

И.А. Новиков, Я.О. Груша, Н.П. Кирюшенкова

Научно-исследовательский институт глазных болезней РАМН, Москва, Российская Федерация

Повышение эффективности флуоресцентной диагностики новообразований кожи и слизистых оболочек в офтальмоонкологии

Разработанный в нашем институте в 2006 г. метод диагностики новообразований кожи и слизистых оболочек на основе нативной аутофлуоресценции протопорфирина IX позволяет оценить активность пролиферации новообразования, не прибегая к использованию индукторов флуоресценции, а также построить вероятностную границу процесса. Целью данного исследования стало повышение эффективности метода за счет введения дополнительного параметра, количественно описывающего степень взаимопроникновения (интерпозиции) опухоли и окружающих тканей. Были проанализированы данные аутофлуоресцентной диагностики 97 пациентов и установлены медико-биологические причины возникновения сомнительных результатов (во всех случаях имелся гистологический контроль). Решением проблемы стало введение коэффициента интерпозиции K_{dih} , представляющего собой усредненную обратную величину к вероятности прохождения границы опухоли/здоровая ткань. Повторный анализ флуоресцентных изображений с использованием двух показателей — фактора пролиферации и коэффициента интерпозиции — продемонстрировал повышение специфичности метода с 0,69 до 0,85 при сохранении показателя чувствительности, равного 0,7. Авторы считают, что метод может быть рекомендован для применения в общей онкологии и дерматологии.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, аутофлуоресценция, протопорфирин IX, фактор пролиферации, онкология. (Вестник РАМН. 2012; 10:62–69).

62

Введение

Флуоресцентная диагностика заболеваний кожи и слизистых оболочек известна медицине с 40-х гг. XX в. [1]. Она основана на кратковременной фотолюминесценции, т.е. непродолжительном свечении вещества, возникающем после поглощения им светового излучения [2].

Из всех флуорофоров организма наибольший интерес для онкологии представляет протопорфирин IX, предшественник гема, содержание которого достоверно выше в активно делящихся опухолевых клетках, чем в здоровой ткани [3]. В целях диагностики возможно определение относительного содержания протопорфирина IX в интересующем участке ткани методом локальной спектроскопии или посредством анализа флуо-

ресцентных изображений. Второе направление является более перспективным, т.к. позволяет проводить пространственную оценку распределения флуорофора и визуализировать границы новообразования, что особенно важно, например, при инфильтративной и мультицентричной формах базально-клеточного рака кожи, характеризующихся высоким риском послеоперационного рецидива [4]. Для анализа могут быть использованы данные индуцированной и нативной аутофлуоресценции эндогенного протопорфирина IX [5]. Применение экзогенных флуорофоров (фотосенсибилизаторов) нецелесообразно вследствие длительности оказываемого эффекта.

Несмотря на привлекательность нативной аутофлуоресценции протопорфирина IX, не связанной с введением в организм токсичных и дорогостоящих индукторов флуоресценции, ее широкое применение долгое время

I.A. Novikov, Y.O. Grusha, N.P. Kiryushchenkova

Federal State Budget Institution «Scientific Research Institute of Eye Diseases» of Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation

Improving Efficacy of Fluorescent Diagnostics of Skin and Mucosal Tumors in Ocular Oncology

Developed in 2006 by our institute, the method of primary detection of skin and mucosal tumors based on non-induced fluorescence of endogenous protoporphyrin IX is used to estimate proliferative activity of tumor and its probable progression. This study was aimed to improve method efficacy by means of additional parameter which would quantitatively describe the interpenetration of tumor and surrounding tissues. The authors analyzed autofluorescent data of 97 patients and determined medico-biological factors which could cause controversial results (all cases were histologically controlled). The coefficient of interpenetration K_{dih} was proposed as a solution. It is calculated as averaged reciprocal to tumor border probability. Repeated analysis of the autofluorescent images using both the proliferative factor and coefficient of interposition revealed improvement of method specificity from 69% to 85% while sensitivity of method remained 70%. In authors' opinion, the method can be recommended for use in general oncology and dermatology.

Keywords: fluorescent diagnostics, autofluorescence, protoporphyrin IX, proliferation factor, oncology.

(Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2012. 10: 62-69).

