

В печать. 14.05.2013



*В. [Signature]*

На правах рукописи

Горайнов Сергей Алексеевич

*[Signature]*

**ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И  
ЛАЗЕРНАЯ БИОСПЕКТРОСКОПИЯ В ХИРУРГИИ ГЛИОМ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

14.01.18 – нейрохирургия

*[Signature]*

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

МОСКВА - 2013

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте нейрохирургии имени  
акад. Н. Н. Бурденко РАМН

**Научный руководитель:**  
Академик РАН и РАМН,  
доктор медицинских наук, профессор

**Потапов Александр Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Древаль Олег Николаевич**  
Доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий кафедрой нейрохирургии  
Российской Медицинской Академии  
последипломного образования Минздрава РФ

**Бекашев Али Хасьянович**  
Доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий нейрохирургическим  
(онкологическим) отделением  
ФГБУ «Российский онкологический научный центр  
им. Н.Н. Блохина» РАМН

**Ведущее учреждение:**  
ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН

Защита состоится «25» июня 2013 года в 13:00 часов на заседании диссертационного  
совета Д 001.025.01 Научно-исследовательского института нейрохирургии имени  
акад. Н. Н. Бурденко РАМН по адресу: 125047, г. Москва, ул. 4-ая Тверская-Ямская,  
д. 16.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Научно-  
исследовательского института нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко РАМН и на  
сайте Института: [www.nsi.ru](http://www.nsi.ru)

Автореферат разослан «        » мая 2013г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 001.025.01,  
доктор медицинских наук, профессор

Черехаев Василий Алексеевич

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Первичные опухоли центральной нервной системы составляют около 2% от всех опухолей и занимают четвертое место в структуре смертности среди мужчин от 15 до 54 лет и женщин от 15 до 34 лет в рамках онкопатологии [Кобяков Г. Л., 2011]. Заболеваемость первичными доброкачественными и злокачественными опухолями головного мозга составляет в среднем 10,9-12,8 на 100 тыс. населения и характеризуется тенденцией к постоянному росту [Зозуля Ю.А. и соавт., 2007; Коновалов А.Н. и соавт., 2012]. В целом, около 70% первичных опухолей головного мозга представлены различными глиомами, из них 55-60% являются злокачественными [Bondy M. et al., 2008].

Несмотря на современное техническое оснащение операционных и улучшение хирургической техники, отдаленные результаты лечения пациентов с внутримозговыми опухолями остаются неудовлетворительными. Так, средняя продолжительность жизни таких пациентов после операции на фоне химио- и лучевой терапии составляет в среднем для мультиформной глиобластомы и анапластической астроцитомы 14 и 25 месяцев соответственно [Никифоров Б.М., Мацко Д.Е., 2003]. Несмотря на очевидный прогресс в понимании механизмов возникновения и прогрессии злокачественных глиом, а также внедрение множества новых методов лечения, за последние 30 лет средняя продолжительность жизни больных увеличилась всего лишь на 2–3 мес. [Liu C. et al., 2011].

Лечение злокачественных глиом в настоящий момент комбинированное и включает в себя микрохирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию [Голанов А. В., 1992; Лошаков В.А. и соавт., 2010; Олюшин В.Е., 2005; Кобяков Г. Л., 2011]. Основной задачей хирургического лечения внутримозговых опухолей является удаление опухолевой ткани (циторедукция) с минимальным повреждением мозга и установление гистологического диагноза. От степени травматизации мозговой ткани зависит послеоперационный неврологический дефицит и качество жизни пациента, а от степени удаления опухоли – длительность безрецидивного периода. Основным ограничением в нейрохирургии глиом является недостаточная визуализация границ опухоли. Увеличение объема удаления достоверно коррелирует с продолжительностью жизни [Allahdini F. et al., 2010]. Максимальная радикальность оперативного вмешательства с учетом физиологической дозволенности приводит к одномоментной элиминации большого количества жизнеспособных опухолевых клеток, в том числе и резистентных к терапии, уменьшает внутричерепную гипертензию и может способствовать улучшению нарушенных неврологических функций [Малкаров М. С., Древаль О.Н. и соавт., 2010].

Рекомендации по проведению операций при глиомах головного мозга включают максимальную резекцию опухоли с минимальным риском функциональных осложнений с обязательным использованием микрохирургической техники и интраоперационной оптики. При наличии показаний в ходе оперативного вмешательства могут быть использованы нейронавигационные системы и нейрофизиологический мониторинг [Коновалов А.Н. и соавт., 2006, 2012; Кривошапкин А.Л. и соавт., 2006]. Особую сложность представляет определение

границ первичных внутримозговых опухолей, что обусловлено особенностями их инфильтративного роста вдоль миелинизированных нервных волокон и сосудов, приводящими к высокой частоте послеоперационных рецидивов.

Надежная информация относительно объема резецированной опухоли может быть получена путем интраоперационной визуализации. Решение этой проблемы реализуется, в основном, с помощью интраоперационной компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии, УЗ-сканирования и трехмерной безрамной ультразвуковой нейронавигации, нейронавигационных систем и различных комбинаций этих методов [Black P. et al., 1997; Кривошапкин А.Л. и соавт., 2002; Кривошапкин А.Л. и соавт., 2006; Парфенов В.Е. и соавт., 2004; Лошаков В. А. и соавт., 2010; Fahlbusch R. et al., 2000]. Полное удаление злокачественных внутримозговых опухолей практически невозможно в силу инфильтративного характера роста и поражения функционально важных зон мозга, что может привести к выраженному неврологическому дефициту после операции [Leighton C. и соавт., 1997]. Для его минимизации при удалении глиом в функционально значимых зонах головного мозга используются методы расширенного предоперационного планирования: МР 3D-венография конвекситальных вен, используемых в качестве ориентиров при подходе к глубинно расположенных опухолям, функциональная МРТ с идентификацией моторных и речевых зон, МР-трактография; методики интраоперационного электрофизиологического контроля (выявление сенсорной, моторной коры, пирамидных путей, речевых зон); интраоперационные вызванные потенциалы и ряд других методик [Лошаков В. А. и соавт., 2002; Gasco J. et al., 2009; Yordanova Y. N. et al., 2011; Жуков В. Ю., 2010; Feigl G. C. et al., 2010].

С учетом того, что возможности использования в операционной МРТ ограничены, а интраоперационное ультразвуковое исследование не позволяет получить информацию о метаболических параметрах опухоли, актуальными представляются разработка и совершенствование интраоперационной оптической нейровизуализации и методов оптической спектроскопии [Valdes P. et al., 2011]. Особую сложность представляют повторные микрохирургические вмешательства и вмешательства после лучевой терапии при рецидивирующих глиомах головного мозга, где значительно затруднено определение границ опухоли [Kostron H. et al., 2011].

Таким образом, в настоящее время остается весьма актуальным вопрос поиска и совершенствования новых методов интраоперационной навигации в нейроонкологии, одним из которых является метаболическая флуоресцентная диагностика с использованием 5-аминолевуленовой кислоты (5-АЛК) [Stummer W. et al., 1998; Stummer W., Novotny A. et al., 2000; Stummer W. et al., 2007; Potapov A.A. et al., 2008; Коновалов А.Н. и соавт., 2012]. В мировой литературе существуют единичные работы по использованию интраоперационной флуоресцентной диагностики и количественной лазерной спектроскопии в хирургии глиом головного мозга различной степени злокачественности. Остаются малоизученными вопросы применения метода в хирургии глиом низкой степени злокачественности, а также качественной оценки видимой флуоресценции в зависимости от различных пред- и интраоперационных факторов. Отсутствуют данные о сравнительной эффективности метода флуоресцентной диагностики и лазерной спектроскопии у

пациентов с глиомами головного мозга различной гистологической природы. В мировой литературе представлены единичные работы по использованию комбинированного спектрального анализа в хирургии глиальных опухолей, включающего в себя определение пиков протопорфирина IX, изучение оксигенации тканей и светорассеивающих свойств различных тканей в операционной ране.

### **Цель исследования**

Изучить флуоресцентные и биоспектральные характеристики глиом различной гистологической природы и усовершенствовать методику интраоперационной метаболической навигации в хирургии глиальных опухолей головного мозга.

### **Задачи исследования**

1. Оценить безопасность метода интраоперационной флуоресцентной диагностики с использованием отечественного препарата 5 - аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) «Аласенс» у пациентов с глиомами головного мозга разной степени злокачественности.
2. Провести сравнительный анализ эффективности (чувствительности и специфичности) видимой флуоресценции и данных лазерной спектроскопии у пациентов с глиомами головного мозга, в том числе при опухолях с продолженным ростом.
3. Выявить различные предоперационные и интраоперационные факторы, влияющие на флуоресцентный эффект у пациентов с глиомами головного мозга.
4. С помощью метода лазерной спектроскопии провести сравнительный количественный анализ накопления 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX в глиомах разной степени злокачественности, а также в различных участках глиобластом (зона некроза, солидная часть опухоли, инфильтративная зона) в сопоставлении с интактным мозгом.
5. Оценить возможности использования комбинированной спектроскопии в хирургии различных глиальных опухолей головного мозга с одномоментным исследованием показателей накопления 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX, светорассеяния, оксигенации и кровенаполнения.

