

УДК 618.19-006.6-091.8-073.524

С. В. Пушкарев, С. А. Наумов, С. М. Вовк,  
В. А. Воловоденко, В. В. Удут

(Новосибирск – Томск)

### МЕТОДЫ ЛАЗЕРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И СПЕКТРОСКОПИИ ДИФФУЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ СОСТОЯНИЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Исследованы особенности спектров флуоресценции и спектров диффузного отражения ткани молочной железы в норме и при патологическом процессе, включая злокачественный рост. Оценено влияние на профиль спектров лучевой и химиотерапии. Показана возможность использования результатов, полученных *in vitro*, в условиях *in vivo* при исследовании спектров диффузного отражения. Изучено влияние на характер спектра *in vivo* вазоактивных веществ. Обсуждаются возможности дальнейшего совершенствования методов спектроскопии с целью их адаптации к практической медицине.

Проблема диагностики злокачественных опухолей, особенно на ранних стадиях развития, оценка степени их распространенности – одна из самых сложных в современной медицине. В настоящее время для ее решения все чаще привлекаются оптические методы: флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия диффузного отражения и некоторые другие [1–7]. Вместе с тем попытка решения данной проблемы с помощью перечисленных способов поставила перед исследователями ряд вопросов: какому методу отдать предпочтение; какой из перечисленных способов несет наиболее полезную диагностическую информацию; какой компонент ткани отвечает за ту или иную особенность спектра; как влияют лучевая и химиотерапия на спектральные характеристики тканей; дополнительное использование каких методов позволит повысить информативность оптической спектроскопии? Исходя из поставленных задач и построено данное исследование.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено в три этапа. На первом этапе (*in vitro*) изучался биопсийный материал, полученный во время операции от 143 пациенток с заболеваниями молочной железы. Ткань забиралась из здорового участка, на границе опухоль – здоровая ткань и из центра опухолевого очага. Биоптаты размерами 0,5 × 0,5 см помещались в кварцевую кювету и далее исследовались на лабораторном комплексе, включающем лазер ЛТН-402 с  $\lambda = 532$  нм, многожильный оптический волоконный жгут, монохроматор МДР-23 с разрешающей способностью 1,3 нм/мм, фотоэлектронный умножитель ФЭУ-79, электронные блоки крейта КАМАК 11, компьютер IBM PC. Луч от лазера подавался к кювете с образцами ткани. Флуорес-

центный «отклик» ткани через волоконную оптику и оптический блок подавался на входную щель монохроматора, а далее на ФЭУ, затем преобразованный электронными блоками сигнал поступал на ЭВМ, где представлялся в графическом виде. Условия снятия спектров были следующие: диаметр луча, возбуждающего излучение, 4 мм; среднее время снятия спектра 7 мин; средняя плотность мощности возбуждающего излучения 2,0 мВт/мм<sup>2</sup>; диапазон сканирования 400–800 нм. С целью исследования влияния жидкой составляющей ткани на вид спектра производилась отмывка части биоптатов в физиологическом растворе (0,9 %-ный раствор NaCl).

На втором этапе у 25 пациенток во время операции изучались спектры диффузного отражения тканей *in vivo* на разрезе и *in vitro* непосредственно после удаления препарата. Оценивалась также степень деградации спектров на протяжении часа после удаления участка ткани из организма. Для работы применялась модификация спектрального диагностического комплекса, позволяющего регистрировать и анализировать особенности спектров диффузного отражения. Источник света – галогенная лампа с непрерывным спектром излучения. Оптический зонд – неориентированный световодный жгут, одна половина которого использовалась для подачи излучения от источника к ткани, а другая – для транспортировки отраженного от ткани излучения в измерительный блок. В измерительном блоке происходило разложение отраженного излучения в спектр и преобразование его в электрические сигналы с помощью прибора с зарядовой связью.

На третьем этапе исследовались спектральные характеристики ткани у 25 пациенток с признаками объемного процесса во время выполнения диагностической пункционной биопсии.