сдерживалось отсутствием надежных методов математического анализа флуоресцентных изображений, позволяющих детектировать слабое свечение протопорфирина IX в его естественной концентрации. И только в 2006 г. в нашем институте был разработан метод пространственной оценки распределения протопорфирина IX по данным нативной аутофлуоресценции, который позволил, наконец, отказаться от индукторов флуоресценции и, кроме того, получить более надежные результаты благодаря оптимизации анализа изображений при помощи программы «Канцерплот» [6]. Нами также был разработан метод определения вероятностной оптической границы новообразования на основе анализа статистической контрастности флуоресцентного изображения. Мы предположили, что более глубокий анализ полученных данных позволит количественно описать степень взаимопроникновения (интерпозиции) опухоли и окружающих тканей. Такая информация, несомненно, стала бы важным диагностическим критерием, повышающим эффективность аутофлуоресцентной диагностики в целом.

Цель исследования: повысить эффективность метода диагностики новообразований кожи и слизистых оболочек на основе нативной аутофлуоресценции протопорфирина IX посредством внедрения в существующий алгоритм этапа оценки интерпозиции опухоли и окружающих тканей.

Пациенты и методы

Участники исследования

Было обследовано 97 пациентов с новообразованиями кожи век и периорбитальной области и конъюнктивы без клинических признаков воспаления (61 женщина, 36 мужчин). Чтобы составить представление об эффективности метода при работе с широкой популяцией, было решено включать пациентов в исследование вне зависимости от возраста, типа кожи, давности патологического процесса и др.

Методы исследования

Методика проведения аутофлуоресцентной диагностики подробно описана в диссертационной работе Е.А. Осиповой [6]. Для освещения исследуемой зоны мы использовали 2 люминесцентные лампы с максимумами возбуждающего излучения — 390, 415 и 433 нм. Фиксацию изображения осуществляли с помощью цифровой фотокамеры «Canon EOS 350» (рис. 1).

Обработку изображений проводили в программе «Канцерплот» (рис. 2). В основу ее работы положен дифференциальный спектральный анализ, согласно которому в любой точке изображения с координатами (x, y) определяется доленое участие красного канала по формуле:

$$R\%_{x,y} = R_{x,y} / (R_{x,y} + G_{x,y} + B_{x,y}) \times 100\%,$$

где $R\%_{x,y}$ — доленое участие красного канала в точке с координатами (x, y), $R_{x,y}$, $G_{x,y}$, $B_{x,y}$ — яркость красного, зеленого и синего канала (соответственно) в той же точке.

Красный канал является характеристическим для веществ группы порфиринов, предшественников гема. Их накопление обусловлено локальным дефицитом железа, развивающимся вследствие высокой митотической активности опухолевых клеток. Доленое участие



Рис. 1. Установка для аутофлуоресцентной диагностики.

красного канала в общем спектре флуоресценции отражает пролиферативную активность (фактор пролиферации) ткани в каждой точке. Результаты расчетов выводятся в виде изолиний, очерчивающих области со сходными значениями фактора пролиферации. Суждение об активности пролиферации новообразования в целом выносится после вычисления дельты пролиферации — разности значений фактора пролиферации новообразования и прилежащих здоровых тканей:

$$\Delta R = R_{\text{tum}} - R_{\text{norm}},$$

где ΔR — дельта пролиферации, R_{tum} — фактор пролиферации опухоли, R_{norm} — фактор пролиферации здоровых тканей (фон).

Отдельно производят определение вероятностной границы новообразования. Введение термина «вероятностная граница» обусловлено неравномерным характером инвазии опухоли и наличием зон со слабо выраженной атипией. По сходным причинам проведение однозначной границы затруднено в случае доброкачественного процесса: спектры флуоресценции исследуемого образования и окружающих тканей могут быть практически неотличимы. В связи с этим единственно возможной представляется оценка вероятности прохождения границы в каждой точке изображения при помощи анализа его статистической контрастности. Метод включает в себя несколько этапов.

1. Получение аутофлуоресцентного изображения на описанной выше установке (рис. 3).

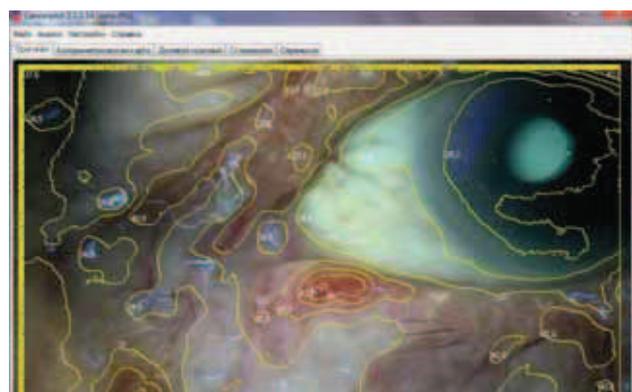


Рис. 2. Интерфейс программы «Канцерплот».



