

На правах рукописи

**Осипова Екатерина Александровна**

**Флуоресцентные методы исследования опухолей век и  
конъюнктивы на основе эндогенных и экзогенных  
флуорофоров**

**14.00.08 – глазные болезни**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва

2009

Диссертационная работа выполнена в Учреждении Российской академии  
медицинских наук научно-исследовательском институте глазных болезней  
РАМН

Научный руководитель: член корр. РАМН, профессор  
доктор медицинских наук Аветисов Сергей Эдуардович

Официальные оппоненты:

профессор, доктор медицинских наук Луцевич Екатерина Эммануиловна  
(Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова);  
доктор медицинских наук Давыдов Дмитрий Викторович  
(НИИ глазных болезней РАМН).

Ведущая организация: ФГУ МНТК «Микрохирургии глаза»  
им. академика С.Н. Федорова.

Защита состоится «14» сентября 2009 г. в 14:00 часов на заседании  
диссертационного совета Д 001.040.01 при НИИ глазных болезней РАМН  
по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д.11А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ глазных  
болезней РАМН.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 200 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Макашова Н.В

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.**

### **Актуальность проблемы.**

Ежегодная заболеваемость опухолями органа зрения составляет 100-120 на 1 млн. населения. Среди первичных опухолей первое место по частоте занимают опухоли придаточного аппарата глаза (от 8.7 до 15 человек на 100 тыс. населения) (Бровкина А. Ф. 2002). В связи с широким распространением опухолей придаточного аппарата глаза актуальным остается вопрос ранней и точной диагностики новообразований указанной локализации.

Диагностика новообразований кожи век и конъюнктивы базируется, в основном, на клинической картине и морфологическом исследовании. Гистологическое исследование краев раны после хирургического удаления базально-клеточного рака у 1039 больных показало, что при узловой и поверхностной формах наблюдалось отсутствие опухолевых клеток по краю разреза соответственно у 93.6 и 96.4% больных. При инфильтративной и мультицентричной формах эти показатели составили соответственно 18.6 и 33.3% (Sexton M. 1990).

В последние годы предпринимаются активные попытки создания неинвазивных оптических методов диагностики злокачественных опухолей, позволяющих, не травмируя объект исследования, получить о нем необходимую достоверную информацию (Bigio I. J. 1997, Wagnieres G. 1998, Hewett J. 2000, Scott M. A. 2000). Флуоресцентная диагностика (ФД) является наиболее перспективной и высоко чувствительной технологией обнаружения опухолей, локализующихся в поверхностных слоях кожи и слизистых оболочках (S. Andersson-Engels 1992). Методика основана на обнаружении эндогенных люминофоров, таких как коллаген, никотинамид аденин динуклеатид, составляющих основную часть спектра аутофлуоресценции в сине-зеленом диапазоне (Chwirot B. W. 1998, Hewett J. 2000), а также порфиринов и экзогенных фотосенсибилизаторов.

В настоящее время разработаны новые методы оптической диагностики, успешно применяемые при опухолях различной локализации: кожи, слизистых оболочек полости рта, пищевода, бронхов, мочевого пузыря и других органов. В литературе есть единичные описания применения этих методов диагностики при опухолях кожи век и конъюнктивы. Вместе с тем не выделены четкие диагностические критерии, не обоснованы основные принципы дифференциальной диагностики.

#### **Цель исследования.**

Изучить возможности использования эндогенных и экзогенных флуорофоров в исследовании опухолей век и конъюнктивы и выработать оптимальный подход к дифференциальной диагностике и определению границ доброкачественных и злокачественных опухолей указанной локализации с использованием флуоресцентных методов анализа.

#### **Задачи исследования.**

1. Отработать методику флуоресцентной спектроскопии и получения флуоресцентных изображений опухолей век и конъюнктивы.
2. Оценить роль спектроскопического исследования 5-АЛК индуцированной флуоресценции протопорфирина IX и флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора «Фотосенс» в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных опухолей век и конъюнктивы.
3. Разработать собственный подход к дифференциальной диагностике и объективному определению границ доброкачественных и злокачественных опухолей век и конъюнктивы на основе флуоресцентных методов исследования без использования экзогенных фотосенсибилизаторов и препаратов, усиливающих аутофлуоресценцию.
4. Сопоставить результаты флуоресцентных методов исследования опухолей век и конъюнктивы с использованием различных

флуорофоров с клиническими диагнозами и гистологическими заключениями.

5. Разработать и внедрить в клиническую работу практические рекомендации по проведения флуоресцентных методов исследования опухолей век и конъюнктивы.

#### **Научная новизна.**

Впервые, с помощью спектроскопии изучены особенности 5- АЛК индуцированной флуоресценции и флуоресценции фотосенсибилизатора «Фотосенс» в коже век и конъюнктиве, а также новообразованиях, локализующихся в этих тканях.