С целью изучения вклада в профиль спектра отдельных составляющих ткани и воздействия на стромальный компонент исследуемой ткани (сосуды, протоки, соединительная ткань) использовалась фармакологическая проба с 0,1 %-ным раствором адреналина, который вводился в исследуемую ткань в количестве 0,5 мл. Для оценки влияния специфического лечения на спектральные характеристики лучевой и химиотерапии у одной части больных исследовались спектры без предоперационной терапии, у другой – после данного вида лечения. Контроль за поведением сосудов исследуемой ткани осуществлялся с помощью аппарата ультразвуковой томографии "Dornier-A15200". Статистическая обработка результатов проводилась после расчета диагностического критерия  $Q$  по формуле

$$Q = I_1 I_3 / I_2^2,$$

где  $I_1$  – интенсивность первого максимума;  $I_2$  – интенсивность в точке провала;  $I_3$  – интенсивность второго максимума; число наблюдений в каждой группе обозначалось  $n$ .

Полученные результаты группировались в соответствии с гистологической классификацией ткани согласно рекомендациям ВОЗ [8]. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием стандартных статистических программ.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ результатов исследований спектров флуоресценции образцов тканей молочной железы *in vitro*, взятых как из злокачественно измененных, так и из здоровых участков, позволил выявить в профиле спектра два выраженных пика флуоресценции (560 и 593 нм), что

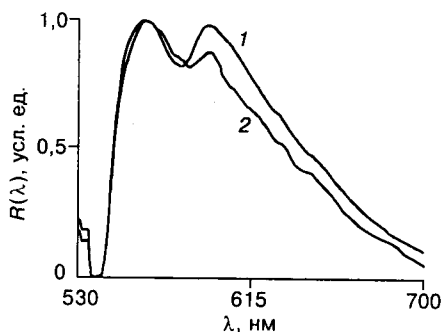


Рис. 1. Спектры флуоресценции нормального участка до (кривая 1) и после (кривая 2) отмывки в физиологическом растворе

согласуется с данными литературы [4]. Однако в зависимости от биологической модели опухолевого процесса, его анатомической принадлежности, объекта исследования по данным тех же авторов отмечается смещение пика флуоресценции в синюю или более длинноволновую сторону [4].

На рис. 1 представлены спектры флуоресценции биоптата нормального участка молочной железы (кривая 1), а на рис. 2 – злокачественно измененной ткани (кривая 1).

Опухолевая ткань имеет первый максимум флуоресценции на длине волны 563 нм, ширина максимума 11 нм (от 560 до 571 нм). Провал на кривой флуоресценции отмечался на длине волны 579 нм. Второй максимум – на длине волны 593 нм, ширина от 585 до 600 нм. Профиль спектра флуоресценции нормального участка ткани молочной железы имеет следующий вид: максимум на длине волны 562 нм, его ширина от 555 до 577 нм (т. е. в 2 раза больше, чем у злокачественно пораженной ткани). Провал наблюдается на длине волны 580 нм. Второй максимум – на длине волны 593 нм, т. е. совпадает со вторым максимумом у злокачественно измененной ткани. Ширина второго максимума от 586 до 604 нм. Расчет коэффициента, характеризующего профиль кривой спектра флуоресценции, проводился по вышеприведенной формуле.

Сравнительный анализ величины коэффициента  $Q$  в группах обследованных тканей свидетельствует о том, что величина критерия в группе, включающей все виды опухолевого процесса, равна  $1,51 \pm 0,04$  ( $n=238$ ), что

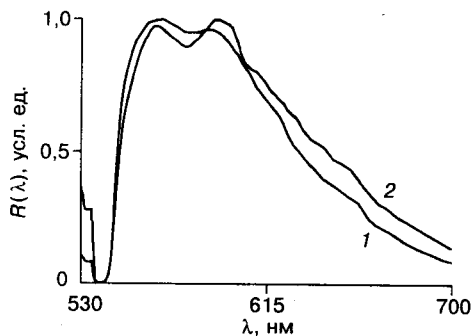


Рис. 2. Спектры флуоресценции злокачественно измененной ткани до (кривая 1) и после (кривая 2) отмывки в физиологическом растворе

