

Х.А. Аршакян, С.В. Пушкарёв, Е.С. Половников, Ю.П. Мешалкин

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛАЗЕРОМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СМЫВОВ С ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

ГОУ ВПО Новосибирский ГМУ

ГОУ ВПО Новосибирский ГТУ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

В работе продемонстрированы диагностические возможности спектроскопии лазерноиндуцированной флуоресценции для выявления онкологических заболеваний шейки матки. Объясняются возможные пути формирования спектральных характеристик тканей при различных состояниях; высказывается предположение о возможности создания тест-методов ранней диагностики онкологических заболеваний шейки матки по результатам лазерноиндуцированной флуоресценции.

Ключевые слова: диагностика, смывы с шейки матки, онкологические заболевания.

В настоящее время известно, что раннее выявление и радикальное лечение предраковых заболеваний (дисплазия или внутриэпителиальная неоплазия шейки матки) является эффективной мерой для предотвращения инвазивного рака. В связи с этим большое значение приобретают диагностические методы для организации массового скрининга населения. Опыт Скандинавских стран, успешно организовавших скрининг, основанный на исследовании рутинного мазка по Папаниколау, показывает, что качество мазков и квалификация цитологов — ключевой момент для получения правильного цитологического диагноза. Очевидно, что поиск любых альтернативных методов ранней диагностики заболеваний шейки матки является актуальной задачей. Особый интерес представляют экспрессные и инструментальные методы, на основе которых могут быть созданы высокочувствительные тест-системы. Подобные методы могут быть разработаны на основе флуоресцентных и иммуно-флуоресцентных измерений.

Диагностические возможности флуоресцентных методов в онкологии, в первую очередь, связаны с флуоресценцией эндогенных и экзогенных порфиринов, накапливаемых в опухолевых клетках [1, 2, 3]. По распределению флуоресцирующих порфиринов или фотосенсибилизаторов второго поколения (например фталоцианинов) возможно построение изображения опухоли *in vivo* при небольшой глубине ее залегания, в том числе с использованием лазерного возбуждения [4, 5].

Регистрация автофлуоресценции биологических образцов также нашла применение в диагностике. При этом решающую роль играет длина

волны возбуждения. В случаях УФ возбуждения ($\lambda \leq 280$ нм) флуоресценция биологических образцов, как правило, вызвана белковой флуоресценцией (330-375 нм) и флуоресценцией кофактора NADH (425-475 нм) [6].

Белковая флуоресценция прежде всего связана с флуоресценцией триптофана ($\lambda_{\text{погл}} = 280$ нм) и имеет квантовый выход около 21%. Флуоресцирующей группой триптофана является индольный хромофор.

Кофактор NADH флуоресцирует не так сильно, как триптофан. Максимумы его поглощения и испускания находятся при 340 и 450 нм соответственно. Флуоресцирующей группой является восстановленное никотинамидное кольцо, причем его флуоресценция частично потушена за счет переноса энергии возбуждения на аденин. В нейтральных водных растворах NADH образует как минимум две конформации. Одна из них открытая, в которой скелет рибоза — дифосфат-рибоза вытянут, другая закрытая, в которой скелет свернут, а два гетероцикла, адениновый и никотинамидный, расположены параллельно и взаимодействуют друг с другом [7].

При некоторых патологиях интенсивность флуоресценции в области 440-475 нм (связанной, как правило, с концентрацией и конформацией NADH) оказывается значительно выше, чем в норме, и отношение интенсивностей флуоресценции на длинах волн 350 и 450 может рассматриваться в качестве самостоятельного диагностического критерия [8].

Контроль за эффективностью лечения онкологических заболеваний можно также проводить

на основе мониторинга интенсивности лазерно-индуцированной флуоресценции NADH опухолевых клеток, которая уменьшается в процессе проведения фотодинамической терапии [6].

На примере флуоресценции чешуйчатых эпителиальных клеток показано возрастание интенсивности флуоресценции NADH в менструальном цикле [9].