Рис. 3. Базально-клеточный рак кожи.

Примечание. а — абсорбционная фотография, б — аутофлуоресцентная фотография, в — красный канал аутофлуоресцентной фотографии.

2. Построение функции распределения $f_{norm}(B)$ для участка заведомо здоровой ткани, где $B(x, y)$ — удельная яркость красного канала в каждой точке выделенного участка (рис. 4а).

3. Построение функции распределения $f_{tum}(B)$ для участка ткани в пределах опухоли (рис. 4б).

4. Расчет синтетической функции распределения f_{model} (рис. 5) для гипотетической области, где $1/2$ площади занимает опухоль, а $1/2$ — здоровая ткань:

$$f_{model} = \frac{(n_{norm} + n_{tum})}{n_{tum}} * f_{tum}(B) + \frac{(n_{norm} + n_{tum})}{n_{norm}} * f_{norm}(B),$$

где f_{model} — синтетическая функция распределения, n_{tum} — число пикселей изображения, принадлежащих опухоли, n_{norm} — число пикселей изображения, принадлежащих здоровым тканям, $f_{tum}(B)$ — функция распределения яркости красного канала для выбранного участка опухоли, $f_{norm}(B)$ — функция распределения яркости красного канала для выбранного участка здоровых тканей (фон).

5. Сканирование изображения для картирования поля вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань. Вероятность того, что искомая граница проходит через точку изображения с координатами (x, y) и будет равна корреляции функции распределения $f(B)$ для участка с центром в данной точке и модельной функции f_{model} .

Как правило, поле вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань описывается гладкой функцией. При программной визуализации разным значениям функции присваиваются разные оттенки серого (рис. 6): от темного (минимальная вероятность) до светлого (максимальная вероятность). Для удобства восприятия вероятностная граница переносится на исходное изображение (рис. 7).

Результаты и обсуждение

По результатам гистологического исследования все пациенты были ретроспективно разделены на группу со злокачественными (I) и группу с доброкачественными новообразованиями (II) (рис. 8).

Типичные флуоресцентные картины доброкачественного и злокачественного процесса резко различаются

(рис. 9 и 10). Однако у значительной части пациентов обеих групп дельта пролиферации попадает в диапазон от +4 до +8, который мы назвали «зоной неопределенности» (см. рис. 8). Наличие этой зоны свидетельствует о низкой специфичности метода. Для детального исследования причин возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов диагностики каждую группу разделили на 2 подгруппы, используя значение, равное 6,6, при котором частота встречаемости доброкачественных и злокачественных новообразований совпадает как референсное.

Медико-биологические причины возникновения низких и отрицательных значений дельты пролиферации в группе злокачественных новообразований

Малые значения дельты пролиферации у пациентов группы I можно объяснить:

- медленным ростом новообразования (в этом случае ΔR будет находиться в пределах физиологических значений);
- дегенеративным характером процесса (например, язвенная форма базально-клеточного рака кожи — «минус ткань», $\Delta R < 0$);
- вкладом поверхностно расположенных флуорофоров в суммарный спектр аутофлуоресценции зоны интереса (например, кератиновой бляшки), и тогда результат можно расценивать как ложноотрицательный.

Медико-биологические причины возникновения высоких значений дельты пролиферации в группе доброкачественных новообразований

Высокие значения дельты пролиферации у пациентов группы II можно объяснить:

- быстрым ростом новообразования (например, у вирусных кондилом, некоторых типов невусов);
- наличием субклинического воспаления;
- особенностями локализации новообразования.

Последнее в наибольшей степени относится к умеренно пигментированным новообразованиям булбарной конъюнктивы, т.к. рассеянный меланин избирательно пропускает длинноволновую часть спектра люминесценции структурных белков подлежащей склеры, имитируя флуоресценцию протопорфирина. Это также справедливо для других случаев, когда «фоном» для новообразования служит беспигментная ткань.

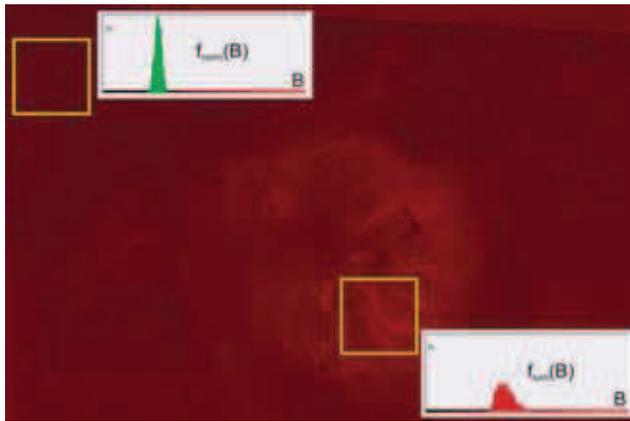


Рис. 4. Построение колориметрического массива V и функции f .
Примечание. а — построение функции f_{norm} для участка здоровых тканей, б — построение функции f_{tum} для участка новообразования.

