отношении результатов ФДТ. Среди них — экспериментальная работа на мышах BALB/c с имплантированной опухолью молочной железы EMT6 (Baran T.M., 2012). При анализе результатов эффективности лечения не было обнаружено корреляции между временем удвоения объема опухоли и фотовыгоранием. При этом скорость фотообесцвечивания была быстрее при плотности мощности 150 в сравнении с 50 мВт / см² ($p < 0,1$), что является обратным отражением тенденции, наблюдаемой в большинстве аналогичных работ. Результаты данного исследования подчеркивают сложность дозиметрии на основе параметров флуоресценции и необходимость их оценки для каждого фотосенсибилизатора отдельно.

Таким образом, большинство авторов отводят ФД значимую роль в возможности дозиметрии и мониторинге ФДТ и оптимизации ее режимов, а в качестве предиктора неэффективности лечения называют низкие значения флуоресцентной контрастности и фотовыгорания. Безусловно, изучение флуоресцентной контрастности и фотовыгорания как суррогатных дозиметрических и прогностических маркеров эффективности ФДТ является интересным и актуальным направлением. Однако для подтверждения взаимосвязи этих параметров

с эффективностью ФДТ требуется организация новых исследований при адекватно спланированном протоколе.

Заключение

ФД — зарекомендовала себя как эффективный и чувствительный диагностический инструмент для планирования и оценки результатов лечения в онкологии. Среди преимуществ метода — неинвазивный, а часто и бескон-

тактный, характер, относительно невысокая стоимость, простота и скорость выполнения.

Дальнейшее совершенствование метода ФД может быть связано с поиском новых ФС, обладающих более высокой селективностью и фотоактивностью, опухолетропностью, способностью к возбуждению в ближнем инфракрасном диапазоне спектра, создание новой и совершенствование уже разработанной диагностической аппаратуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agostinis P, Berg K., Cengel K. A., Foster T. H., Girotti A. W., Gollnick S. O. Photodynamic therapy of cancer: an update [Статья] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. — Jul-Aug 2011 r. — 4: T. 61. — стр. 250–281.
2. Akimoto J, Fukami S., Ichikawa M., Mohamed A., Kohno M. Intraoperative Photodiagnosis for Malignant Glioma Using Photosensitizer Talaporfin Sodium. [Статья] // *Front Surg*. — Mar 2019 r. — 12: T. 6.
3. Ascencio M [и др.] Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching is a useful tool to predict the response of rat ovarian cancer following hexaminolevulinic acid photodynamic therapy. [Журнал] // *Lasers Surg Med*. — Jul 2008 r. — 5: T. 40. — стр. 332–41. — doi: 10.1002/lsm.20629.
4. Auler H, Banzer G. [Статья] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. — 1942 r. — 65: T. 53.
5. Baran T. M., Foster T. H. Fluence rate-dependent photobleaching of intratumorally administered Pc 4 does not predict tumor growth delay [Статья] // *Photochem Photobiol*. — 2012 r. — 5: T. 88. — стр. 1273–1279.
6. Blanco K. C., Moriyama L. T., Inada N. M., S6lvio A. G., Menezes P. F. C., Leite E. J. S., Kurachi C., Bagnato V. S. Fluorescence guided PDT for optimization of the outcome of skin cancer treatment [Статья] // *Front. Phys*. — 30 April 2015 r.
7. Bochenek K, Aebisher D., Międybrodzka A., Cieślak G., Kawczyk-Krupka A. Methods for bladder cancer diagnosis — The role of autofluorescence and photodynamic diagnosis. [Статья] // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. — 27 Sep 2019 r. — стр. 141–148. .
8. Boere I A [и др.] Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching and the response of rat Barrett's esophagus following 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. [Журнал] // *Photochem. Photobiol*. — Nov-Dec 2006 r. — 6: T. 82. — стр. 1638–44.
9. Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future [Статья] // *Chem Rec*. — Aug 2017 r. — 8: T. 17. — стр. 775–802.
10. Grant B. D., Schwarz R. A., Quang T. High-resolution microendoscope for the detection of cervical neoplasia. [Статья] // *Methods Mol Biol*. — 2015 r. — T. 1256. — стр. 421–434.
11. Herman C. Emerging technologies for the detection of melanoma: achieving better outcomes [Статья] // *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. — 2012 r. — T. 5. — стр. 195–212.
12. James N. S., Cheruku R. R., Missert J. R., Sunar U., Pandey R. K. Measurement of Cyanine Dye Photobleaching in Photosensitizer Cyanine Dye Conjugates Could Help in Optimizing Light Dosimetry for Improved Photodynamic Therapy of Cancer [Статья] // *Molecules*. — 2018 r. — 8: T. 23. — стр. 1842.
13. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbacka J. Photodynamic therapy — mechanisms, photosensitizers and combinations [Журнал] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2018 r. — T. 106. — стр. 1098–1107.
14. Mallidi S., Anbil S., Bulin A. L., Obaid G., Ichikawa M., Hasan T. Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy [Статья] // *Theranostics*. — 2016 r. — 13: T. 6. — стр. 2458–2487.
15. Middelburg T. A., Hoy C. L., Neumann H. A., Amelink A., Robinson D. J. Correction for tissue optical properties enables quantitative skin fluorescence measurements using multi-diameter single fiber reflectance spectroscopy [Статья] // *J Dermatol Sci*. — Jul 2015 r. — 1: T. 79. — стр. 64–73.
16. Narayanamurthy V., Padmapriya P., Noorasafin A., Pooja B., Hema K., Yuhainis Firus Khan A., Nithyakalyanic K., Samsurif F. Skin cancer detection using non-invasive techniques [Статья] // *RSC Adv*. — 2018 r. — T. 8. — стр. 28095–28130.
17. Pogue B. W., Sheng C., Benevides J., Forcione D., Puricelli B., Nishioka N., Hasan T. Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching increases with the use of fractionated irradiation in the esophagus [Статья] // *J Biomed Opt*. — 2008 r. — 3: T. 13.
18. Sharwani A., Alharbi F. A. Monitoring of photobleaching in photodynamic therapy using fluorescence spectroscopy [Статья] // *Gulf J Oncolog*. — 2014 r. — 16: T. 1. — стр. 79–83.
19. Shelton M. E., Adamson A. S. Review and Update on Evidence-Based Surgical Treatment Recommendations for Nonmelanoma Skin Cancer [Статья] // *Dermatol Clin*. — Oct 2019 r. — 4: T. 37. — стр. 425–433.
20. Stummer W., Suero Molina E. Fluorescence Imaging/Agents in Tumor Resection. [Статья] // *Neurosurg Clin N Am*. — Oct 2017 r. — 4: T. 28. — стр. 569–583.
21. Tipirneni K. E., Rosenthal E. L., Moore L. S., Haskins A. D., Udayakumar N., Jani A. H., Carroll W. R., Morlandt A. B., Bogyo M., Rao J., Warram J. M. Fluorescence Imaging for Cancer Screening and Surveillance. [Статья] // *Mol Imaging Biol*. — Oct 2017 r. — 5: T. 19. — стр. 645–655.
22. Xiao Q, Chen T, Chen S. Fluorescent contrast agents for tumor surgery. [Журнал] // *Exp Ther Med*. — Sep. 2018 r. — 3: T. 16. — стр. 1577–1585. — doi: 10.3892/etm.2018.6401. .