Большие диагностические возможности флуоресцентных методов были продемонстрированы в случае предрака цервикального канала. В качестве диагностического алгоритма использовались различия в форме линии и интенсивности флуоресценции цервикальной ткани в области 420-440 нм при возбуждении излучением азотного лазера (337 нм) *in vivo* [10]. При этом спектры флуоресценции ткани были предварительно промоделированы на растворах с разным содержанием коллагена, эластина, NAD H и FAD (флавинадениндинуклеотида). Отметим, что в этом случае белковая флуоресценция не наблюдалась из-за большой длины волны возбуждающего излучения ($\lambda_{ex} = 337$ нм) и поэтому при моделировании не рассматривалась.

Из спектров флуоресценции цервикальной ткани определялся параметр S:

$$S(\lambda_{em}) = \frac{C_1 C(\lambda_{em}) + C_2 E(\lambda_{em}) + C_3 N(\lambda_{em}) + C_4 F(\lambda_{em})}{C_5 [A(\lambda_{ex}) + A(\lambda_{em})] + C_6} \quad (1)$$

где $C(\lambda_{ex})$, $E(\lambda_{ex})$, $N(\lambda_{ex})$ и $F(\lambda_{ex})$ — приведенные нормализованные интенсивности флуоресценции коллагена, эластина, NAD и FAD в растворах; $C_1 - C_4$ — абсолютные вклады этих хромофоров в спектр тканей; $[A(\lambda_{ex}) + A(\lambda_{em})]$ — нормализованный вклад флуоресценции и поглощения оксигемоглобина в концентрации C_5 ; C_6 — фактор ширины линии спектра флуоресценции цервикальной ткани.

Несмотря на достаточно трудоемкую процедуру выделения вклада каждого хромофора в спектры тканей и определение параметров S, полученное распределение образцов по этому параметру показало возможность создания достаточно надежного диагностического алгоритма. Как следует из рисунка 1, образцы нормальной ткани (подтвержденные данными кольпоскопии) имеют меньший параметр S, чем образцы с вирусом папилломы человека или цервикальной внутриэпителиальной неоплазией. Полученный диагностический алгоритм продемонстрировал чувствительность около 92% и специфичность — 90% к данным видам патологии [10]. Таким образом, спектры флуоресценции тканей, как и других биологических проб и жидкостей, являются потенциальным объектом для диагностики большого числа заболеваний различной этиологии.

Современная реализация флуоресцентной спектроскопии, основанная на регистрации лазерноиндуцированной флуоресценции (ЛИФ), позволила существенно увеличить чувствительность метода и исследовать не только автофлуоресценцию биологических тканей, но и тканевых экстрактов, растворов микробиопсий, биологических жидкостей и смывов. На основе лазерной флуоресцентной спектроскопии разрабатываются методы диагностики неопластических заболеваний шейки матки и вульвы [11].

В настоящей работе рассматриваются диагностические возможности лазерной флуоресцентной спектроскопии для раннего выявления патологии шейки матки по образцам смывов.

Материалы и методы

Все пробы были получены при обследовании пациенток гинекологических клиник г. Новосибирска. Обследованные женщины разделены на 3 группы: 1-я группа — контроль (6 чел.), 2-я группа — женщины с гинекологическими заболеваниями, не связанными с онкологической патологией (21 чел.), 3-я группа — женщины с онкопатологией (18 чел.).

Забор образцов производился после промывания шейки матки и влагалища 0,9% раствором NaCl и высушивания. После чего марлевым шариком убиралась слизь с поверхности шейки и цервикального канала. С помощью ложечки Фолькмана производились соскобы с поверхности шейки матки и цервикального канала. Часть полученного материала наносилась на стекло для цитологического исследования, а другая часть материала помещалась в пластмассовую (силиконовую) пробирку с 3 мл 0,9% раствора NaCl и транспортировалась в течение 15-20 минут до лазерной установки для проведения спектральных исследований. Измерения спектров лазерноинду-

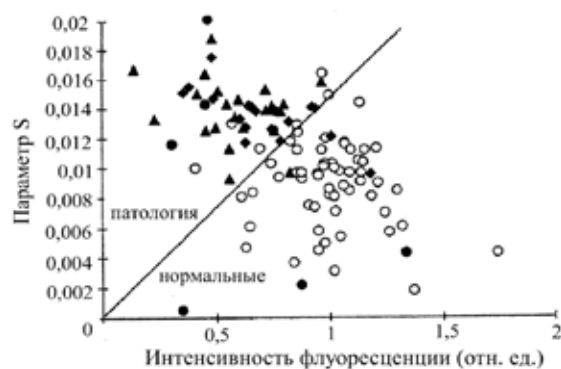


Рис. 1. Диагностический критерий на основе лазерноиндуцированной флуоресценции цервикальной ткани *in vivo*:

- — нормальная ткань; ● — воспаление;
- ◆ — вирус папилломы человека;
- ▲ — цервикальная интраэпителиальная неоплазия

цированной флуоресценции образцов проводилась в кварцевых кюветках с длиной оптического пути в 1 см. Объем пробы составлял 2,5 мл.

Измерение флуоресценции производилось на автоматизированном лазерном комплексе оригинальной конструкции, защищенной патентом [12]. Источником УФ возбуждающего излучения являлся твердотельный неодимовый (Nd:YAG) лазер с модуляцией добротности и внерезонаторной генерацией второй гармоники ($\lambda=532$ нм) нелинейным кристаллом КТР и четвертой гармоники ($\lambda=266$ нм) кристаллом ВВО. На выходе лазер генерировал импульсы длительностью 200 нс, частотой следования 3 кГц и средней мощностью 3-5 мВт с длиной волны 266 нм.

Излучение четвертой гармоники отделялось призмой и после фильтра, отсекающего излучение второй гармоники, заводилось сверху в кварцевую кювету с образцом. Флуоресценция регистрировалась через боковую грань кюветы, расположенной перед входной щелью монохроматора, фотоумножителем ФЭУ 140.

Управление комплексом, сбор и обработка данных проводились с помощью специализированной платы расширения компьютера IBM PC [13]. При регистрации спектров образцов осуществлялось усреднение до 10000 измерений на каждой длине волны в диапазоне длин волн от 275 до 500 нм с шагом 2 нм. Среднее время записи спектра составляло 4-5 минут. При построении спектров флуоресценции учитывалась спектральная чувствительность ФЭУ.

Результаты и обсуждение

Нормальная шейка матки

Типичный спектр лазерноиндуцированной флуоресценции смыва с нормальной шейки матки при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 266 нм характеризуется одним максимумом в области длин волн 330-340 нм, соответствующим белковой флуоресценции (Рис. 2). При соблюдении постоянства процедуры забора пробы интенсивность флуоресценции коррелирует с числом клеток в пробе, определенных цитологическими методами.

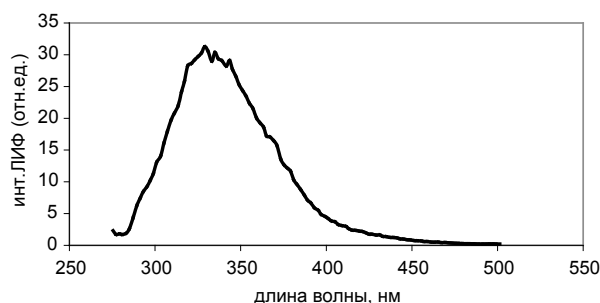


Рис. 2. Спектр лазерноиндуцированной флуоресценции смыва с шейки матки в норме

Относительная интенсивность лазерноиндуцированной белковой флуоресценции смывов с шейки матки может рассматриваться в качестве диагностического критерия.

Однако нами в качестве диагностического критерия предлагается использовать отношение интенсивности белковой флуоресценции (I (343 нм)) к интенсивности флуоресценции NADH (I (435 нм)). В случае смыва с неизменной шейки матки сколько-нибудь заметного сигнала в области 400-500 нм не наблюдается, но присутствует шумовой компонент, величина которого определяется условиями регистрации спектра (напряжение ФЭУ, шумы усилителей) и который можно использовать при вычислении отношения $I(343)/I(435)$. Для смывов с нормальной шейки матки (6 образцов) это отношение составило $17,86 \pm 6,2$ (Рис. 3).

Шейка матки при различных состояниях, не связанных с онкологической патологией

Исследовали образцы смывов при различных состояниях шейки матки, в том числе полип шейки матки; беременность (малый срок); гипертрофия шейки матки; шейка матки после родов; шейка матки при бесплодии; шейка матки при беременности 8 недель.