### **Научная новизна**

Впервые уточнены эффективность и безопасность использования метода интраоперационной флуоресцентной диагностики и лазерной спектроскопии в хирургии глиом головного мозга Grade I-II различной гистологической природы. Описаны различные пред- и интраоперационные факторы, влияющие/не влияющие на возникновение и оценку флуоресцентного эффекта в хирургии глиом головного мозга различного морфологического строения. Проведена сравнительная количественная оценка накопления протопорфирина IX в глиомах разной степени злокачественности, а также в различных участках глиобластом (зона некроза, солидная часть опухоли, инфильтративная зона) в сопоставлении с данными множественных биопсий. Показана эффективность применения интраоперационной комбинированной спектроскопии в хирургии глиом головного мозга различной степени злокачественности с опциями одновременного измерения светорассеяния,

оксигенации, кровенаполнения тканей на отечественном спектроанализаторе ЛЭСА-01-БИОСПЕК. В эксперименте показана возможность индукции флуоресцентного эффекта с помощью туморотропных антител (к коннексину-43), конъюгированных с различными флуоресцентными метками, а также индукция флуоресцентного эффекта при длительной (24 часа) инкубации клеток нефлуоресцирующей глиомы, полученной от пациента, с 5-АЛК в культуре.

### **Практическая значимость**

Данное исследование подтвердило безопасность и эффективность интраоперационной флуоресцентной диагностики и биоспектроскопии в хирургии глиальных опухолей головного мозга разной степени злокачественности, а также глиом с продолжены ростом, что позволило получить регистрацию отечественного препарата «Аласенс» (регистрационный номер ЛП-001848 от 21.09.12г). Практические рекомендации по использованию отечественного препарата «Аласенс» и лазерной биоспектроскопии расширяют возможности интраоперационной навигации как одного из компонентов высокотехнологической медицинской помощи (ВМП), так как флуоресцентная диагностика включена в стандарт ВМП по нейрохирургии (Приказ Министерства здравоохранения РФ № 931н от 15.11.2012г) и в Стандарты, опции и рекомендации в лечении первичных опухолей ЦНС разработанные и утвержденные Ассоциацией нейрохирургов России в 2012 году.

В результате работы разработан, апробирован и внедрен в клинику метод интраоперационного спектроскопического анализа распределения в тканях 5-АЛК индуцированного протопорфирина IX в хирургии глиальных опухолей на отечественном оборудовании. Разработка технологии интраоперационной метаболической навигации в нейрохирургии на базе биоспектрального анализатора и фотосенсибилизатора отечественного производства является практическим вкладом в реализацию Программы развития фармацевтической и медицинской промышленности в РФ, а также Стратегии развития медицинской и фармацевтической промышленности в РФ до 2020 года.

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

Результаты настоящего исследования внедрены в практику ФБГУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко РАМН».

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

1. Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия с использованием отечественного препарата «Аласенс» являются эффективными, быстрыми и безопасными методами интраоперационной метаболической навигации при соблюдении критериев отбора и стандартов ведения в послеоперационном периоде пациентов с глиомами головного мозга.
2. Контрастирование опухоли, ее размеры, по данным предоперационного МРТ в T<sub>1</sub> режиме, а также степень ее злокачественности являются надежными и достоверными предикторами интраоперационной аккумуляции 5-АЛК индуцированного ПП IX в глиальных опухолях головного мозга.
3. Чувствительность оптической флуоресцентной диагностики с использованием микроскопа OPMI Carl Zeiss Pentero с флуоресцентным модулем в

хирургии глиальных опухолей составляет 58.8% при глиомах Grade I-II и 89.7% при глиомах Grade III-IV. В хирургии глиом с продолженным ростом интраоперационная флуоресцентная диагностика эффективна в подавляющем большинстве случаев.

4. В хирургии глиом головного мозга разной степени злокачественности метод лазерной спектроскопии имеет более высокую чувствительность (88%) и специфичность (82%) по сравнению с аналогичными данными для оптической визуализации с применением микроскопа с флуоресцентным модулем (78% и 60%, соответственно), и позволяет проводить количественную оценку накопления протопорфирина IX в тканях.

5. Недостаточный гемостаз, низкая кратность использования флуоресцентного режима микроскопа являются факторами, препятствующими проведению интраоперационной флуоресцентной диагностики.

6. В хирургии глиальных опухолей, вовлекающих кору головного мозга, метод флуоресцентной диагностики может быть использован для уточнения зоны и размеров кортикотомии, а также объема резекции поверхностной части опухоли с учетом локализации функционально значимых зон мозга.

7. Применение комбинированной спектроскопии с опциями одновременной оценки накопления ПП IX, светорассеяния, оксигенации и кровенаполнения тканей расширяет диагностические возможности метода флуоресцентной диагностики.

### **Апробация работы**

Официальная апробация диссертации состоялась 05.04.2013г. на расширенном заседании проблемной комиссии «Биология и комплексное лечение внутримозговых опухолей» НИИ НХ им. акад. Н. Н. Бурденко РАМН. Основные положения диссертации были доложены на XIV Европейском конгрессе нейрохирургии, (Рим, Италия, октябрь 2011), конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, Россия, июнь 2012), Сибирском международном нейрохирургическом форуме, (Новосибирск, 18-21 июня 2012), IX конгрессе нейрохирургов стран Азии (Стамбул, 2-5 сентября 2012), конференции Европейского общества нейрохирургов (Братислава, Словакия, 2012), I Всероссийской конференции молодых ученых РАМН (Москва, декабрь 2012), заседании технологического Комитета WFNS (Ганновер, INI, февраль 2013), XII Всероссийской конференции «Поленовские чтения» (Санкт-Петербург, 23-26 апреля 2013).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ (из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 публикация в англоязычном журнале, 7 тезисов и 1 глава в монографии).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация представлена на 209 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и приложения. В работе имеется 48 таблиц, 21 диаграмма и 56 рисунков. Библиографический указатель содержит 255 работ, из них 42 отечественных и 213 зарубежных авторов.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

С 2010 по 2012 гг. в Институте нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко РАМН было оперировано 114 пациентов с глиальными опухолями различной локализации и гистологической природы с использованием интраоперационной флуоресцентной навигации и лазерной спектроскопии. Исследование носило когортный проспективный характер. Данной группе пациентов выполняли:

1. Комплексное клинико-инструментальное исследование до и после операции (общий и неврологический статус, осмотр нейроофтальмолога и отоневролога до и после операции, МРТ головного мозга до операции; КТ с контрастным усилением через 24 часа после операции, ЭЭГ до и после операции). Для дальнейшего анализа использованы данные МРТ в режиме T1 с контрастным усилением. Контрастирование опухолей оценивалось по 4х-балльной шкале: 0 – отсутствие контрастирования, 1 – неоднородное контрастирование отдельных фокусов опухоли, 2 - диффузное контрастирование всей солидной части опухоли, 3 - кольцевидное контрастирование. Размер опухоли оценивался по данным предоперационных МРТ по 3х-балльной шкале: малая – максимальный размер 0-30 мм включительно, средней величины – максимальный размер 31-60 мм включительно, большая – максимальный размер более 61 мм.
2. Интраоперационная флуоресцентная диагностика с использованием микроскопа Carl Zeiss OPMI Pentero с флуоресцентным модулем. Для визуальной оценки интенсивности флуоресцентного эффекта нами использована 4-балльная шкала: 0 –отсутствие видимой флуоресценции (ВФ), 1 – слабо-розовое, 2 – малиновое, 3 ярко-красное свечение. С целью индукции видимой флуоресценции использован отечественный препарат 5-АЛК «АЛАСЕНС» (ГНЦ НИОПИК, Москва, Россия).
3. Лазерная спектроскопия на спектроанализаторе ЛЭСА-01-БИОСПЕК (ЗАО «БИОСПЕК» на базе лаборатории лазерной спектроскопии Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия). Для возбуждения АЛА-индуцированного протопорфирина IX использован He-Ne лазер (длина волны 632,8 нм); для изучения оксигенации и рассеивающих свойств тканей – галогеновая лампа с фокусировкой излучения на торец оптического волокна. Для описания количественных показателей накопления протопорфирина IX использовались индекс флуоресценции и флуоресцентный контраст. Индекс флуоресценции вычислялся как отношение интенсивности флуоресценции ПП IX в диапазоне 690-730 нм к интенсивности рассеяного назад лазерного сигнала. Флуоресцентный контраст вычислялся как отношение индекса флуоресценции исследуемой ткани к индексу флуоресценции интактной коры.
4. Морфологический анализ множественных биоптатов глиом головного мозга в лаборатории нейроморфологии Института нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко РАМН.

Экспериментальная часть работы выполнена совместно с лабораторией нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН (руководитель: д.б.н. Павлова Г.В.) и отделом фундаментальной и прикладной нейробиологии Государственного научного центра социальной и судебной психиатрии им В.П.