Разработан подход к флуоресцентному исследованию опухолей век и конъюнктивы, основанный на колориметрическом анализе аутофлуоресцентных изображений опухоли. Доказана эффективность его использования в дифференциальной диагностике и определении флуоресцентных границ доброкачественных и злокачественных опухолей век и конъюнктивы.

#### **Практическая значимость работы.**

В результате научного исследования разработана диагностическая методика, основанная на определении концентрации эндогенных люминофоров в ткани опухоли. Стал доступен подсчет интенсивности флуоресценции эндогенного протопорфирина IX без использования препаратов 5-аминолевулиновой кислоты, усиливающих его флуоресценцию; а также, возможность визуализации распределения эндогенного ПП IX в опухоли и в окружающих ее тканях. Разработаны и запатентованы устройство для получения аутофлуоресцентных изображений и программное обеспечение для их обработки, позволяющее реализовать методику на доступной аппаратуре.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Флуоресцентные методы исследования являются надежным, безопасным неинвазивным методом дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей век и конъюнктивы.

2. Анализ аутофлуоресцентных изображений новообразований век и конъюнктивы позволяет проводить дифференциальную диагностику опухолей указанной локализации и определять их флуоресцентные границы без использования экзогенных фотосенсибилизаторов и препаратов, индуцирующих аутофлуоресценцию.

### **Основные положения работы доложены на:**

1. Конференции молодых ученых «Клинические исследования в офтальмологии» г. Москва, Россия, 24 апреля 2006

2. Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» г. Москва, Россия, 24-26 марта 2007 г.

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 2 в печатных изданиях, рецензируемых ВАК. Приоритетность исследований подтверждена одним патентом на изобретение, одним патентом на полезную модель, получено одно положительное решение на выдачу патента.

### **Внедрение результатов работы в практику.**

Разработанные практические рекомендации внедрены в научно-клиническую практику НИИ глазных болезней РАМН и учитываются при проведении флуоресцентных исследований у пациентов с опухолями век и конъюнктивы. На базе НИИ глазных болезней РАМН продолжаются клинические испытания эффективности флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии новообразований кожи век и конъюнктивы с препаратами «Аласенс» и «Фотосенс».

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста и состоит из введения, описания материалов и методов исследований, 3 глав, отражающих результаты собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 50 отечественных и 119 зарубежных источника. Работа иллюстрирована 28 рисунками, 13 графиками, 8 таблицами.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования.**

Работа основана на анализе результатов клинического исследования флуоресцентных методов диагностики опухолей век и конъюнктивы.

Исследование проводилось в трех группах пациентов (всего 128 пациентов в возрасте от 18 до 83 лет ( $56 \pm 16.4$ ). В I группу были включены 30 пациентов, у которых флуоресцентное исследование опухолей проводилось методом локальной лазерной спектроскопии флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора «Фотосенс». Распределение пациентов по гистогенезу опухолей представлено в таблице 1.

Таблица 1.

**Распределение пациентов по гистогенезу опухоли в I группе.**

Вид опухоли		Количество пациентов	
		Абс. число	%
Доброкачественные	Эпителиальные	3	10.0
	Из пигментных клеток	6	20.0
	Из мягких тканей	1	3.3
Предраковые	Эпителиальные	4	13.3
Злокачественные	Эпителиальные	14	46.7
	Опухоли кроветворной ткани	2	6.7

Во II группу были включены 53 пациента с опухолями век и конъюнктивы, у которых флуоресцентное исследование опухолей проводилось методом локальной лазерной спектроскопии флуоресценции эндогенного протопорфирина IX, индуцированного приемом препарата «Аласенс» (5-аминолевулиновой кислоты гидрохлорид) Распределение пациентов по гистогенезу опухоли представлено в таблице 2.

Таблица 2.

**Распределение пациентов по гистогенезу опухоли во II группе.**

Вид опухоли		Количество пациентов	
		Абс. число	%
Доброкачественные	Эпителиальные	6	11.3
	Из пигментных клеток	12	22.6
	Из придатков кожи	3	5.7
	Из мягких тканей	3	5.7
Предраковые	Эпителиальные	6	11.3
	Из пигментных клеток	5	9.4
Злокачественные	Эпителиальные	13	24.5
	Из пигментных клеток	3	5.7
	Опухоли кроветворной ткани	2	3.8

В III группу были включены 48 пациентов, у которых флуоресцентное исследование опухолей проводилось оригинальным методом анализа аутофлуоресцентных изображений, полученных без использования экзогенных фотосенсибилизаторов и препаратов, усиливающих аутофлуоресценцию. Распределение пациентов по гистогенезу опухоли представлено в таблице 3.