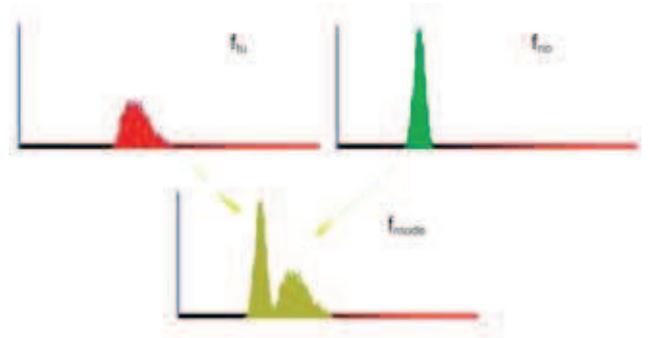


Рис. 5. Построение синтетической функции f_{model} .



Рис. 6. Поле вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань.



Рис. 7. Вероятностная граница между опухолью и здоровой тканью.

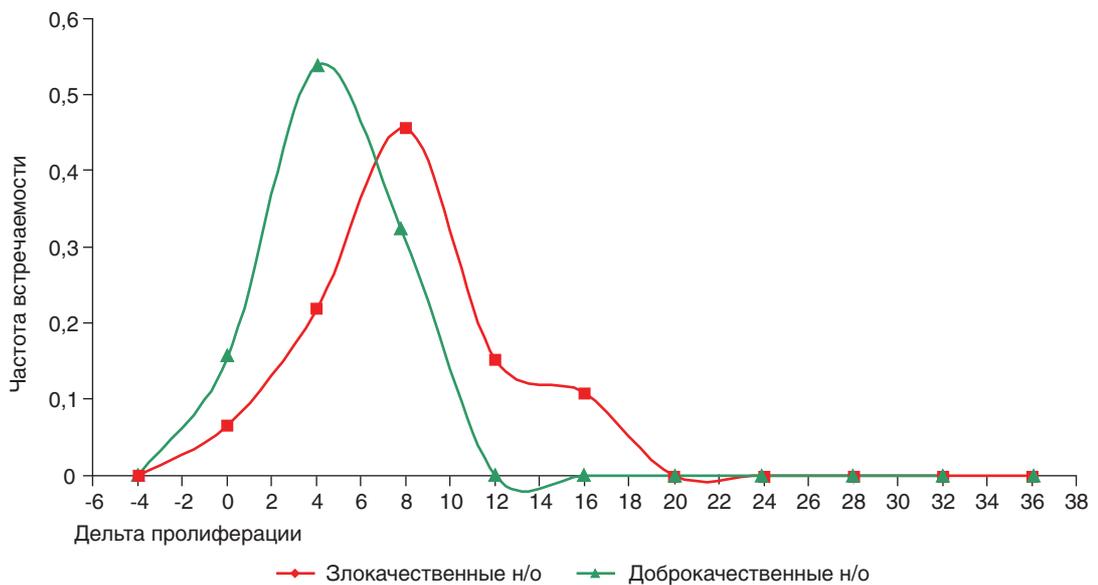


Рис. 8. Распределение пациентов в группах по значению дельты пролиферации
Примечание. Н/о — новообразования.