Сербского МЗ РФ (руководитель: академик РАМН, профессор Чехонин В.П.). В работе использована экспериментальная глиома С6, клетки которой имплантировались в мозг четырех беспородных крыс весом 400 грамм в дозе в количестве  $400 \times 10^3$  клеток на 1 животное. С целью получения культур биоптаты опухолей культивировали в питательной среде (DMEM с 5% фетальной сывороткой) в течение 3 суток. Затем в культуральную среду добавляли препарата «Аласенс» в концентрации 1 мМ и помещали чашки в инкубатор на 2-4 часа, после чего исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Для анализа корреляционных связей между двумя качественными признаками применялся коэффициент ассоциации Юла (Q). Статистически значимой считалась связь, если  $|Q| > 0,5$ . Для более точного описания обнаруженной связи между признаками рассчитывался коэффициент сопряженности (Ф) и точный уровень значимости полученного коэффициента. Для анализа корреляционных связей между качественным признаком и признаком, измеренным в ранговой шкале, использовался рангово-бисериальный коэффициент корреляции. Затем на основании полученного коэффициента рассчитывался критерий Стьюдента для данной выборки. Для анализа корреляционных связей между двумя признаками, измеренными по ранговой шкале, а также в случае, когда один признак измерялся по ранговой шкале, а второй признак был количественным, использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Для анализа корреляционных связей между двумя количественными признаками использовался коэффициент линейной корреляции Пирсона. Во всех случаях статистически значимой связь признавалась, если значения  $p$  было менее 0,05. Для анализа общей и безрецидивной выживаемости использовалась процедура Каплана-Майера с построением соответствующих кривых. Медианой выживаемости признавалось время, когда вероятность смерти/наступления рецидива составила 50%.

## **ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Интраоперационная видеофлуоресцентная диагностика в хирургии глиом низкой степени злокачественности**

В целом, видимая флуоресценция отмечена нами у 10 из 17 пациентов (58.8%) с опухолями Grade I-II. В нашей серии исследовано двое пациентов с пилоидными астроцитомами (Grade I и Grade II), у которых отмечалась видимая флуоресценция и повышение уровня спектров накопления от протопорфирина IX выше фонового уровня. Среди глиом Grade II видимая флуоресценция отмечалась у 9 из 16 пациентов. В данную подгруппу входили пациенты с астроцитомами, олигодендроглиомами, смешанными глиомами, а также по 1 пациенту с гемистоцитарной астроцитомой и десмопластической инфантильной ганглиоглиомой. Биоспектральный анализ, выполненный в 8 наблюдениях, показал повышение индекса флуоресценции от 6.11 до 45.33 ед. При исследовании корреляционной связи между наличием олигокомпонента в структуре глиомы Grade II и наличием/отсутствием видимой флуоресценции статистически достоверной связи не получено. Отсутствие видимой флуоресценции отмечалось у 7 пациентов с

глиомами GRADE II (три пациента с диффузными астроцитомами, три - с олигоастроцитомами и один - с олигодендроглиомой).

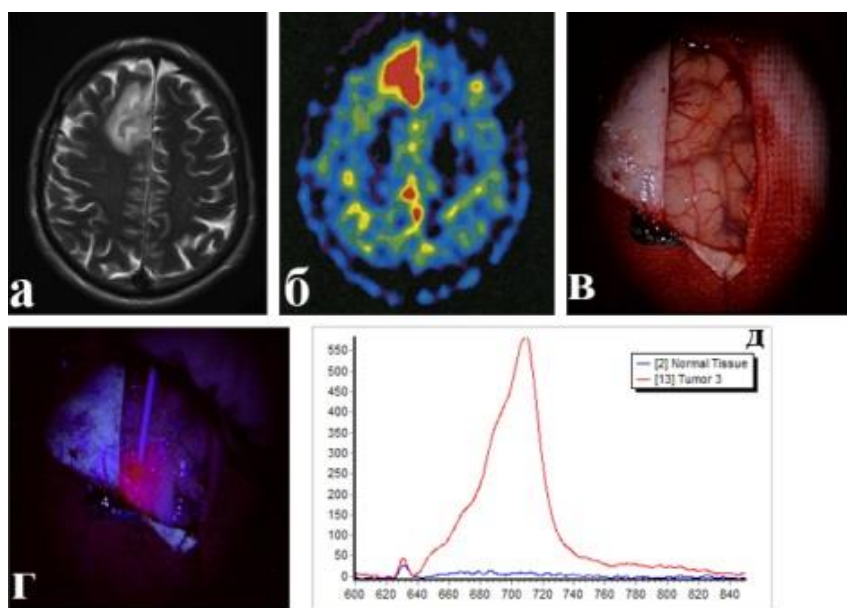


Рисунок 1. Видимая флуоресценция и лазерная спектроскопия у пациента с олигодендроглиомой GRADE II (а – предоперационная МРТ, б – предоперационная ПЭТ, индекс накопления 1.5, в - интраоперационная фотография в белом свете, г - интраоперационная фотография в синем свете, д – спектрограмма). Отмечается умеренно выраженная видимая флуоресценция опухоли, вовлекающей кору лобной доли. В ране (рис. 1г) визуализируется спектральный датчик.

## 2. Интраоперационная видеофлуоресцентная диагностика в хирургии глиом высокой степени злокачественности

В группе из 97 пациентов с глиомами Grade III-IV видимая флуоресценция наблюдалась у 87 (89.7%) пациентов. Отсутствие видимой флуоресценции и достоверного повышения уровня спектров отмечалось у 10 пациентов с глиомами Grade III-IV (10.3 %) (табл. 1).

Таблица 1. Флуоресцентный эффект в хирургии первичных глиальных опухолей головного мозга (сравнительная таблица).

Типы опухолей	Флуоресцентный эффект		Всего
	положит. п (%)	отрицат. п (%)	
Глиомы GRADE I	1 (100%)	-	1
Глиомы GRADE II	9 (56.25%)	7 (43.75%)	16
Глиомы GRADE III	12(66.67%)	6 (33.33%)	18
Глиомы GRADE IV	75(94.94%)	4 (5.06%)	79
<b>Итого:</b>	<b>97 (85%)</b>	<b>17 (15%)</b>	114

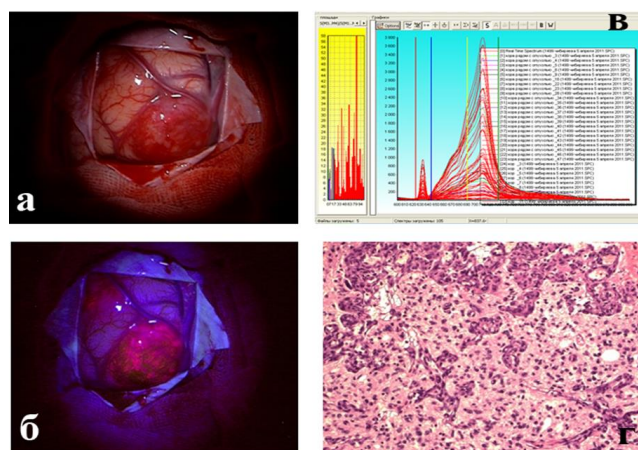


Рисунок 2. Глиома Grade IV WHO правой лобной доли, выходящая на поверхность коры головного мозга. а – визуализация в белом свете, б - визуализация в синем свете, в – спектрограмма, г – данные гистологического исследования.

Ниже приводятся данные о распределении интенсивности видимой флуоресценции с использованием четырех-балльной шкалы у 85 пациентов с глиомами высокой степени злокачественности (табл. 2).

Таблица 2. Распределение интенсивности видимой флуоресценции в хирургии глиом головного мозга высокой степени злокачественности.

Grade опухоли	Интенсивность видимой флуоресценции				Всего
	0	1	2	3	
<b>Grade III</b>	6 (35,3%)	5 (29,4%)	2 (11,8%)	4 (23,5%)	<b>17</b>
<b>Grade IV</b>	4 (5,9%)	20 (29,4%)	16 (23,5%)	28 (41,2%)	<b>68</b>
<b>Всего:</b>	<b>10 (11,8%)</b>	<b>25 (29,4%)</b>	<b>18 (21,2%)</b>	<b>32 (37,6%)</b>	<b>85</b>

Обозначения: интенсивность видимой флуоресценции: 0 – отсутствие; 1 – слабая; 2 – умеренно выраженная; 3 – интенсивная флуоресценция.

Как видно из приведенной таблицы, при использовании интраоперационной флуоресцентной диагностики в хирургии глиом высокой степени злокачественности чаще встречается яркая флуоресценция. Ниже приводятся сравнительные данные об интенсивности видимой флуоресценции, оцененной визуально во время операции оперирующим хирургом, у 99 пациентов с глиомами различной степени злокачественности (табл. 3). Данный анализ проведен с использованием четырех-балльной шкалы интенсивности флуоресцентного свечения, оцениваемой хирургом визуально во время оперативного вмешательства.

Таблица 3. Сравнительный анализ видимой флуоресценции в глиомах головного мозга различной степени злокачественности у 99 пациентов.

Grade опухоли	Интенсивность видимой флуоресценции				Всего
	0	1	2	3	
<b>LGG</b>	7 (50%)	2 (14,3%)	2 (14,3%)	3 (21,4%)	<b>14</b>
<b>HGG</b>	10 (11,8%)	25 (29,4%)	18 (21,2%)	32 (37,6%)	<b>85</b>
<b>Всего:</b>	<b>17 (17,3%)</b>	<b>27 (27,3%)</b>	<b>20 (20,2%)</b>	<b>35 (35,4%)</b>	<b>99</b>

Обозначения: интенсивность видимой флуоресценции: 0 – отсутствие; 1 – слабая; 2 – умеренно выраженная; 3 – интенсивная флуоресценция.