**Таблица 3.**

**Распределение пациентов по гистогенезу опухоли в III группе.**

Вид опухоли		Количество пациентов	
		Абс. число	%
Доброкачественные	Эпителиальные	5	10.4
	Из пигментных клеток	11	22.9
	Из придатков кожи	2	4.2
	Из мягких тканей	2	4.2
Предраковые	Эпителиальные	4	8.3
	Из пигментных клеток	3	6.2
Злокачественные	Эпителиальные	16	33.3
	Из пигментных клеток	3	6.2
	Опухоли кроветворной ткани	2	4.2

Учитывая возможность реализации методик флуоресцентного исследования опухолей на основе аутофлуоресценции и 5-АЛК индуцированной флуоресценции протопорфирина IX одновременно у одного пациента без влияния на результаты исследования, 35 пациентов были включены во II и III группы.

**Методы обследования.**

Во всех группах пациентов клиническая диагностика производилась с помощью биомикроскопии опухоли на щелевой лампе. Для документации во всех случаях осуществлялась фоторегистрация новообразований цифровой фотокамерой. Во всех случаях проводили хирургическое удаление или биопсию опухоли. Гистологическое

исследование материала производилось на базе лаборатории патогистологии глаза НИИ глазных болезней РАМН (руководитель к.м.н. Г.Г. Зиангирова) и Отдела патологической анатомии опухолей человека Российского онкологического центра им. Н.Н. Блохина (руководитель профессор д.м.н. Н.Н. Петровичев).

Спектроскопическое исследование флуоресценции проводили с использованием лазерной электронно-спектральной установки ЛЭСА-01-«Биоспек» ГОСТ Р 50460-92 (Регистрационное удостоверение МЗ РФ №29/05020400/0617-00 от 27.07.2000). Для возбуждения флуоресценции применяли гелий-неоновый лазер с длиной волны 632,8 нм и мощностью 25 мВт. Анализ полученных спектров проводили с помощью компьютерной программы LESA-Soft 9. Оценивали следующие показатели флуоресценции:

- фоновую флуоресценцию здоровых тканей глаза (кожи век и конъюнктивы)
- интенсивность флуоресценции опухоли,
- индекс контрастности флуоресценции в ткани опухоли, равный отношению интенсивности флуоресценции в ткани опухоли кожи век или конъюнктивы к интенсивности флуоресценции непораженной кожи век или конъюнктивы.
- динамика прироста флуоресценции в ткани опухоли.

Методом спектрометрии исследовали флуоресценцию в опухоли экзогенного фотосенсибилизатора «Фотосенс» и индуцированную приемом препарата 5-аминолевулиной кислоты «Аласенс» флуоресценцию эндогенного протопорфирина IX.

Препарат «Фотосенс» представляет собой раствор смеси натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия (от ди- до тетразамещенного) в дистиллированной воде. Доза введения препарата 0.2 мг/кг массы тела. Каждые сутки, в течение первой недели после введения препарата, спектроскопически определяли интенсивность его

флуоресценции в коже век, конъюнктиве и в ткани опухоли. Затем, спектроскопию проводили на 10, 14, 20 и 30 день.

Введение препарата «Фотосенс» производилось с целью проведения курса фотодинамической терапии опухолей в рамках проспективного контролируемого открытого исследования эффективности фотодинамической терапии препаратом «Фотосенс» онкологических заболеваний глаз согласно протоколу № ОФТ-4 ОНК-ФС-2003. Клинические исследования проводили с разрешения Комитета по этике при Федеральном органе контроля качества и Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Министерства здравоохранения и социального развития РФ.

Для индукции флуоресценции эндогенного протопорфирина IX использовали препарат «Аласенс». Аласенс представляет собой стандартную субстанцию 5-аминолевулиновой кислоты, производства ФГУП «ГНЦ НИОПИК» (Рег. № 000148/01-2000 от 09.12.2000). Препарат давали перорально из расчета 15 мг/кг веса больного, растворяя его в обычной воде. Через каждый час после введения «Аласенса» в течение 3 часов проводили спектроскопию.

Введение препарата «Аласенс» производилось в рамках клинического испытания эффективности флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с препаратом «Аласенс», проведение которого было разрешено Локальным комитетом по биомедицинской этике Учреждения Российской академии медицинских наук НИИ глазных болезней РАМН (протокол №4 от 10.04.2008).

В процессе проведения работы был разработан оригинальный подход к флуоресцентному исследованию опухолей век и конъюнктивы на основе анализа аутофлуоресцентных изображений опухоли, полученных без использования экзогенных фотосенсибилизаторов и препаратов, усиливающих аутофлуоресценцию. Для реализации этого подхода было

разработано устройство для получения флуоресцентных изображений (Патент № 64783 от 10.07.07.) и программное обеспечение для их обработки (CancerPlot, регистрационный № 4859). Аутофлуоресцентные изображения новообразований получали путем фотографирования зоны интереса цифровой фотокамерой с цветной (RGB) матрицей при возбуждении флуоресценции светом с длиной волн 390-433 нм. После обработки цифрового изображения флуоресценции опухоли вычисляли превышение аутофлуоресценции протопорфирина IX по формуле:

$$R_{diff} = ((R_{tum} - R_{norm}) / R_{norm}) * 100\%, \text{ где}$$

$R_{diff}$  - коэффициент колориметрического отхода по красному каналу,  $R_{tum}$  - доля участия красного канала в изображении опухоли,  $R_{norm}$  - доля участия красного канала в изображении здоровой кожи век или конъюнктивы.