23. Лощенов В. Б., Линьков Г. К., Савельева Т. А., Лощенов М. В., Модель С. С., Бородкин А. В. Аппаратурное и инструментальное обеспечение флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. [Журнал] // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. — Москва: [б.н.], 2013 г. — № 3. — стр. 17–25.
24. Лысенко С. А. Коррекция флуоресцентных изображений биотканей на эффекты поглощения и рассеяния в них свет [Статья] // Оптика и спектроскопия. — 2018 г. — 120: Т. 125. — стр. 111–120.
25. Филоненко Е. В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия — обоснование применения и возможности в онкологии [Статья] // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. — 2014 г. — 1: Т. 3. — стр. 3–7.
26. Филоненко Е. Ф., Сухин Д. Г., Крылова Г. П., Залевский И. Д., Решетников А. В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия с препаратом радахлорин при базально-клеточном раке кожи // Пособие для врачей. — Москва: ФГБУ "МНИОИ им П. А. Герцена" Минздравсоцразвития России, 2012 г. — стр. 11. — ISBN978–5–85502–144–8.
27. Ярославцева-Исаева Е. В., Каплан М. А., Капинус В. Н., Спиченкова И. С., Сокол Н. И. Флуоресцентная диагностика злокачественных новообразований кожи с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда [Статья] // Biomedical Photonics. — 2018 г. — 1: Т. 7. — стр. 13–20.

© Корчагина Ксения Сергеевна (Ksenija-korchagina@rambler.ru),

Гамаюнов Сергей Викторович (Gamajnovs@mail.ru), Иванов Сергей Анатольевич (oncourolog@gmail.com).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



МРНЦ им А. Ф. Цыба