При исследовании связи между степенью злокачественности опухоли (LGG/HGG) и интенсивностью видимой флуоресценции выявлена достоверная корреляция между данными параметрами (коэффициент Спирмена:  $r(s)=0,47$ ,  $p<0.001$ ).

### **3. Использование флуоресцентной диагностики для выбора зоны кортикотомии**

В результате видеофлуоресцентного анализа (на основании изучения протоколов и видеозаписей оперативных вмешательств) получены данные о состоянии коры в режиме BL 400 у 33 больных (см. таблицу 4).

Таблица 4. Сопоставление данных визуальной оценки коры в белом свете и режиме BL 400 для опухолей, выходящих на поверхность коры головного мозга

Кора в белом свете не изменена и не светится в BL 400	13 (39.3%)
Кора в белом свете изменена и светится в BL 400	10 (30.3%)
Кора в белом свете не изменена, но светится в BL 400	7 (21.2%)
Кора в белом свете изменена, но не светится в BL 400	3 (9.2%)
<b>ИТОГО:</b>	<b>33 (100%)</b>

Как видно из таблицы 4, у 17 (51,5%) пациентов отмечалась флуоресценция опухолей, выходящих на поверхность коры головного мозга, у 7 пациентов (41,2%) из данной подгруппы в белом свете кора была интактной, но флуоресцировала в режиме BL 400. Это позволяет сделать вывод, что при поверхностной локализации опухолей (выходящих на кору или располагающихся субкортикально) недостаточно оценивать состояние подлежащей коры мозга в белом свете. Необходима комплексная оценка, включающая визуализацию коры головного мозга в белом свете и режиме BL 400 для выбора зоны кортикотомии и ее размеров.

### **4. Оценка остаточной видимой флуоресценции**

В ходе удаления глиом в конце основного этапа удаления опухоли после осуществления этапного гемостаза проводили контрольный осмотр ложа удаленной опухоли для оценки остаточной видимой флуоресценции (ОВФ). Сбор данных о ОВФ проводился на основании анализа видеозаписей оперативных вмешательств и осуществлен у 45 пациентов с глиомами GRADE II-III-IV WHO. Из данной выборки в 15 случаях (33.3%) отмечалась ОВФ, однако лишь у 8 пациентов было продолжено удаление остатков опухоли до исчезновения флуоресцентного эффекта. В остальных случаях расширение объема резекции было невозможно ввиду близости функционально значимых зон мозга, по данным интраоперационного нейрофизиологического мониторинга. Ни в одном случае после расширения объема резекции не отмечено нарастания неврологического дефицита в послеоперационном периоде.

## 5. Анализ предоперационных факторов, обуславливающих наличие/отсутствие видимой флуоресценции

Для определения связи между наличием/отсутствием видимой флуоресценции и степени злокачественности удаляемой опухоли у всех 114 пациентов (табл. 5) был рассчитан коэффициент ассоциации Юла (Q), составивший -0.72. Модульное значение коэффициента больше 0.5, что указывает на достоверную связь признаков.

Таблица 5. Распределение пациентов по группам ВФ и степени злокачественности опухоли.

Grade	Есть ВФ	Нет ВФ	Всего
<b>Grade I-II (LGG)</b>	10	7	<b>17</b>
<b>Grade III-IV (HGG)</b>	87	10	<b>97</b>
<b>Всего:</b>	<b>97</b>	<b>17</b>	<b>114</b>

Таким образом, видимая флуоресценция значительно чаще отмечалась в группе опухолей Grade III-IV по сравнению с глиомами Grade I-II. Для оценки связи между контрастированием опухоли по данным предоперационных МРТ и накоплением ПП IX во время операции, нами использованы 4-балльные шкалы для обоих признаков у 40 пациентов (табл. 6).

Таблица 6. Распределение пациентов по интенсивности ВФ и типам контрастирования по предоперационным МРТ-томограммам (в режиме T1 с контрастным усилением).

Контрастирование	Интенсивность видимой флуоресценции				Всего
	0	1	2	3	
<b>Нет</b>	6	1	0	0	<b>7</b>
<b>Фокусное</b>	0	5	3	6	<b>14</b>
<b>Диффузное</b>	0	1	1	3	<b>5</b>
<b>Кольцевидное</b>	0	5	5	4	<b>14</b>
<b>Всего:</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>40</b>

Обозначения: интенсивность видимой флуоресценции: 0 – отсутствие; 1- слабая; 2 – умеренная; 3 – интенсивная.

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между указанными признаками составил 0,484,  $p=0,002$ , что указывает на наличие статистически достоверной связи между исследуемыми признаками. Это позволяет сделать вывод о том, что, чем больше степень контрастирования, тем ярче ВФ во время операции. В связи с этим, предоперационное контрастирование опухоли по данным МРТ может являться достоверным предиктором эффективности и интенсивности флуоресценции, что соответствует данным других авторов [Roberts D.W. et al., 2011].

Размеры опухоли, по данным предоперационных МРТ, оценены нами у 63 пациентов. Мы проанализировали связь между размерами опухоли и интенсивностью ВФ (табл. 7).

Таблица 7. Распределение флуоресцирующих глиом по размерам опухолей

Размер опухоли	Интенсивность видимой флуоресценции				Всего
	0	1	2	3	
<b>До 30 мм</b>	0	1	1	2	<b>4</b>
<b>31-60 мм</b>	8	17	12	9	<b>46</b>
<b>Более 61 мм</b>	1	1	3	8	<b>13</b>
<b>Всего:</b>	<b>9</b>	<b>19</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	<b>63</b>

Обозначения: интенсивность видимой флуоресценции: 0 – отсутствие; 1- слабая; 2 – умеренная; 3 – интенсивная.

Ранговый коэффициент корреляции Спирмена составил 0,405 между,  $p < 0.001$ . Это позволяет сделать вывод, что чем больше размер опухоли, тем интенсивнее ее свечение во время операции.

При анализе данных 10 случаев флуоронегативных опухолей Grade III-IV WHO (из 97, т.е. в 10.3%) нами были выявлены следующие возможные причины отсутствия ВФ: кровотечение (в 3 случаях), низкая кратность включения флуоресцентного режима во время операции (в 7 случаях), узкая и глубокая операционная рана (в 7 случаях). В двух случаях причину отсутствия ВФ выявить не удалось.

При анализе возможного влияния других факторов на наличие видимой флуоресценции во время операции нами было установлено, что возраст, наличие олигокомпонента в структуре глиомы, прием противосудорожных препаратов и дексаметазона перед операцией, заболевания желудочно-кишечного тракта, а также сахарный диабет достоверно не связаны с флуоресцентным эффектом глиомы, диагностируемым во время операции.

Сопоставление данных ПЭТ с метионином и интраоперационной флуоресцентной навигации выполнено у 7 пациентов (индекс накопления метионина составил от 1.14 до 3.99), из них в 6 случаях отмечалась видимая флуоресценция во время операции. Однако, ввиду небольшого количества наблюдений статистически значимой связи между указанными параметрами не получено.

Аналогичные данные получены при исследовании влияния наличия кистозного компонента опухоли на интенсивность ВФ (табл. 8).

Таблица 8. Наличие кисты в опухоли и эффект видимой флуоресценции

<b>Наличие кисты в опухоли</b>	<b>Есть ВФ</b>	<b>Нет ВФ</b>	<b>Всего</b>
<b>Есть киста/-ы</b>	23	4	<b>27</b>
<b>Нет кист</b>	17	9	<b>26</b>
<b>Всего</b>	<b>40</b>	<b>13</b>	<b>53</b>

В данном случае оценка связи между признаками проводилась при расчета коэффициента сопряженности  $\Phi$ , значение которого 0,266,  $p = 0.06$ . Таким образом, выявлена тенденция, заключающаяся в том, что вероятность наблюдать ВФ во время операции выше, если в опухоли есть кистозный компонент. Для достоверного подтверждения данной гипотезы необходимо проведение дальнейших исследований.

## **6. Интраоперационная флуоресцентная навигация в хирургии глиом с продолженным ростом**

В нашем исследовании было 19 пациентов с продолженным ростом опухоли (глиомы Grade III-IV WHO). Во всех 19 случаях отмечалась видимая флуоресценция различной интенсивности. Качественная оценка флуоресцентного эффекта проведена у 6 пациентов, у 13 - выполнена оценка флуоресцентного эффекта с градацией по 4х-балльной шкале. По степени интенсивности слабая флуоресценция

отмечалась у 5 пациентов, умеренно выраженная – у 3 и яркая – у 5 пациентов. В подавляющем количестве наблюдений флуоресценция носила неомогенный характер. При сравнении интенсивности видимой флуоресценции первичных глиом и опухолей с продолженным ростом статистически значимых достоверных различий не получено. (рангово-бисериальный коэффициент корреляции составил 0,140,  $p > 0,05$ ). Наши результаты соответствует данным Nabavi и соавт., которыми было установлено, что ВФ отмечалась у 34 из 36 пациентов с продолженным ростом глиом Grade III-IV, при этом у 24 из них отмечалась интенсивная ВФ [Nabavi A. et al., 2009].