достоверно ниже по сравнению со здоровыми участками ткани, где  $Q$  равняется  $1,64 \pm 0,04$  ( $n=161$ ,  $p < 0,01$ ). В группе, объединяющей биоптаты из злокачественно измененных участков ткани больных, не получавших предоперационное лечение,  $Q = 1,48 \pm 0,07$  ( $n = 30$ ), в то время как для участков, не пораженных опухолевым процессом,  $Q = 1,63 \pm 0,08$  ( $n=30$ ,  $p < 0,05$ ). После комплексной предоперационной терапии (лучевая и полихимиотерапия) данные различия становятся незначимыми. Эти результаты хорошо согласуются с исследованиями других авторов [3], изучавших процессы флуоресценции тканей у больных раком. В группе, где исследовались биоптаты пациенток, получавших только одну полихимиотерапию, диагностический критерий здоровых участков был достоверно выше, чем пораженных опухолью:  $Q = 1,38 \pm 0,04$  ( $n=81$ ) и  $Q = 1,58 \pm 0,06$  ( $n = 81$ ,  $p < 0,001$ ). В группе, где больные получали только лучевое лечение, данный коэффициент для биоптатов непораженных участков ткани также достоверно выше по сравнению с пораженными опухолевым процессом:  $Q = 1,5 \pm 0,05$  ( $n=30$ ) и  $Q = 1,79 \pm 0,09$  ( $n=24$ ,  $p < 0,001$ ). Для биоптатов, полученных от пациенток с фиброаденомой и узловыми формами мастопатии, статистических различий величины  $Q$  между здоровыми и патологически измененными участками ткани не отмечено.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что злокачественно измененная ткань обладает более выраженным биохимическим атипизмом, чем здоровая [9, 10]. Комплексная противоопухолевая терапия в большей мере, чем лучевая или химиотерапия, влияет на метаболизм как нормальных участков, так и неопластически измененных тканей у больных раком.

С целью выяснения влияния внутрисосудистого компонента ткани на вид спектра проведен опыт с отмывкой препаратов в физиологическом растворе в течение 15, 30 и 45 мин. На рис. 1, 2 представлены спектры флуоресценции здоровой и пораженной опухолью ткани до (кривые 1) и после (кривые 2) 15-минутной отмывки соответственно. Более длительная отмывка биоптатов каких-либо новых феноменов не выявила.

После отмывки биоптата, взятого из опухоли (кривая 2), происходит сдвиг первого пика флуоресценции на 3 нм в красную сторону (до 566 нм), ширина от 560 до 573 нм. Провал зафиксирован на длине волны 579 нм, сглаживается второй максимум на длине волны 593 нм. Профиль спектра флуоресценции здорового участка ткани (кривая 2) после отмывки претерпевает изменения, однако первый и второй максимумы сохраняются. Ширина первого максимума составила от 554 до 573 нм, а второго – от 588 до 597 нм, отмечается сдвиг провала на 3 нм в красную сторону (583 нм). Таким образом, отмывка приводит к снижению диагностического параметра, в большей степени это касается злокачественно измененного участка.

Результаты данного эксперимента свидетельствуют о том, что компонент тканей, отвечающий за характер профиля флуоресценции, находится в сосудистом русле: артериях, венах, лимфатических сосудах, и от состояния последних и их содержимого зависит характер спектра. В пользу данного тезиса свидетельствуют исследования цитоархитектоники сосудов опухолей [11].

Следующий метод, использованный при изучении опухолевой ткани *in vitro*, – метод спектроскопии диффузного отражения. Данный метод в большей мере отражает не ход биохимических реакций, а скорее, макроструктуру тканей, несет информацию о соотношении клеточной массы, соединительной ткани и т. д., что доказано в работах ряда исследователей [12].