Оценка результатов исследования производилась путем сопоставления результатов спектроскопии и анализа аутофлуоресцентных изображений опухоли с данными гистологического исследования удаленного новообразования или биопсии. При этом определялись чувствительность и специфичность методик. Для статистической обработки результатов исследований проводили расчеты среднего арифметического, среднего квадратического отклонения, средней ошибки средней арифметической величины, медианы и квартилей (для ассиметрично распределенных массивов данных), критерия достоверности и коэффициента корреляции массивов двух величин. Расчет производился с помощью персонального компьютера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

**Результаты флуоресцентного исследования опухолей век и конъюнктивы с использованием метода локальной лазерной спектроскопии флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора «Фотосенс».**

Сопоставление графических кривых, демонстрирующих кинетику выгорания «Фотосенса», введенного в дозе 0.2 мг/кг массы тела, в различные сроки проведения спектроскопии, наглядно показывало скорость выгорания фотосенсибилизатора из кожи век и конъюнктивы. Максимальная концентрация препарата наблюдалась через сутки после его введения, характеризовалась высокой дисперсией значений в пределах одной ткани и составила  $184.8 \pm 103.1$  ед. для конъюнктивы свода,  $137,5 \pm 65.0$  ед. для кожи век и  $78,3 \pm 44.9$  ед. для бульбарной конъюнктивы. В последующем, в течение месяца наблюдалось постепенное снижение уровня флуоресценции. Бульбарная конъюнктура характеризовалась большей скоростью выгорания ФС на фоне низких значений интенсивности его флуоресценции. К 20-м суткам в анализируемых тканях отмечалось снижение интенсивности флуоресценции препарата ниже значения средней терапевтической концентрации  $C_2$ , равной  $4,0 \times 10^{-4}$  мг/мл, а, следовательно, и уменьшался риск развития фототоксических реакций. Тем не менее, необходимость тщательного соблюдения охранного светового режима сохранялась в течение первого месяца с момента введения препарата. Таким образом, введение препарата «Фотосенс» в дозе 0.2 мг/кг массы тела на протяжении 20 дней обеспечивает высокую концентрацию фотосенсибилизатора «Фотосенс» в коже век и конъюнктиве, превышающую значения средней терапевтической концентрации.

Анализ спектроскопических показателей флуоресцентного исследования базально-клеточного рака показал, что максимальная

интенсивность флуоресценции Фотосенса в опухоли наблюдается через сутки после введения препарата. Благодаря меньшей скорости выгорания ФС из ткани БКР, по сравнению с кожей век, к 3 суткам с момента введения препарата достигается высокий флуоресцентный контраст опухоли. Так, если через сутки после введения препарата ИК в среднем был равен 1.6, то на третьи сутки он достиг значения в 2.5 ед.

Полученные данные по флуоресцентной диагностике беспигментных опухолей эпителиального генеза с препаратом «Фотосенс» свидетельствуют о том, что этот метод флуоресцентного исследования может быть пригоден в дифференциальной диагностике доброкачественных от злокачественных опухолей, а также в выявлении предзлокачественных фоновых состояний ( $p < 0.01$ ). Однако, длительная персистенция препарата в коже, приводящая к высокому риску фототоксических реакций, ограничивает применение «Фотосенса» для диагностики опухолей. Поэтому основная роль локальной лазерной спектроскопии при применении данного ФС заключается в контроле уровня накопления в тканях, а также определении сроков и условий проведения сеанса ФДТ.

**Результаты исследования динамики и особенностей накопления 5-АЛК индуцированного эндогенного протопорфирина IX в коже век, конъюнктиве и слезном мясе.**

Значения интенсивности 5-АЛК индуцированной флуоресценции в разных тканях представлены в таблице 4.

**Таблица 4.**

Показатели интенсивности 5-АЛК индуцированной флуоресценции протопорфирина IX в различных тканях на протяжении 3 часов исследования.