## 7. Лазерная спектроскопия с оценкой количественного накопления ПП IX

Во всех случаях при наличии ВФ отмечалось повышение уровня спектров накопления ПП IX более 2 ед. (максимальный уровень фоновых измерений от интактной коры). Сопоставление данных спектрометрии (средний и максимальные индексы флуоресценции) и данных визуальной оценки ВФ с использованием 4-х балльной шкалы было выполнено у 47 пациентов при помощи рангового коэффициента корреляции Спирмена. В результате было установлено, что между данными признаками имеется прямая достоверная зависимость ( $p = 0,01$ ). Таким образом, повышение спектров ПП IX в опухолевой ткани значимо коррелирует с яркостью ВФ при проведении интраоперационной метаболической навигации.

При морфологическом исследовании 272 биоптатов с гистологической верификацией всех типов глиальных опухолей в 239 случаях зарегистрированы спектры с ФК более 2, то есть чувствительность метода лазерной спектроскопии составила 88%. При исследовании специфичности в 3 случаях получены биоптаты мозга с ФК более 2 среди 17 биоптатов, среди которых была верифицирована мозговая ткань, таким образом, специфичность составила 82% (табл. 9).

Таблица 9. Чувствительность и специфичность методов флуоресцентной навигации и лазерной спектроскопии в хирургии глиом по данным исследований множественных биопсий в хирургии глиом головного мозга

Метод диагностики	Видимая флуоресценция		Спектроскопия	
	Биоптаты с опухолью	Биоптаты с интактной тканью	Биоптаты с опухолью	Биоптаты с интактной тканью
<b>Морфологический анализ биоптатов</b>				
<b>Чувствительность</b>	53/68 (78%)	-	239/272 (88%)	-
<b>Специфичность</b>	-	4/10 (60%)	-	3/17 (82%)
<b>Число биоптатов</b>	78		289	

Примечание: чувствительность метода = число флуоропозитивных биоптатов с опухолевой тканью/общее число биоптатов с опухолевой тканью x 100%; специфичность метода = 1- (число флуоропозитивных биоптатов с интактной тканью мозга без признаков опухоли/общее число биоптатов с интактной тканью мозга без признаков опухоли) x 100%.

При сравнении чувствительности и специфичности методов визуальной оценки флуоресцентного эффекта с использованием микроскопа OPMI Pentero в

хирургии глиом головного мозга из данных таблицы 9 видно, что чувствительность повышается при использовании лазерной спектроскопии с 78 до 88%, а специфичность – с 60 до 82%. Низкая специфичность в случае визуальной оценки флуоресцентного эффекта может быть объяснена небольшим числом биоптатов с интактной мозговой тканью, взятых при визуальной оценке флуоресценции. Аналогичные данные получены в результате работы зарубежных исследователей. Так, по данным Eljamel M. S. и соавт. чувствительность флуоресцентной диагностики с 5-АЛК в хирургии злокачественных глиом составила 80% при 100% специфичности [Eljamel M. S. et al., 2003]. По данным Toms S.A. и соавт. чувствительность лазерной спектроскопии для идентификации солидной части глиомы (n=24, глиомы Grade II-III-IV WHO) составила 80%, специфичность – 89%, а аналогичные данные для инфильтративной зоны составили 94% и 93%, соответственно [Toms S.A. et al., 2007].

### 8. Оценка количественной аккумуляции ПП IX в глиомах разной степени злокачественности

На рисунке 3 приведена диаграмма распределения частоты встречаемости экспериментальных данных – числа биоптатов (отложенных по оси ординат) с показателями индекса флуоресценции (отложенных по оси абсцисс) для различных групп опухолей (зеленый цвет – Grade II; оранжевый – для Grade III; красный для Grade IV).

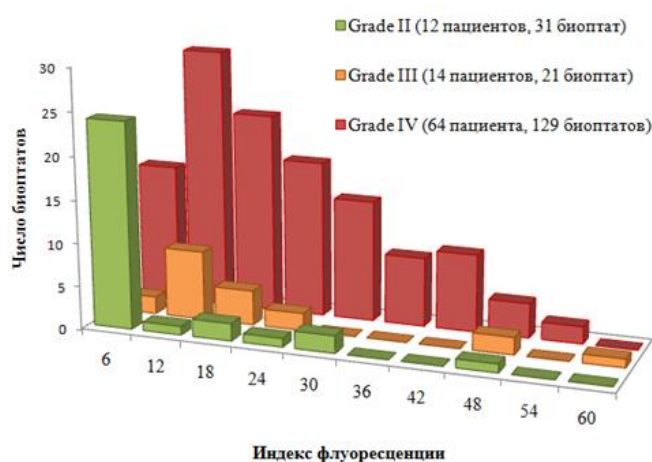


Рисунок 3. Распределение индекса флуоресценции для образцов тканей опухолей Grade II, III, IV WHO.

Медиана индекса флуоресценции по ПП IX для опухолей Grade II составила 1.5; для олигоастроцитом Grade III – 11.8, для астроцитом Grade III – 13.8; для глиобластом – 17.6. При попарном сравнении глиом Grade II-III-IV WHO между собой по уровню индекса флуоресценции с помощью метода дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента были обнаружены статистически значимые различия между глиомами II и III-IV WHO с уровнем значимости не более 1% ( $p < 0.01$ ). Однако не было обнаружено статистически значимых различий между опухолями III и IV степеней по индексу флуоресценции ПП IX.



## 9. Оценка количественного накопления ПП IX в глиобластомах

При сравнении интенсивности флуоресцентного сигнала от различных участков глиобластом максимальные уровни накопления ПП IX получены в зоне инфильтрации (рис. 4). При вычислении медиан индекс флуоресценции в инфильтративной зоне составил 28.34; в зоне активного роста опухоли – 15.23; в зоне некроза – 2.73. Таким образом, максимальная аккумуляция ПП IX происходит в зоне инфильтрации опухоли, что, возможно, связано с интенсивным неоангиогенезом и наличием большого количества интенсивно пролиферирующих клеток в этой зоне.

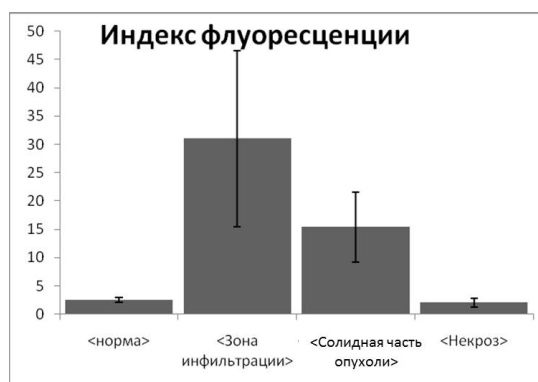


Рисунок 4. Уровни интенсивности флуоресценции в различных участках глиобластомы.

При попарном сравнении индексов флуоресценции между различными участками глиобластом получены достоверные отличия между уровнем спектров ПП IX зон опухоли и интактного мозга; солидной части опухоли и зоны некроза; интактного мозга и перифокальной зоны; зонами некроза и перифокальной зоны ( $p < 0.05$ ).

## 10. Комбинированная лазерная спектроскопия в хирургии глиом головного мозга

В исследование комбинированного метода спектроскопии включено 90 пациентов с опухолями Grade II-III-IV. При исследовании комбинированной спектроскопии, проводилось параллельное измерение уровня ПП IX, светорассеяния тканей, а также показателей оксигенации и кровенаполнения. У каждого пациента было взято от 1 до 21 образцов ткани для последующего гистологического анализа и сопоставления его результатов с данными спектроскопического исследования. Было проанализировано 268 образцов ткани, из них 216 образцов у пациентов с глиобластомами, 21 образец у пациентов с опухолями Grade III, 31 образец у пациентов с опухолями Grade II.

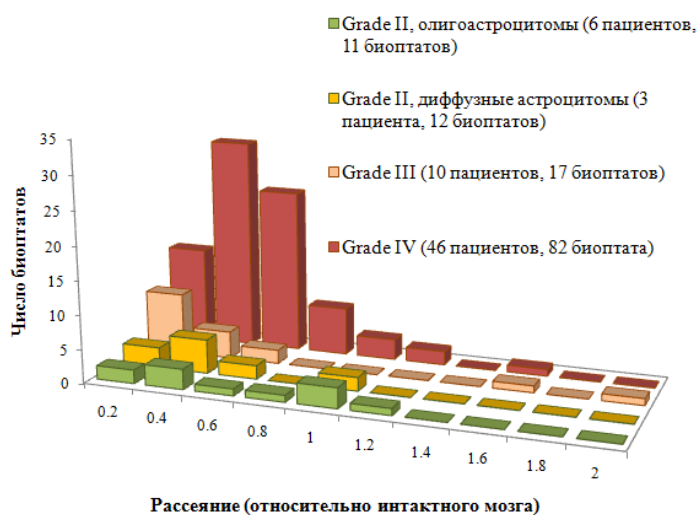


Рисунок 5. Диаграмма распределения частоты рассеяния света у пациентов с глиомами Grade II-III-IV WHO.