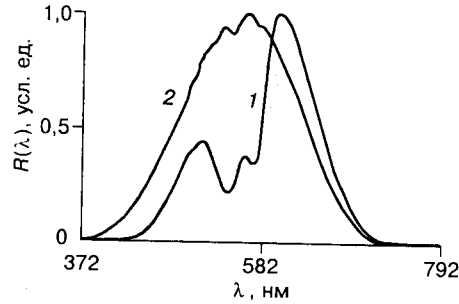


Рис. 3. Спектры диффузного отражения здорового участка (кривая 1) и опухоли (кривая 2)

На рис. 3 показан типичный спектр диффузного отражения биоптата, взятого из участков опухолевой и нормальной ткани молочной железы. Как видно из рисунка, спектр нормальной ткани отличается от спектра ткани, пораженной опухолевым процессом. Эти отличия заключаются в наличии у нормальной ткани пика отражения на длине волны от 510 до 520 нм, выраженного поглощения в области 540–560 нм и второго пика в области 600 нм. Ткань, пораженная опухолью, отражает интенсивнее, и имеется провал на длине волны 550 нм. Расчеты диагностического критерия  $Q$  и последующий статистический анализ (см. таблицу) свидетельствуют о том, что для участков ткани с любым патологическим процессом коэффициент  $Q$  достоверно

Значение диагностического критерия  $Q$ ,  
рассчитанного по спектрам отражения в исследуемых группах

| Группа исследуемой ткани   | Центр опухоли<br>( $M \pm m$ )<br>( $n$ ) | Неизменная ткань<br>( $M \pm m$ )<br>( $n$ ) | $P$        |
|--|---|--|------------|
| Все виды опухолевых процессов<br><i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>          | $1,01 \pm 0,04$<br>( $n = 74$ )           | $1,95 \pm 0,21$<br>( $n = 74$ )              | $<0,001$   |
| Фиброаденома <i>in vitro</i> (биоптат)                                     | $1,14 \pm 0,12$<br>( $n = 4$ )            | $1,93 \pm 0,44$<br>( $n = 4$ )               | —          |
| Узловые формы мастопатии<br><i>in vitro</i> (биоптат)                      | $0,84 \pm 0,16$<br>( $n = 6$ )            | $1,45 \pm 0,11$<br>( $n = 6$ )               | $<0,01$    |
| Рак леченный и нелеченный <i>in vitro</i>                                  | $1,27 \pm 0,09$<br>( $n = 12$ )           | $1,36 \pm 0,14$<br>( $n = 12$ )              | $\leq 0,5$ |
| Фиброаденома <i>in vivo</i><br>во время операции                           | $0,87 \pm 0,04$<br>( $n = 12$ )           | $1,44 \pm 0,18$<br>( $n = 12$ )              | $<0,005$   |
| Узловые формы мастопатии <i>in vivo</i><br>во время операции               | $1,03 \pm 0,12$<br>( $n = 9$ )            | $2,4 \pm 0,75$<br>( $n = 9$ )                | $<0,06$    |
| Рак леченный и нелеченный <i>in vivo</i><br>во время операции              | $0,89 \pm 0,05$<br>( $n = 14$ )           | $2,34 \pm 0,6$<br>( $n = 14$ )               | $<0,05$    |
| Все виды опухолевых процессов<br><i>in vivo</i> через светооптический зонд | $1,16 \pm 0,09$<br>( $n = 17$ )           | $2,45 \pm 0,58$<br>( $n = 17$ )              | $<0,05$    |

ниже по сравнению с нормальным фрагментом молочной железы. В данной группе объединены результаты исследований как *in vitro*, так и *in vivo*. Такое объединение стало возможным только после эксперимента по деградации препарата.

С целью экстраполяции результатов, полученных *in vitro*, в условиях *in vivo* нами были исследованы спектры отражения нормальной и «больной» ткани при нарушении кровообращения. Для этого регистрировались спектры отражения на разрезе во время операции и после удаления препарата в течение 1,5 ч через каждые 15 мин. Следует отметить, что профиль спектра практически не изменялся в течение этого времени. Однако интенсивность отражения на длине волны 590 нм подвергалась значительной динамике (рис. 4).