Ткани	Показатели интенсивности 5-АЛК индуцированной флуоресценции		
	60 мин (Me;25%-75%)	120 мин (Me;25%-75%)	180 мин (Me;25%-75%)
Кожа руки	2.5 (1-4.4)	3.6 (1.7-6.9)	8.5 (6.3-10.5)
Слизистая губы	10.6 (5.3-17.4)	20.8 (11.9-37.9)	56.3 (45.7-67.2)
Кожа век	3.7 (2.5-5.7)	9 (4.6-14.8)	11.2 (10.4-16.5)
Бульбарная конъюнктура	1.1 (0.5-2.7)	2.4 (0.9-4.5)	5.6 (3.2-7.4)
Конъюнктура свода	9.2 (5.6-5.2)	19.6 (11.6-35.7)	27.6 (23.7-42.3)
Слезное мяско	9.4 (6.4-6.9)	21.2 (14.3-42.6)	54.6 (38.5-67.5)

По данным интенсивности 5-АЛК индуцированной флуоресценции протопорфирин IX были выделены две группы тканей с высоким и низким уровнем флуоресценции ПП IX. К группе тканей с низкими значениями флуоресценции ПП IX относилась кожа руки, кожа век и бульбарная конъюнктура, а к группе с высоким уровнем флуоресценции - слизистая губы, конъюнктура свода и мяско. С возрастанием времени с момента введения препарата отмечается увеличение разрыва между этими группами. Это можно объяснить более интенсивным накоплением протопорфирина IX в тканях второй группы. Низкие значения флуоресценции в бульбарной конъюнктиве объясняются не столько отсутствием влияния Аласенса на накопления ПП IX в этой ткани, сколько незначительной толщиной и прозрачностью конъюнктивы глазного яблока, а, следовательно, и увеличением в суммарном спектре доли отраженного с поверхности склеры лазерного излучения.

**Результаты флуоресцентного исследования опухолей век и конъюнктивы с использованием метода локальной лазерной спектроскопии 5-АЛК индуцированной флуоресценции протопорфирина IX.**

Был проведен анализ динамики накопления 5-АЛК индуцированного протопорфирина IX в ткани злокачественных,

доброкачественных и предраковых опухолей кожи век. Установлено, что на протяжении всего исследования 5-АЛК индуцированная флуоресценция ПП IX во всех трех группах опухолей превышала фоновую флуоресценцию кожи век. При этом через 60 минут после введения препарата уровни флуоресценции ПП IX в ткани злокачественных, доброкачественных опухолей практически не отличались и колебались в пределах 7-9 ед. со значением индекса контрастности 2-2.5 ед. На 120 минуте после введения Аласенса отмечено резкое увеличение уровня флуоресценции в ткани новообразований кожи век. Эта динамика наблюдалась во всех трех группах опухолей. В группе злокачественных и предраковых опухолей интенсивность флуоресценции в интервале с 60 до 120 мин. исследования увеличилась на 173%, в доброкачественных - на 74%. Тогда же наблюдались максимальные значения индекса контрастности: в группе злокачественных и предраковых опухолей-3.4, в группе доброкачественных опухолей-2.0. В последующие 60 мин. исследования уровень флуоресценции ПП IX в ткани злокачественных и предраковых опухолей существенно не изменялся, а в группе доброкачественных опухолей уменьшился на 40%.

Кроме абсолютных значений флуоресценции 5-АЛК индуцированного ПП IX определяли индекс контрастности флуоресценции опухоли, отражающий превышение концентрации флуорофора в ткани опухоли по сравнению с окружающими условно здоровыми тканями. В таблице 5 представлены значения индекса контрастности 5-АЛК индуцированной флуоресценции в опухолевых заболеваниях век и конъюнктивы в различные сроки с момента перорального введения препарата «Аласенс» (доза 15 мг/кг).

**Таблица 5.**

Индекс контрастности 5-АЛК индуцированной флуоресценции в опухолевых и псевдоопухолевых заболеваниях кожи.

Характер новообразования	Индекс контрастности 5-АЛК индуцированной флуоресценции ПП IX в новообразовании (ед.).		
	60 мин (Me;25%-75%)	120 мин (Me;25%-75%)	180 мин (Me;25%-75%)
ЗО* кожи век	2.3 (1.3-5.7)	3.0 (1.5-3.9)	3.5 (2.3-5.8)
ДО* кожи век	2.2 (1.7-2.8)	1.9 (0.7-2.9)	1.4 (0.6-2.4)
ЗО* конъюнктивы	0.9 (0.3-1.2)	0.8 (0.5-1.2)	2.1 (0.8-2.6)
ДО* конъюнктивы	3.9 (3.2- 6.3)	4.6 (4.1-9.0)	2.0 (0.7- 3.3)

\*ЗО-злокачественные опухоли, ДО-доброкачественные опухоли.

Установлено, что при проведении спектрометрии с использованием препарата «Аласенс» (15 мг/кг массы тела) у пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями кожи век диагностически значимые результаты можно получить на 3 час после введения препарата (вероятность отсутствия различий (p) менее 0.01). В случае дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных опухолей век чувствительность методики составила 76%, специфичность-48%, общая точность-62%.