Во всех случаях в спектрах лазерноиндуцированной флуоресценции наблюдался только сигнал белковой флуоресценции, относительная интенсивность которого была достоверно выше, чем в случае нормальной шейки матки. Наибольшая концентрация белка в смывах с шейки матки наблюдалась при полипе шейки матки (47,4), ранних сроках беременности (33,2), гипертрофии шейки матки (33,1). На поздних сроках беременности уровень белка в смывах с шейки матки

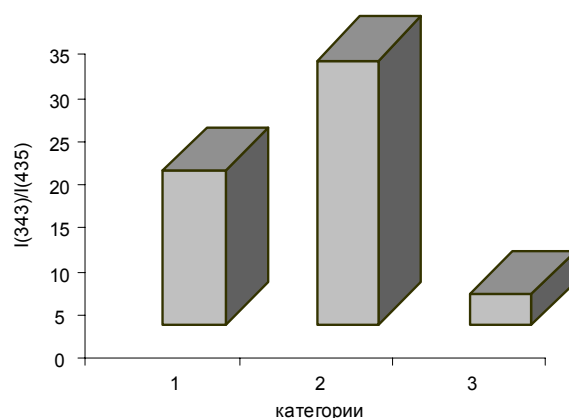


Рис. 3. Гистограмма распределения относительной интенсивности флуоресценции смывов с шейки матки при разных состояниях:
1 — шейка матки в норме; 2 — состояния, не связанные с онкологическими патологиями;
3 — онкологические патологии

снижался до значений, близких к норме (19,0). Среднее значение отношения $I(343)/I(435)$ для образцов смывов с шейки матки при различных состояниях, не связанных с онкологической патологией, составило — $30,58 \pm 9,85$ (Рис. 3).

При культе шейки матки интенсивность белковой флуоресценции была почти в два раза ниже нормы (10,2), однако при этом какого-либо сигнала от NADH в области длин волн — 435 нм не наблюдалось.

В данной работе мы не преследовали цель получить статистически достоверные отличия интенсивности белковой флуоресценции при разных состояниях шейки матки. В связи с этим в ряде случаев (полип, гипертрофия, культя) измерения выполнены для единичных образцов. Вместе с тем мы не исключаем существования зависимости концентрации белка в смывах с шейки матки от ее состояния, даже в отсутствие патологии. Выяснение существования подобной зависимости станет предметом отдельного исследования.

Онкологическая патология

При тяжелой дисплазии шейки матки во флуоресцентных спектрах смывов появляется плохо разрешенный компонент NADH в виде плеча (Рис. 4). При этом заметно уменьшается интенсивность белкового компонента и в результате отношение этих сигналов заметно уменьшается — $3,0 \pm 0,8$.

В случае рака *in situ* максимум флуоресценции NADH становится хорошо разрешенным и в отдельных случаях по интенсивности почти достигает уровня белковой флуоресценции (Рис. 5). Усредненное значение — $2,5 \pm 0,5$. При этом в спектре может наблюдаться узкий сигнал комбинационного рассеяния с длиной волны 298 нм. Природа этого сигнала связана с комбинационным рассеянием лазерного излучения на Q-ветви колебательной полосы молекул H_2O , и ее интенсивность не зависит от содержания белка в объеме пробы. Обычно сигнал комбинационного рассеяния смещен на $3651,7 \text{ см}^{-1}$ относительно возбуждающего излучения и по форме линии повторяет спектр лазерного излучения, что позволяет его надежно дифференцировать в сложных спектрах биологических проб. Интенсивность сигнала комбинационного рассеяния зависит только от объема пробы и интенсивности возбуждающего излучения и не зависит от содержания белка в пробе. Интенсивность этого сигнала можно использовать для оценки концентрации флуоресцирующего вещества в биологической пробе [14]. Уровню сигнала комбинационного рассеяния соответствует концентрация порядка 10^{-9} М , что свидетельствует о достаточно низкой концентрации веществ бел-

ковой природы в пробах и еще более низкой концентрации NADH, которые невозможно измерить другими существующими методами.