Из рис. 4 видно, что нормальная ткань в условиях нарушения кровообращения деградирует значительно быстрее, чем опухолевая. Это можно объяснить особенностями метаболизма злокачественно измененной ткани [9, 10]. Дальнейшие исследования проводились в условиях *in vivo* во время хирургической операции для оценки степени распространенности процесса, диагностики метастазов и при выполнении диагностической аспирационной биопсии.

Расчет величины  $Q$  для группы с узловыми мастопатиями, являющимися облигатными или факультативными предраковыми состояниями ткани, выявил статистически значимое снижение этого показателя «больных» участков по сравнению с неизменными. Фиброматозная ткань (мастопатии) при исследовании спектров отражения *in vivo* имела такую же тенденцию. Обследование больных с установленным диагнозом злокачественной опухоли *in vivo* в ходе выполнения операции выявило достоверное снижение диагностического критерия «больного» участка по сравнению со здоровым. Исследование спектров диффузного отражения через оптический зонд во время проведения диагностической пункционной биопсии *in vivo* позволило установить высокую степень различия опухоли и нормальной ткани молочной железы. Во время пункционной биопсии в ряде случаев (15 %) не отмечалось различий в характере спектров между нормальной и патологически измененной тканью (рис. 5). В данных условиях для дифференциальной диагностики была использована методология «активного эксперимента», а в качестве вещества, влияющего на состояние исследуемой ткани, использова-

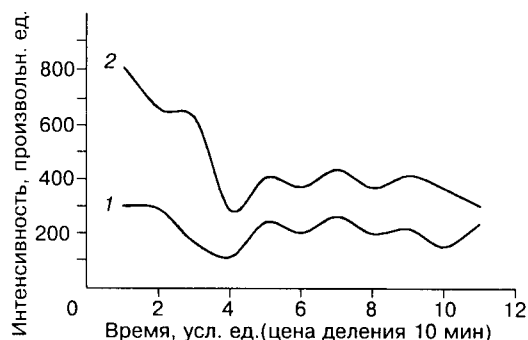


Рис. 4. Деградация во времени спектров диффузного отражения нормальной ткани (кривая 1) и злокачественной опухоли (кривая 2) на длине волны 590 нм

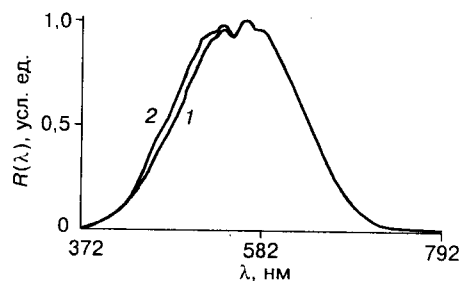


Рис. 5. Спектры диффузного отражения нормальной ткани (кривая 1) и злокачественной опухоли (кривая 2) до пробы с адреналином

лась проба с адреналином [13, 14]. На рис. 6 представлены результаты данного исследования, которые свидетельствуют о том, что нормальный участок ткани *in vivo* сильнее реагирует на введение vasoактивного вещества. Это указывает на сохранность активно функционирующих сосудов в непораженном участке и снижение их числа в опухолевой ткани [14].

Таким образом, исследование молочной железы при ее патологии методами флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения позволяет выявлять стойкие отличия оптических характеристик нормальной ткани от патологически измененной как *in vitro*, так и *in vivo*, что свидетельствует о значительных перспективах данных способов диагностики.

С целью дальнейшего развития предлагаемых методов следует считать целесообразным создание: спектроскопической базы данных *in vivo* по патологическим процессам (воспаление, пролиферация, дегенерация и т. д.), а также по гистотипам пролиферации; базы данных по типам нормальной ткани, так как на ее состояние может влиять возраст, состояние физиологического цикла и ряд других факторов; усредненных эталонов спектров различных тканей; базы спектров различных участков ткани молочной железы (молочные протоки, кровеносные сосуды, железистая ткань и т. д.).