На рисунке 5 приведена диаграмма распределения частоты встречаемости экспериментальных данных (отложенных по оси ординат) с показателями светорассеяния (отложенных по оси абсцисс) для различных групп опухолей (зеленый цвет – Grade II (смешанные глиомы); желтый цвет - Grade II (астроцитомы); розовый – для Grade III; красный - для Grade IV). При анализе показателей светорассеяния в структуре смешанных глиом Grade II были выявлены 2 подгруппы данных опухолей – с низким и высоким показателями светорассеяния. Медиана в первой подгруппе составила 0.28, во второй – 0.93. В группе астроцитом Grade II уровень светорассеяния составил 0.32. При исследовании светорассеяния в структуре глиом Grade III мы также проанализировали светорассеяние отдельно в группе смешанных глиом и астроцитом (медианы показателей светорассеяния составили 0.19 и 0.2, соответственно). При исследовании светорассеяния у пациентов с глиобластомами показатель светорассеяния составил 0.37.

При сравнительном анализе показателей светорассеяния были выявлены статистически значимые различия между смешанными глиомами Grade II с высоким светорассеянием и глиомами Grade III-IV WHO ( $p < 0.05$ ). Это позволяет сделать вывод о неоднородной структуре доброкачественных глиом, то есть показатели светорассеяния у части смешанных глиом Grade II аналогичны глиомам Grade III. Различия в светорассеянии интактных и патологических тканей обусловлены неоднородностью структур мембран, изменением количества митохондрий и размеров ядер в клетках опухоли.

При анализе степени оксигенации и кровенаполнения тканей в различных участках опухоли у пациентов с глиобластомами с помощью U-критерия Манна-Уитни были обнаружены статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) между группами данных, относящихся к зоне некроза и солидной части опухоли (рис. 6). Малый объем ( $n=4$ ) выборки глиом Grade II и III с использованием интраоперационного определения параметров оксигенации и кровенаполнения не позволяет сделать выводов о различиях данных параметров для глиом Grade II-III. Необходимо проведение дальнейших исследований.

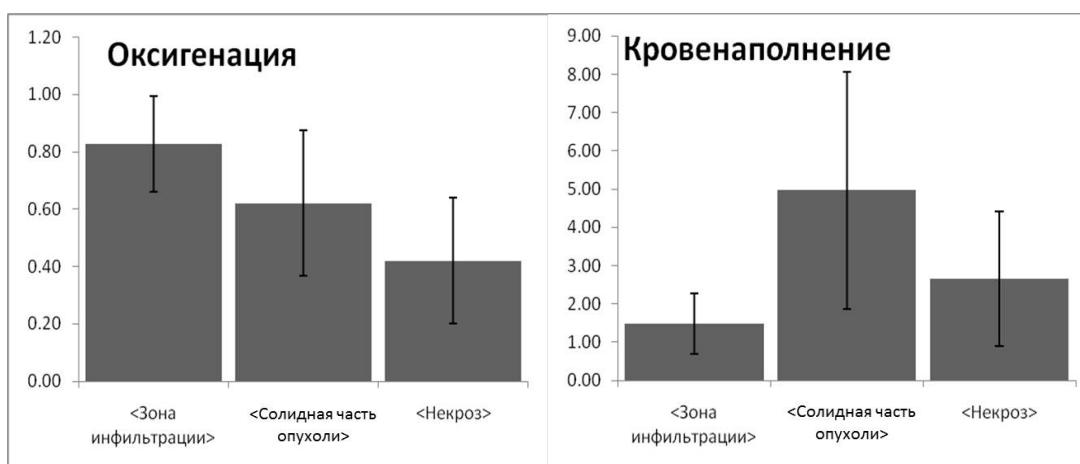


Рисунок 6. Основные показатели комбинированной спектральной биопсии в различных участках глиобластом (оксигенация, кровенаполнение).

Предложенный метод оптической биопсии, заключающийся в проведении спектрального анализа концентрации гемоглобина в оксигенированной и редуцированной форме, опухолевого маркера (5-АЛК индуцированного ПП IX), а также изменения рассеивающих свойств исследуемых тканей, показал возможность дифференциации различных подтипов глиальных опухолей, сходных по степени проявления флуоресценции ПП IX, но отличающихся по другим параметрам. На основании полученных данных комбинированной спектроскопии, включающих анализ показателей флуоресценции, оксигенации и светорассеяния тканей можно выделить следующие типы распределения признаков (рис. 7):

1. **СOLIDная часть опухоли:** умеренная флуоресценция, пониженная оксигенация, пониженное светорассеяние.
2. **Инфильтративная зона:** яркая флуоресценция; нормальная оксигенация, пониженное светорассеяние.
3. **Зона некроза:** отсутствие флуоресценции, низкая оксигенация, высокое светорассеяние.
4. **Интakтный мозг:** отсутствие флуоресценции (фоновый уровень); нормальная оксигенация, нормальное светорассеяние.

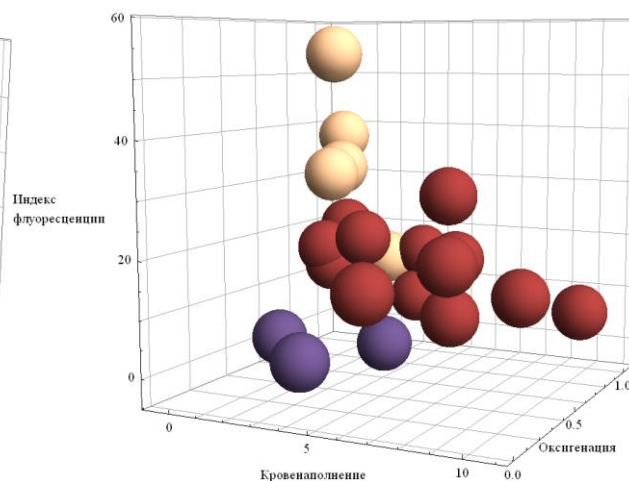
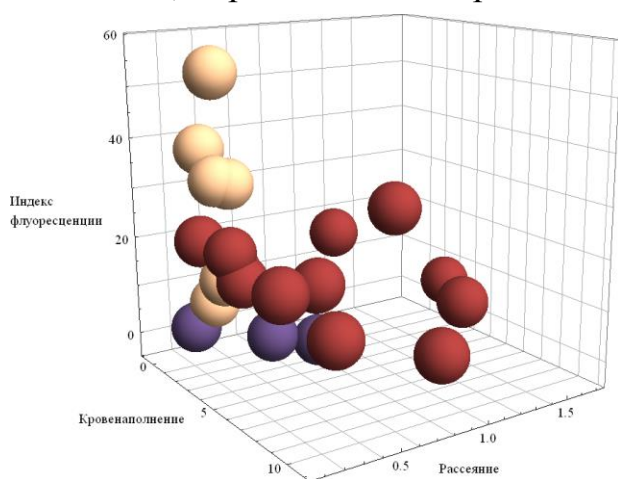


Рисунок 7. Распределение различных типов ткани в пространстве индекс флуоресценции – кровенаполнение - рассеивающие свойства (слева) и распределение различных типов ткани в пространстве индекс флуоресценции – кровенаполнение – оксигенация (справа). Фиолетовый цвет – зона некроза, красный цвет – солидная часть опухоли, оранжевый цвет – зона инфильтрации.

### **11. Оценка ближайших результатов послеоперационного периода**

В ближайшем послеоперационном периоде осложнений, связанных с использованием 5-АЛК не отмечено ни у одного пациента. У 4 пациентов отмечалось транзиторное повышение печеночных ферментов, регрессировавшее к моменту выписки из стационара. Всем пациентам проводилась контрольная СК-томография в первые 24 часа после операции для идентификации ранних послеоперационных осложнений. В одном случае выявлена послеоперационная острая эпидуральная гематома, которая была успешно удалена в результате ревизии. Результаты ближайшего послеоперационного периода оценивались по шкале Карновского. В раннем послеоперационном периоде у большинства прооперированных пациентов (65.8%) изменения по шкале Карновского по сравнению с предоперационным неврологическим статусом, не отмечалось. В 37 случаях (21.9%) достигнуто улучшение индекса Карновского, в 14 – ухудшение (12.3%). Медиана индекса Карновского после операции составила 80 баллов.

### **12. Отдаленные результаты послеоперационного периода**

Отдаленный катамнез прослежен у 44 пациентов с глиомами grade IV, 6 пациентов с глиомами grade III, 15 пациентов с глиомами Grade I-II в сроки наблюдения более 5 месяцев после оперативного вмешательства. Максимальный период наблюдения составил 31 месяц. В первый месяц после операции и выписки по причине тромбоэмболических осложнений умерли 4 пациента. В результате сбора катамнеза было достоверно установлено, что 7 человек из 44 прервали курс или отказались от адъювантного лечения. Из них на момент опроса умерло 3 человека. Поскольку адъювантная терапия достоверно увеличивает общую и безрецидивную выживаемость, что доказано исследованиях с I уровнем достоверности [Stupp et al., 2010], мы исключили этих больных из анализа, опасаясь искажения показателей выживаемости. У 12 человек из 44, к сожалению, не удалось получить точные сведения о прохождении химио- и лучевой терапии после оперативного вмешательства.

Таким образом из 44 пациентов с верифицированным диагнозом глиобластомы в анализ отдаленных результатов лечения было включено 25 человек с прослеженным катамнезом более 5 месяцев после оперативного вмешательства. На основании данных этих больных были построены кривые Каплана-Майера (рис. 8, 9). Медиана наблюдения составила 31.4 нед. (около 8 мес). Шестимесячная выживаемость данной группы пациентов составила 95.4% (86.75 – 100%), стандартная ошибка  $s=4.44$ . Шестимесячный безрецидивный период составил 79.25% (62.95-95.56%), стандартная ошибка  $s=8.32$ . Медиана безрецидивной выживаемости составила 59,7 нед. (13,9 мес.) (32,5-86,9 нед.),  $s=13,89$ .