В группе злокачественных опухолей конъюнктивы наблюдались пациенты с меланомами и МАЛТ лимфомой конъюнктивы. В процессе исследования были выявлены такие спектроскопические особенности этих опухолей, как высокая поглощающая способность и спектроскопическая неоднородность, что затрудняло их дифференциальную диагностику с другими опухолевыми заболеваниями конъюнктивы.

Была выявлена высокая чувствительность метода локальной лазерной спектроскопии 5-АЛК индуцированной флуоресценции протопорфирина IX в связи с влиянием на суммарный спектр флуоресценции таких эндогенных флуорофоров, как кератин,

меланин и коллаген. В связи с этим, было отмечено, что при проведении спектроскопии 5-АЛК индуцированной флуоресценции новообразований кожи век, сопровождающихся гиперкератозом, следует обращать внимание на форму регистрируемого спектра, так как вместо информации о флуоресценции протопорфирина IX можно получить данные о флуоресценции кератина, что приведет к высокой вероятности ложных результатов. Также было выявлено, что при локализации новообразований в бульбарной конъюнктиве, значительный вклад в результаты спектроскопии вносит флуоресценция коллагена склеры и отражение с ее поверхности, что в свою очередь оказывает влияние на результаты исследования.

В процессе исследования пациентов I и II групп были получены следующие ограничения применения методики локальной лазерной спектроскопии флуоресценции экзогенных фотосенсибилизаторов и 5-АЛК индуцированной флуоресценции опухолей век и конъюнктивы.

1. Локальность полученных данных не позволяла получать представление о плоскостном распределении протопорфирина IX в опухоли и окружающей ткани.
2. Влияние на спектр флуоресценции таких люминофоров как меланин, кератин и коллаген изменяло форму и амплитуду спектра, искажая результаты диагностики.
3. Побочным эффектом применения 5-аминолевулиновой кислоты и препарата «Фотосенс» является фототоксичность, длящаяся от 1 до 30 суток в зависимости от применяемого препарата.

Методом, позволяющим избежать вышеперечисленных недостатков, является колориметрический анализ флуоресцентных изображений опухоли, полученных без использования экзогенных фотосенсибилизаторов и препаратов, усиливающих аутофлуоресценцию. Именно этот метод лег в основу

флуоресцентного исследования опухолей век и конъюнктивы в II группе пациентов.

**Результаты анализа интенсивности и особенностей флуоресценции эндогенного протопорфирина IX на флуоресцентных изображениях новообразований кожи век и конъюнктивы, полученных без применения препаратов 5-аминолевулиновой кислоты.**

При анализе превышения аутофлуоресценции протопорфирина IX на флуоресцентных изображениях опухолей век и конъюнктивы были получены следующие данные. В группе пациентов с доброкачественными опухолями кожи век наблюдался отрицательный прирост интенсивности флуоресценции ПП IX в интрадермальных невусах ( $-4.3 \pm 9.1\%$ ), плоскоклеточных кератопапилломах ( $-3.8 \pm 4.6\%$ ), гемангиоме ( $-7.9\%$ ) и кистах сальных и потовых желез ( $-7.6\%$ ,  $-9.4$ ). Исключением в данной группе были пигментированные интрадермальные невусы кожи век, характеризующиеся высоким положительным превышением интенсивности красного канала на флуоресцентных изображениях ( $+19.0 \pm 7.6\%$ ). Это явление связано не столько с флуоресценцией ПП IX, сколько с вкладом в аутофлуоресценцию невуса спектров пропускания меланина, т. к. отмечалась прямая зависимость между степенью пигментации опухоли и ее флуоресценцией в красном канале изображений.

В группе предраковых и злокачественных новообразований кожи век во всех случаях отмечалось высокое положительное превышение интенсивности аутофлуоресценции ПП IX в опухоли. У пациентов с кожным рогом оно составило  $+9.1\%$  и  $+11.0\%$ , с актиническим кератозом-  $+13.4\%$  и  $+17,6\%$  и у пациентов с БКР -  $+21 \pm 12.7\%$ . Такой уровень аутофлуоресценции ПП IX в опухолях

свидетельствует о высокой активности пролиферативного процесса в их клетках.

В группе пациентов с опухолевыми заболеваниями конъюнктивы отрицательные и слабо положительные значения превышения интенсивности флуоресценции ПП IX в очагах наблюдалось у пациентов с плоскоклеточной папилломой (-6.0% и -3.95), стационарными невусами (+0.8% и -1.6%), MALT лимфомой конъюнктивы сводов (-5.7% и -13.8%). Наиболее высокие значения уровня флуоресценции ПП IX были получены при таких злокачественных и предраковых опухолях, как меланома (от 33.0% до 84.9%) и карцинома *in situ* (+46.1%).

Превышение интенсивности аутофлуоресценции протопорфирина IX на флуоресцентных изображениях пигментных опухолей конъюнктивы также напрямую зависела от плотности пигментации в ткани опухоли. При меланомах отмечался высокий уровень флуоресценции ПП IX по краю новообразования, формирующий зону инвазивного роста опухоли.