Авторы выражают благодарность канд. физ.-мат. наук В. И. Петрову (ГОИ им. С. И. Вавилова) и проф. Е. С. Смольянинову (НИИ онкологии ТНЦ РАМН) за участие в обсуждении полученных результатов и планировании экспериментов, а также инженерам Техноцентра «Лазерные технологии»

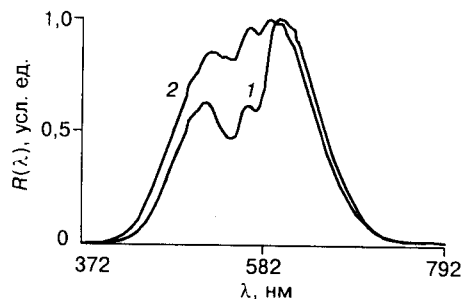


Рис. 6. Спектры диффузного отражения нормальной ткани (кривая 1) и опухолевого узла (кривая 2) после пробы с адреналином

НИКИЭТ С. С. Олефиренко и С. А. Стафееву за техническое обеспечение проведенных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Норманский В. Е.** Перспективы использования фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики при раке молочной железы // Маммология. 1993. № 2. С. 38.
2. **Полсачев В. И., Лазарев В. В., Степанянц Г. Р. и др.** Возможности применения флуоресцентного анализа в дифференциальной диагностике заболеваний молочной железы // Маммология. 1993. № 3. С. 30.
3. **Шенталь В. В., Пачес А. И., Лошенов В. Б.** Аутофлуоресцентная диагностика злокачественных опухолей головы и шеи // Вестник АМН. 1996. № 1. С. 13.
4. **Alfano R. R., Tang G. C., Pradan A. et al.** Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues // IEEE J. Quantum Electron. 1987. QE-23. P. 1806.
5. **Хайруллина А. Я., Олейник Т. В., Буй Л. М. и др.** Банк данных по оптическим и биофизическим свойствам крови, биотканей и биожидкостей в видимой и ближней ИК-областях спектра // Оптический журн. 1997. 64, № 3. С. 34.
6. **Королевич А. Н., Олейник Т. В., Севковский Я. И., Хайруллина А. Я.** Особенности спектров диффузного отражения и пропускания нормальных и опухолевых тканей // Журн. прикл. спектроскопии. 1993. 58. № 5–6. С. 555.
7. **Пат. 4930516 США.** Метод определения раковой ткани с помощью видимого естественного свечения /R. Alfano. Оpubл. 05.06.90.
8. **Патологоанатомическая диагностика опухолей человека: Руководство в 2 томах** /Под ред. Н. А. Краевского, А. В. Смольяникова, Д. С. Саркисова. М., 1993. С. 560.
9. **Сейц И. Ф., Князев П. Г.** Молекулярная онкология (Руководство для врачей). Л.: Медицина. 1986.
10. **Напалков Н. П.** Общая онкология. Л.: Медицина, 1989.
11. **Дикштейн Е. А., Василенко И. В., Данильченко С. А., Шевченко Н. И.** Ультраструктура сосудов рака молочной железы // Архив патологии. 1990. 52, № 11. С. 41.
12. **Хайруллина А. Я., Олейник Т. В., Кастев И. Л.** О возможности оптической диагностики одно- и многослойных структур, моделирующих органы человека // Оптика и спектроскопия. 1993. 75, вып. 1. С. 130.
13. **Кассиль Г. Н.** Внутренняя среда организма. М., 1983.
14. **Пушкарев С. В., Наумов С. А., Смольянинов Е. С. и др.** Реакция сосудов ткани молочной железы на вазоактивные вещества в норме и при патологии // Бюл. СО РАМН. 1997. № 1. С. 91.

*Поступила в редакцию 16 февраля 1999 г.*