При эндофинной форме рака в спектре лазерноиндуцированной флуоресценции также хорошо проявляется сигнал флуоресценции NADH, но отношение сохраняется на достаточно высоком уровне — $8,3 \pm 1,0$ из-за достаточно высокой интенсивности белковой флуоресценции.

Кардинальное изменение спектров лазерноиндуцированной флуоресценции смывов с шейки матки наблюдается при раке III стадии. В этом случае в спектре наблюдается значительный сигнал флуоресценции NADH (Рис. 6). Интенсивность флуоресценции столь значительна и сдвинута в длинноволновую область спектра, что позволяет наблюдать ее и не вооруженным глазом (синяя флуоресценция). По интенсивности

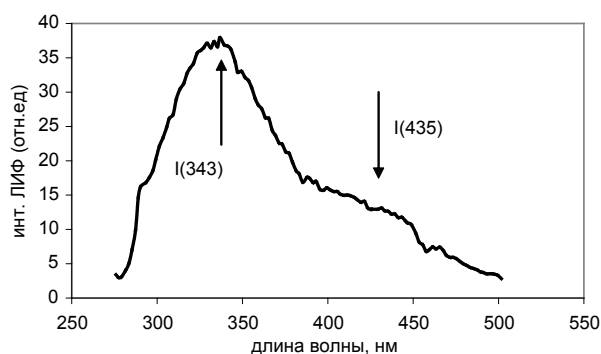


Рис. 4. Спектр лазерноиндуцированной флуоресценции смыва с шейки матки при тяжелой дисплазии

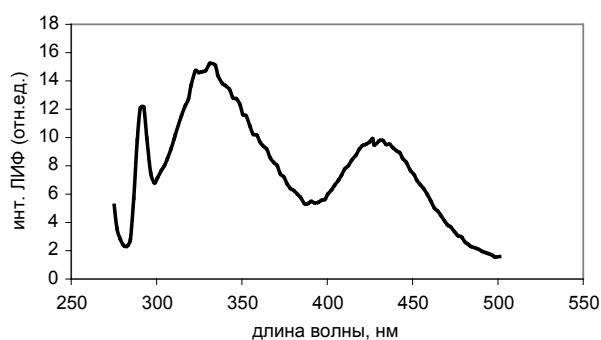


Рис. 5. Спектр лазерноиндуцированной флуоресценции смыва с шейки матки — рак *in situ*

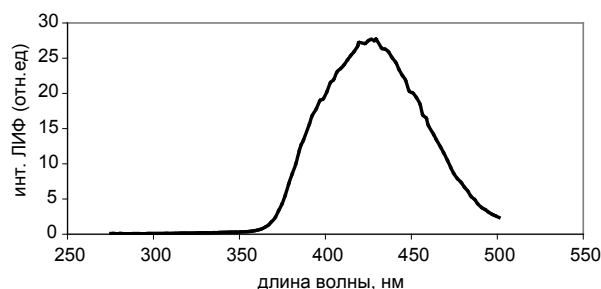


Рис. 6. Спектр лазерноиндуцированной флуоресценции смыва с шейки матки — рак III стадии

белковая флуоресценция оказывается существенно меньшей по отношению к интенсивности флуоресценции NADH, в результате чего отношение $I(343)/I(435)$ становится значительно меньше 1 ($0,02 \pm 0,02$)

Увеличение интенсивности флуоресценции на длине волны 450 нм при онкологических патологиях может объясняться связыванием NADH с белками. В этом случае флуоресценция NADH значительно возрастает (квантовый выход увеличивается в 4 раза). Такое увеличение выхода обычно интерпретируют как следствие связывания NADH в вытянутой конформации, что подтверждается изучением дифракции рентгеновских лучей на гидрогеназах [7]. Возможно, что с развитием онкологической патологии увеличивается доля связанного с белком NADH, что и приводит к появлению заметного сигнала флуоресценции с максимумом около 450 нм.

Таким образом, интенсивность флуоресценции NADH в смывах с шейки матки коррелирует с течением и степенью тяжести онкологического заболевания шейки матки и может стать основой для создания методов диагностики на основе флуоресцентной спектроскопии и иммуно-флуоресцентных методов.