При проведении дифференциального анализа получено статистически достоверное различие ( $p < 0.01$ ) средних значений превышения интенсивности флуоресценции эндогенного протопорфирина IX для доброкачественных и злокачественных опухолей кожи век, доброкачественных и злокачественных пигментных опухолей конъюнктивы.

Чувствительность (Se) оригинальной методики аутофлуоресцентной диагностики злокачественных опухолей кожи век составила 0.8, Специфичность метода равна 1.0. Общая точность (по формуле Ликкена)-0.85. Для пигментных опухолей конъюнктивы чувствительность метода составила 0,95, специфичность -1.0 и общая точность - 0.97.

При определении флуоресцентных границ опухолей век и конъюнктивы были получены следующие данные. При узловых формах базально-клеточного рака, характеризующихся преимущественно экзофитным характером роста, флуоресцентные границы опухоли соответствовали визуальным.. При эндофитном росте опухоли, наблюдающемся при язвенной и инфильтративной формах, а также при поверхностной форме БКР, флуоресцентные границы в среднем на 10,6% превышали видимые границы, что свидетельствовало о наличии зоны скрытого роста (инвазии) при вышеперечисленных формах базально-клеточного рака. При этом во всех случаях удаление опухоли производилось с ориентацией на флуоресцентные границы. По данным гистологического заключения в 100% случаев опухоли были удалены в пределах здоровых тканей.

### **ВЫВОДЫ.**

1. Впервые на достаточном клиническом материале (128 пациентов) изучены различные флуоресцентные методы исследования опухолей век и конъюнктивы, включающие в себя локальную лазерную спектроскопию флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора «Фотосенс» и флуоресценции, индуцированной приемом 5-аминолевулиновой кислоты, а также анализ аутофлуоресцентных изображений опухоли.

2. У 30 пациентов были выявлены особенности флуоресценции экзогенного фотосенсибилизатора «Фотосенс» в коже век, конъюнктиве и новообразованиях, локализующихся в этих тканях, а также статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) в уровнях флуоресценции фотосенсибилизатора в доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолях кожи век.

3. У 98-и пациентов с опухолями кожи век и конъюнктивы произведен сравнительный анализ результатов флуоресцентной

диагностики, основанной на аутофлуоресценции и 5-АЛК индуцированной флуоресценции опухоли.

4. При спектроскопическом анализе 5-АЛК индуцированной флуоресценции протопорфирина IX выявлены статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) в результатах флуоресцентной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей кожи век. Определена чувствительность методики, которая составила 76%.

5. Разработан собственный подход к флуоресцентному исследованию опухолей век и конъюнктивы, позволяющий осуществлять подсчет интенсивности аутофлуоресценции протопорфирина IX с построением карты его распределения на флуоресцентных изображениях опухоли и окружающих ее тканей без использования препаратов 5-аминолевулиновой кислоты.

6. При сопоставлении результатов колориметрического анализа аутофлуоресцентных изображений злокачественных и доброкачественных опухолей кожи век и конъюнктивы с данными их гистологического исследования выявлена высокая чувствительность разработанной методики, равная 80% для опухолей кожи век и 95% для пигментных опухолей конъюнктивы.

7. При колориметрическом анализе флуоресцентных изображений злокачественных опухолей кожи век было выявлено расширение флуоресцентных границ опухоли по сравнению с визуальными в среднем на 10,6% для следующих форм базально-клеточного рака: поверхностной мультицентричной, язвенной и инфильтративной; для узловых форм базально-клеточного рака кожи век флуоресцентные границы опухоли совпадали с визуальными.

8. Доказано предпочтительное использование методики колориметрического анализа аутофлуоресцентных изображений при проведении дифференциальной диагностики опухолей кожи век и

конъюнктивы, что объясняется ее более высокой чувствительностью, возможностью визуализации флуоресцентных границ опухоли и отсутствием необходимости медикаментозной нагрузки на пациента.

### **Практические рекомендации.**

1. При проведении дифференциальной диагностики между доброкачественными и злокачественными опухолями кожи век и конъюнктивы целесообразно использовать флуоресцентные изображения опухоли и окружающих тканей, полученные без применения препаратов 5-АЛК и экзогенных фотосенсибилизаторов.

2. Для обработки полученных аутофлуоресцентных изображений рекомендуется использовать оригинальное программное обеспечение CancerPlot, позволяющее осуществлять подсчет и получать карту распределения интенсивности флуоресценции ПП IX в опухоли и окружающих тканях.

3. Использование препарата 5-аминолевулиновой кислоты «Аласенс» и экзогенного фотосенсибилизатора «Фотосенс» целесообразно в случае совмещения флуоресцентной диагностики с сеансом ФДТ для спектроскопического определения уровня накопления фотосенсибилизатора в опухоли и окружающих тканях.