Мы сознательно попытались оценить показатели шестимесячной общей и безрецидивной выживаемости только у пациентов с глиобластомами, поскольку группы остальных пациентов с известным катамнезом слишком малы. Сложность

сбора катамнеза, а также неоднородность данных о проводимом адьювантном лечении обусловлена в том числе географическим удалением многих мест проживания пациентов.

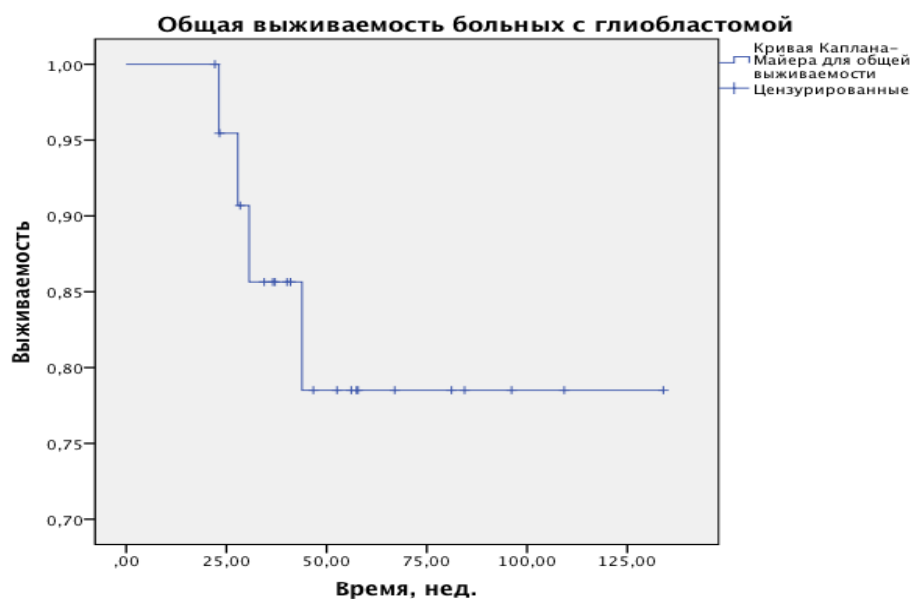


Рисунок 8. Кривая Каплана-Майера общей выживаемости у пациентов с глиобластомами, получившими полный курс адьювантного лечения и оперированных использованием метода флуоресцентной диагностики.

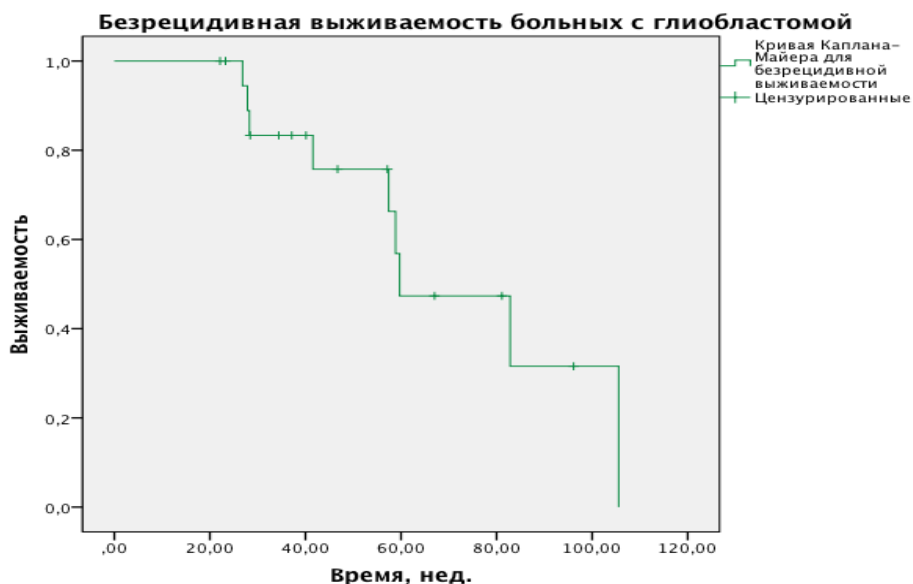


Рисунок 9. Кривая Каплана-Майера безрецидивной выживаемости у пациентов с глиобластомами, получившими полный курс адьювантного лечения и оперированных использованием метода флуоресцентной диагностики.

### 13. Перспективы развития метода

Предварительный анализ результатов иммуногистохимического окрашивания срезов флуоропозитивных и флуоронегативных опухолей не выявил достоверных воспроизводимых во всех случаях различий в количественном содержании и распределении в ткани опухоли белковых маркеров VEGF (vascular endothelial growth factor), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) и Ki67. Совместно с

лабораторией нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН проведено исследование культур глиом, полученных от пациентов с наличием или отсутствием флуоресцентного эффекта во время операции. В результате длительного культивирования были получены две перевиваемые культуры клеток, четко различающимися по метаболизму экзогенной 5-АЛК. При этом из флуоронегативной опухоли была получена флуоронегативная культура, а из флуоропозитивной — флуоропозитивная. При исследовании пролиферативных свойств и дифференцировки клеток было установлено, что для флуоропозитивной культуры характерны более высокая скорость пролиферации на фоне меньшей дифференцировки клеток. При анализе культур глиобластом, полученных от флуоресцирующей и нефлуоресцирующей опухоли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) было выявлено, что ППХ образуется в обеих культурах, но с различной скоростью. Так, при инкубации флуоронегативной культуры глиомы с 5-АЛК в сроки более 24 часов отмечалось постепенное появление флуоресценции культивируемых клеток.

При исследовании возможности индукции флуоресцентного эффекта с помощью антител к коннексину-43 (Cx43), конъюгированных с флуоресцентными метками Alexa488 и Alexa 660 в эксперименте был зафиксирован высокий флуоресцентный сигнал в зоне экспрессии Cx43, о чем свидетельствует высокий сигнал флуоресценции по периферии глиомы (активно делящиеся глиомные клетки) и периглиомной зоны (реактивный вал из Cx43 позитивных астроцитов). Показана возможность использования антител к Cx43, меченных флуоресцентной меткой Alexa488, для интраоперационной навигации - визуализации опухолевых клеток (рис. 10).

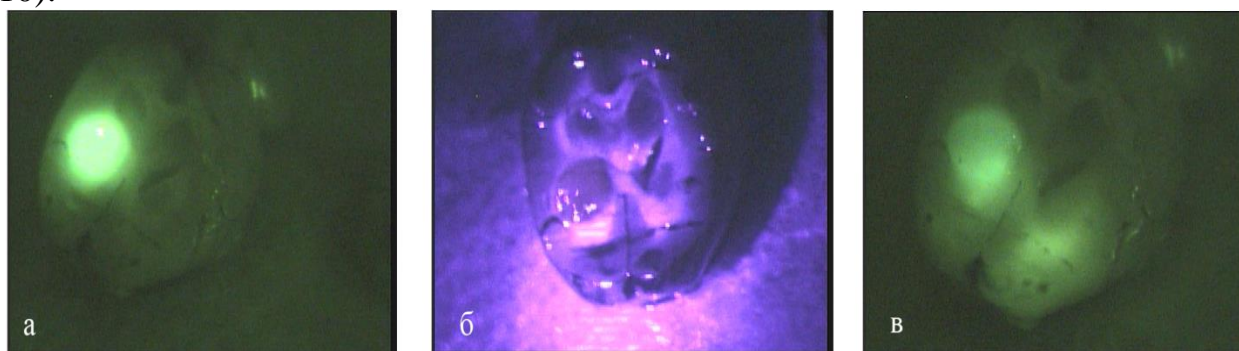


Рисунок 10. Оптическая нейровизуализация экспериментально привитой глиомы С6 в мозге крысы с помощью камеры со светофильтром при использовании флуоресцентной метки Alexa488, конъюгированной с антителами к коннексину-43 (а-в).

## ВЫВОДЫ

1. Метод флуоресцентной диагностики и лазерной спектроскопии с использованием отечественного препарата «Аласенс» безопасен для пациентов с глиомами головного мозга при условии соблюдения критериев отбора и ограничений светового режима в течение суток в послеоперационном периоде.
2. Степень контрастирования опухоли на предоперационных МРТ-томограммах в  $T_1$  режиме, ее размеры, а также степень злокачественности достоверно коррелируют с интенсивностью видимой флуоресценции во время операции, что,

однако, не исключает возможности использования метода флуоресцентной диагностики в хирургии глиом низкой степени злокачественности, у которых, как правило, отсутствует феномен контрастирования на МРТ.

3. Чувствительность оптической диагностики с использованием микроскопа с флуоресцентным модулем в хирургии глиальных опухолей составляет 58.8% при глиомах Grade I-II и 89.7% при глиомах Grade III-IV. При глиомах с продолженным ростом флуоресцентный эффект отмечается в подавляющем большинстве наблюдений и имеет неомогенный характер вследствие неоднородной структуры тканей после предшествующей лучевой терапии.