DIAGNOSTIC FACILITIES OF LASER-INDUCED FLUORESCENCE OF CERVIX UTERI SWABS IN CASE OF ONCOLOGY DISEASES

Kh.A. Arshakyan, S.V. Pushkarev, E.S. Polovnikov, Yu.P. Meshalkin

The diagnostic facilities of a laser-induced fluorescence spectroscopy for cervix uteri oncology diseases detection have been displayed in this research. Possible ways of forming the tissues spectral characteristics under different conditions have been explained; assumption of possibility to create the test-methods for early diagnosis of cervix uteri oncology diseases based on the results of laser-induced fluorescence spectroscopy has been observed.

Литература

1. Policard A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood / A. Policard // C. R. Soc. Biol. — 1924. — Vol. 91. — P. 1423-1428.
2. Lipson R.A., Baldes E.J., Olsen A.M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection / R.A. Lipson, E.J. Baldes, A.M. Olsen // J. Nat. Cancer Inst. — 1961. — Vol. 26. — P. 1-11.

3. Ackroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy / R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed // Photochem. Photobiol. — 2001. — Vol. 74. — P. 656-669.

4. Cubeddu R., Pifferi A., Taroni P. et al. Fluorescence imaging during photodynamic therapy of experimental tumors in mice sensitized with disulfonated aluminium phthalocyanine / R. Cubeddu, A. Pifferi, P. Taroni et al. // Photochem. Photobiol. — 2000. — Vol. 72. — P. 690-695.

5. Hewett J., Nadeau V., Ferguson J. et al. The application of a compact multispectral imaging system with integrated excitation source to in vivo monitoring of fluorescence during topical photodynamic therapy of superficial skin cancers / J. Hewett, V. Nadeau, J. Ferguson et al. // Photochem. Photobiol. — 2001. — Vol. 74. — P. 278-282.

6. Poque B.W., Pitts J.D., Mycek M.A. et al. In vivo NADH fluorescence monitoring as an assay for cellular damage in photodynamic therapy / B.W. Poque, J.D. Pitts, M.A. Mycek et al. // Photochem. Photobiol. — 2001. — Vol. 74. — P. 817-824.

7. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков / А.П. Демченко. — Киев: Наукова думка. — 1988. — 280 с.

8. Perk M., Flynn G.J., Smith C. et al. Laser-induced fluorescence emission. I. The spectroscopic identification of fibrotic endocardium and myocardium / M. Perk, G.J. Flynn, C. Smith et al. // Laser Surg. and Med. — 1991. — Vol. 11. — №6. — P. 523-534.

9. Chang S.K., Dawood M.V., Staerckel G. et al. Fluorescence spectroscopy for cervical precancer detection. Is there variance across the menstrual cycle? / S.K. Chang, M.V. Dawood, G. Staerckel et al. // J. Biomed. Opt. — 2002. Vol. 7. — P. 595-602.

10. Ramanujam N., Mitchell M.F., Mahadevan A. et al. In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence / N. Ramanujam, M.F. Mitchell, A. Mahadevan et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 10193-10197.

11. Петрова С.А. Оптимизация диагностики неопластических заболеваний шейки матки и вульвы с использованием оптической когерентной томографии и флуоресцентной спектроскопии / С.А.Петрова // Автореф. дисс. канд. мед. наук. Нижний Новгород, 2003.

12. Патент на полезную модель № 44182 «Лазерный флуоресцентный детектор-спектрометр». — Заявка 2004122202, приоритет 20 июля 2004 г.

13. Алфимов Е.Е., Грошев Д.Е., Макуха В.К., Мешалкин Ю.П. Плата расширения для автоматизированного лазерного спектрометра на базе компьютера IBM PC / Е.Е. Алфимов, Д.Е. Грошев, В.К. Макуха, Ю.П. Мешалкин // Приборы и техника эксперимента. — 1998, №2. С. 164-165.

14. Майоров Ф.А., Мешалкин Ю.П., Политова Ю.А. Лазерно-индуцированная флуоресценция органических примесей в питьевой воде / Ф.А. Майоров, Ю.П. Мешалкин, Ю.А. Политова // Оптика атмосферы и океана. — 2000. — №10. — С. 914-917.