### **Перечень сокращений.**

5-АЛК	– 5-аминолевулиновая кислота
БКР	- базально-клеточный рак
ПП IX	-протопорфирин IX
ФД	– флуоресцентная диагностика
ФДТ	– фотодинамическая терапия
ФС	- фотосенсибилизатор

### **Список работ опубликованных по теме диссертации.**

1. В.Г. Лихванцева, Е.А. Осипова «Флуоресцентная диагностика: прошлое, настоящее и перспективы развития в офтальмологии». Обзор литературы. Вестник офтальмологии №1 2007.
2. Лихванцева В. Г., Осипова Е. А., Петренко М. А., Мерзлякова О. Ю., Кузьмин С. Г., Ворожцов Г. Н. «Анализ динамики накопления, кинетики выведения и характера распределения фотосенсибилизирующего препарата Фотосенса в тканях глаза и век в норме и при некоторых опухолевых процессах». Вестник офтальмологии №1 2008.
3. Лихванцева В. Г., Осипова Е. А., Новиков И. А. «Дифференциальный спектральный анализ в диагностике новообразований кожи век». В сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва 24-26 марта 2007 г
4. В.Г. Лихванцева, И.А. Новиков, Е.А. Осипова. «Изучение спектральной составляющей аутофлуоресценции кожи и слизистых оболочек в норме и патологии». В сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва 24-26 марта 2007 г.
5. Likhvantseva V., Osipova E., Petrenko M., Kuzmin S., Vorozhtsov G. «Photodynamic therapy in the treatment of eyelid basal cell carcinoma.» Abstracts, 6 World Congress of the World Association of Laser Therapy (WALT), Cyprus, October 25-28, 2006.
6. Likhvantseva V., Novikov I., Osipova E., Kuzmin S., Vorozhtsov G. «Differential spectral analysis in diagnosis of eyelids skin tumors». Abstracts, 11th World Congress of the International Photodynamic Association, Shanghai, China March 28-31, 2007
7. Likhvantseva V., Osipova E., Novikov I., Loschenov V. ,Kuzmin S.. «Study of spectral component of dermal autofluorescence in norm and pathology». Abstracts, в сборник тезисов, 11th World Congress of the International Photodynamic Association, Shanghai, China March 28-31, 2007
8. Likhvantseva V., Osipova E., Novikov I., Loschenov V. ,Kuzmin S.. «Photodynamic (PD) effect of laser radiation ( $\lambda_{ext}$  632.8 nm, E 100 mW) in the course of fluorescent diagnosis with 5-aminolaevulinic acid (ALA) at patients with the diagnosis of a granuloma of a conjunctiva». Abstracts «European Conference on Biomedical Optics» 17-21 June 2007, Munich, Germany.
9. S. Avetisov, E. Osipova, I. Novikov, V. Loschenov, S. Kuzmin. «Visualization of eyelids and conjunctiva tumors by fluorescence diagnosis using 5-amynolevulinic acid» Abstract. Photodiagnosis and photodynamic therapy. Vol. 5, March 2008.
10. S. Avetisov, E. Osipova, I. Novikov, V. Loschenov, S. Kuzmin. «Visualization of eyelids and conjunctiva tumors by fluorescence diagnosis using 5-amynolevulinic acid» Presentation. EPPM-1, 24-27th March 2008, Dubrovnik.

### **Список изобретений по теме диссертации.**

1. Свидетельство на изобретение «Способ дифференциальной диагностики новообразований кожи век». Авторы: Лихванцева В. Г., Осипова Е. А., Кузьмин С. Г., Лощенов В. Б. Патент № 2350262 от 27.03.09.
2. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ «КанцерПлот» Авторы: Новиков И. А., Лихванцева В.Г., Осипова Е. А. рег. № 4859 от 14.09.07
3. Свидетельство о регистрации полезной модели «Устройство для флуоресцентной диагностики новообразований кожи и слизистых оболочек». Авторы: Новиков И. А., Лихванцева В.Г., Осипова Е. А. Патент №64783 от 10.07.07
4. Подана заявка на регистрацию изобретения «Способ определения относительного содержания протопорфирина IX в биологических тканях». Авторы: Новиков И. А., Лихванцева В.Г., Осипова Е. А. № заявки 2008110454 от 20.03.08. Положительное решение от 21.01.09

### **Доклады**

Е. А. Осипова «Флуоресцентная диагностика опухолей век на основе 5-аминолевулиновой кислоты». Конференция молодых ученых «Клинические исследования в офтальмологии» г. Москва, Россия, 24 апреля 2006

В качестве содокладчика:

1. В.Г. Лихванцева, И.А. Новиков, Е.А. Осипова. «Изучение спектральной составляющей аутофлуоресценции кожи и слизистых оболочек в норме и патологии». Всероссийская научно-практическая конференция «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва 24-26 марта 2007 г.