4. В хирургии глиом, вовлекающих кору головного мозга, использование флуоресцентного режима позволяет уточнить место, размер для кортикотомии и границы резекции поверхностной части опухоли с учетом локализации сопряженных функционально значимых зон.

5. По данным множественных биопсий в хирургии глиом головного мозга различной степени злокачественности, чувствительность и специфичность лазерной спектроскопии превосходит аналогичные показатели для оптической флуоресцентной диагностики с использованием микроскопа с флуоресцентным модулем (88% и 82% vs 78% и 60%, соответственно).

6. При количественной оценке флуоресцентного эффекта с помощью отечественного оригинального лазерного спектроанализатора установлено, что имеется прямая зависимость между интенсивностью видимой флуоресценции и показателями количественной лазерной спектроскопии по протопорфиру IX. Аккумуляция протопорфирина IX достоверно выше в глиомах Grade III-IV по сравнению с опухолями Grade II. В структуре глиобластом достоверно большее накопление данного флуорофора отмечается в инфильтративной зоне.

7. Использование метода комбинированной спектроскопии с параллельной регистрацией спектров протопорфирина IX, рассеивающих свойств ткани, оксигенации и кровенаполнения позволяет расширить возможности интраоперационной метаболической навигации. Выявлена подгруппа смешанных глиом Grade II, близких по светорассеивающим свойствам к опухолям Grade III.

8. Интраоперационная флуоресцентная диагностика затруднена в случае кровотечения, низкой кратности включения флуоресцентного режима микроскопа и спектрокопа. Флуоресцентный эффект в хирургии глиом головного мозга не зависит от наличия олигокомпонента в структуре глиомы, дозы и длительности предоперационного приема дексаметазона, противосудорожных препаратов, наличия у пациента сахарного диабета и заболеваний желудочно-кишечного тракта.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Поскольку это исследование относится к классу проспективных когортных нерандомизированных исследований (класс II-III), практические рекомендации могут быть сделаны только на рекомендательном уровне или на уровне опций.

1. Наиболее оптимален мультимодальный подход в интраоперационной нейронавигации: сочетанное применение современных возможностей анатомической, физиологической и метаболической навигации с учетом

индивидуальных особенностей пациента в каждом конкретном случае и оснащенности клиники для уменьшения травматичности оперативного вмешательства на головном мозге.

2. Флуоресцентная навигация может быть использована в хирургии глиом различной степени злокачественности, а также глиом с продолженным ростом с целью контроля границ распространения опухоли, где визуальное и тактильное определение границ опухоли представляет определенные сложности.
3. Методы флуоресцентной диагностики и лазерной спектроскопии могут быть рекомендованы к применению в клиниках нейрохирургии, оснащенных оптическими микроскопами с фильтрами и источниками света для флуоресцентной навигации, а также оборудованием для биоспектрального анализа. Расширение объема резекции опухоли проводится с обязательным учетом физиологической дозволенности.
4. Применение в ходе оперативного вмешательства лазерной спектроскопии позволяет проводить количественную оценку аккумуляции протопорфирина IX в тканях, выявляя фокусы с наиболее высоким накоплением препарата.
5. Применение метода комбинированной спектроскопии с одновременным анализом показателей аккумуляции протопорфирина IX, светорассеяния, оксигенации и кровенаполнения расширяет диагностические возможности метода и может быть рекомендовано в хирургии нефлуоресцирующих глиальных опухолей головного мозга для проведения интраоперационной метаболической навигации.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Горайнов С. А.**, Потапов А. А., Гольбин Д. А., Зеленков П. В., Кобяков Г. Л., Гаврилов А. Г., Охлопков В. А., Шурхай В. А., Шелеско Е. В., Жуков В. Ю., Лощенов В. Б., Савельева Т. А., Кузьмин С. Г. «Флуоресцентная диагностика и лазерная биоспектроскопия как один из методов мультимодальной нейронавигации в нейрохирургии». **Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко» 2012; 6: 57-65.**
2. Потапов А. А., Гаврилов А. Г., **Горайнов С. А.**, Гольбин Д. А., Зеленков П. В., Кобяков Г. Л., Охлопков В. А., Жуков В. Ю., Шишкина Л. В., Шурхай В. А., Лощенов В. Б., Савельева Т. А., Грачев П. В., Холодцова М. Н., Кузьмин С. Г., Ворожцов Г.Н. «Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия в хирургии глиальных опухолей головного мозга». **Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко» 2012; 5: 3-12.**
3. Потапов А. А., Гаврилов А. Г., Зеленков П.В., Охлопков В. А., Шишкина Л. В., **Горайнов С. А.**, Шурхай В. А., Лощенов В. Б., Савельева Т. А., Грачев П. В., Холодцова М. Н., Кузьмин С. Г., Гольбин Д. А. «Использование флуоресцентной диагностики и лазерного спектрального анализа в хирургии внутричерепных менингиом» **Журнал «Вопросы нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко» 2012; 4: 12-18.**
4. Потапов А.А., Гаврилов А.Г., **Горайнов С.А.**, Д.А. Гольбин, Белов А.И., Зеленков П.В., Охлопков В.А., Шурхай В.А., Жуков В.Ю., Савельева Т.А., Лощенов В.Б., Холодцова М.Н., Кузьмин С.Г. Значение интраоперационной флуоресцентной диагностики и лазерной спектроскопии как одного из



компонентов мультимодальной нейронавигации в нейрохирургии. Сибирский международный нейрохирургический форум, Новосибирск, 18-21 июня 2012 (тезисы).

5. Потапов А.А., Корниенко В.Н., Пронин И.Н., Гаврилов А.Г., Подопригора Е.Е., Шишкина Л.В., **Горайнов С.А.**, Шурхай В.А., Лощенов В.Б., Савельева Т.А., Холодцова М.Н. Результаты и перспективы применения современных методов навигации и биоспектроскопии в нейрохирургии. Конференция «Медицинская физика и инновации в медицине» Троицк, Россия, 2012. (тезисы).
6. Юсубалиева Г.М., Зоркина Я.А., **Горайнов С.А.**, Савельева Т.А., Холодцова М.Н. Моноклональные антитела к опухоли-ассоциированным антигенам в интраоперационной диагностике глиобластом. **Вестник РГМУ**, 2012, специальный выпуск № 1, стр. 191-192.
7. Коновалов А. Н., Потапов А. А., Гаврилов А.Г., Шурхай В.А., **Горайнов С.А.**, Д.А. Гольбин, В.А. Охлопков, Г.Л. Кобыяков, П.Л. Калинин и соавт. и соавт. Современные технологии в нейрохирургии, том 1, глава 2, стр. 55-113 в книге: «Современные технологии и клинические исследования в нейрохирургии» (под редакцией А.Н. Коновалова). Москва – 2012, 368 стр.
8. Potapov A. A., Gavrilov A. G., Kobayakov G. L., Golbin D. A., Shishkina L. V., Kuzmin S. G., Loshenov V. B., Grachev P. V., Saveljeva T. A., Kholodtsova M. N., Shurhai V. A., **Goraynov S. A.**, Zelenkov P. V. Intraoperative multimodal navigation including laser fluorescence spectroscopy in surgery of malignant brain tumors. Materials of XIV European Congress of Neurosurgery. Rome, Italy, 2011.
9. Potapov A. A., Loshakov V. A., Usachev D. U., Golbin D. A., Shishkina L. V., Kuzmin S. G., Loshenov V. B., Grachev P. V., Saveljeva T. A., **Goryaynov S. A.** Multimodal navigation including laser spectroscopy in surgery of intracerebral tumors // Нейрохирургия и неврология Казахстана. 2011. – №2(23). – с. 6.
10. Potapov A. A., Gavrilov A. G., **Goryaynov S. A.**, Golbin D. A., Zelenkov P. V., Ohlopkov V. A., Shurkhay V. A., Zhukov V. Y., Saveleva T. A., Loschenov V. B., Kuzmin S. G. Intraoperative fluorescence diagnosis and laser spectroscopy in neurooncology. IX Congress of neurological surgeons 2-5 September 2012 Instambul.
11. Potapov A. A., Gavrilov A. G., **Goryaynov S. A.**, Golbin D. A., Belov A. I., Zelenkov P. V., Ohlopkov V. A., Shurkhay V. A., Zhukov V. Y., Saveleva T. A., Loschenov V. B., Kholodtsova M. N., Kuzmin S. G. The value of intraoperative fluorescence diagnosis and laser spectroscopy as a component of multimodal neuronavigation in neurosurgery. EANS, 2012 Bratislava.
12. Savelieva T.A., Kalyagina N.A., Kholodtsova M.N., Loschenov V.B., **Goraynov S. A.**, Potapov A.A. Numerical modelling and in vivo analysis of fluorescent and laser light backscattered from glial brain tumors, Proc. SPIE 8230, 82300L, 2012.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

**ФД** – флуоресцентная диагностика

**МРТ** – магнитно-резонансная томография

**ПФХ** – протопорфирин IX

**ПЭТ** – позитронно-эмиссионная томография

**5-АЛК** – 5-аминолевулиновая кислота

**ФК** – флуоресцентный контраст

**HGG** – high Grade gliomas (глиомы Grade III-IV WHO)

**LGG** – low Grade gliomas (глиомы Grade I-II WHO)

**ВФ** – видимая флуоресценция

**ЦНС** – центральная нервная система

**Cx43** – коннексин-43