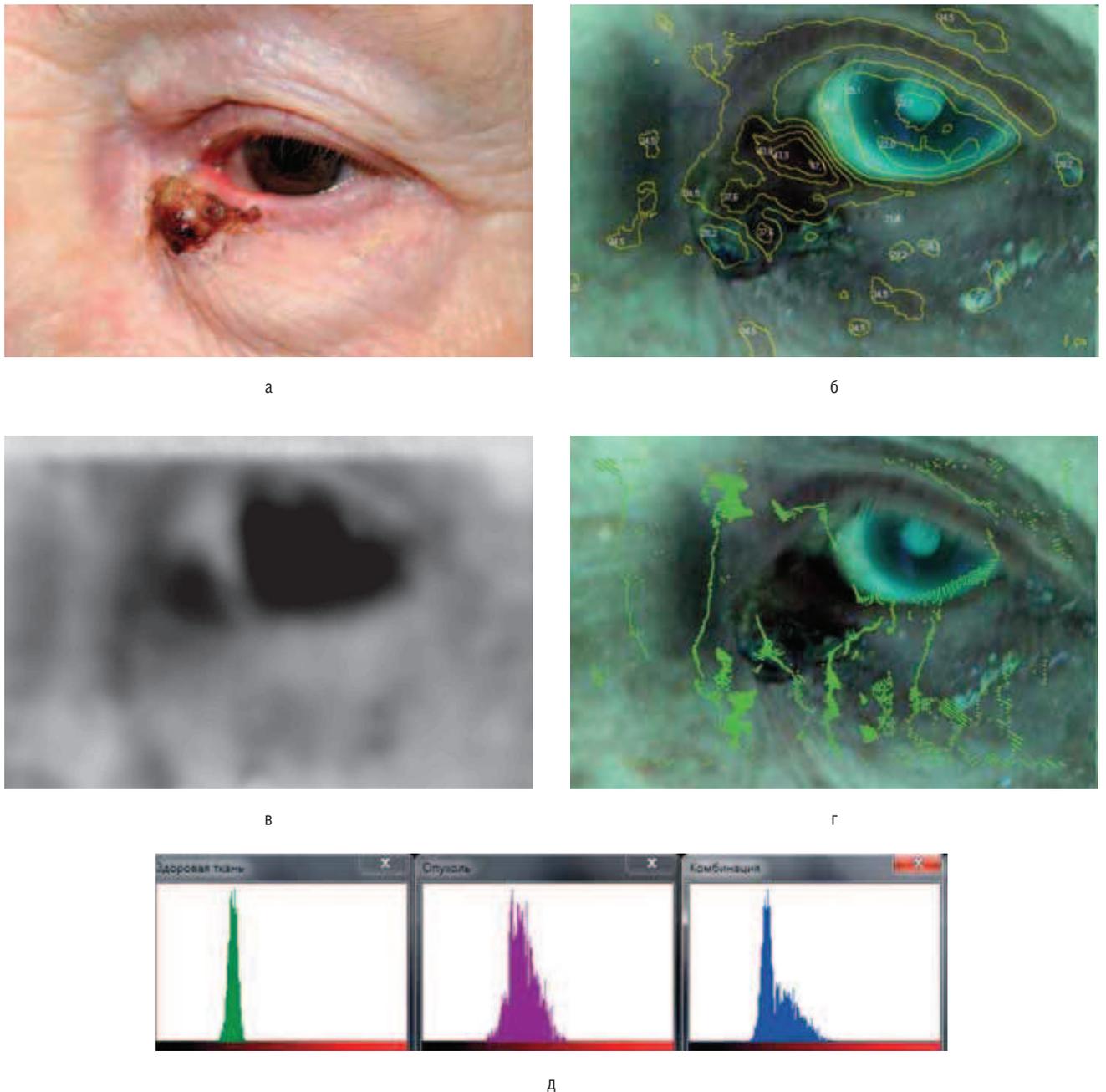


Рис. 9. Типичная аутофлуоресцентная картина злокачественного новообразования. Плоскоклеточный рак кожи (гист.).

Примечание. а — абсорбционная фотография; б — аутофлуоресцентное изображение с нанесенными изолиниями; в — поле вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань; г — вероятностная граница опухоль/здоровая ткань; д — функции распределения удельной яркости красного канала для участка здоровой ткани (слева) и опухоли (в середине), а также синтетическая функция для участка, на 50% занятого опухолью (справа).

При обработке флуоресцентного изображения (б) обнаружена высокая пролиферативная активность в основании опухоли, на 12,5% превышающая фоновое значение смежных неизмененных тканей (наружная половина нижнего века). Вероятностная граница (в–г) имеет сложный рисунок и не везде может быть определена с высокой степенью достоверности, что говорит о значительном проникновении одной ткани в другую. Синтетическая функция распределения (г) имеет 2 четко выраженных максимума, что отражает наличие функциональной атипии клеток опухоли.

Решение проблемы «зоны неопределенности»

Из представленных выше данных следует, что при прямом применении метод обладает достаточно низкой специфичностью, в связи с чем нами был введен еще один параметр — коэффициент интерпозиции K_{dith} , количественно описывающий «размытость» границ новообразования и представляющий собой усредненную обратную

величину к вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань:

$$K_{dith} = \sum_1^n \left(\frac{1/P}{n} \right),$$

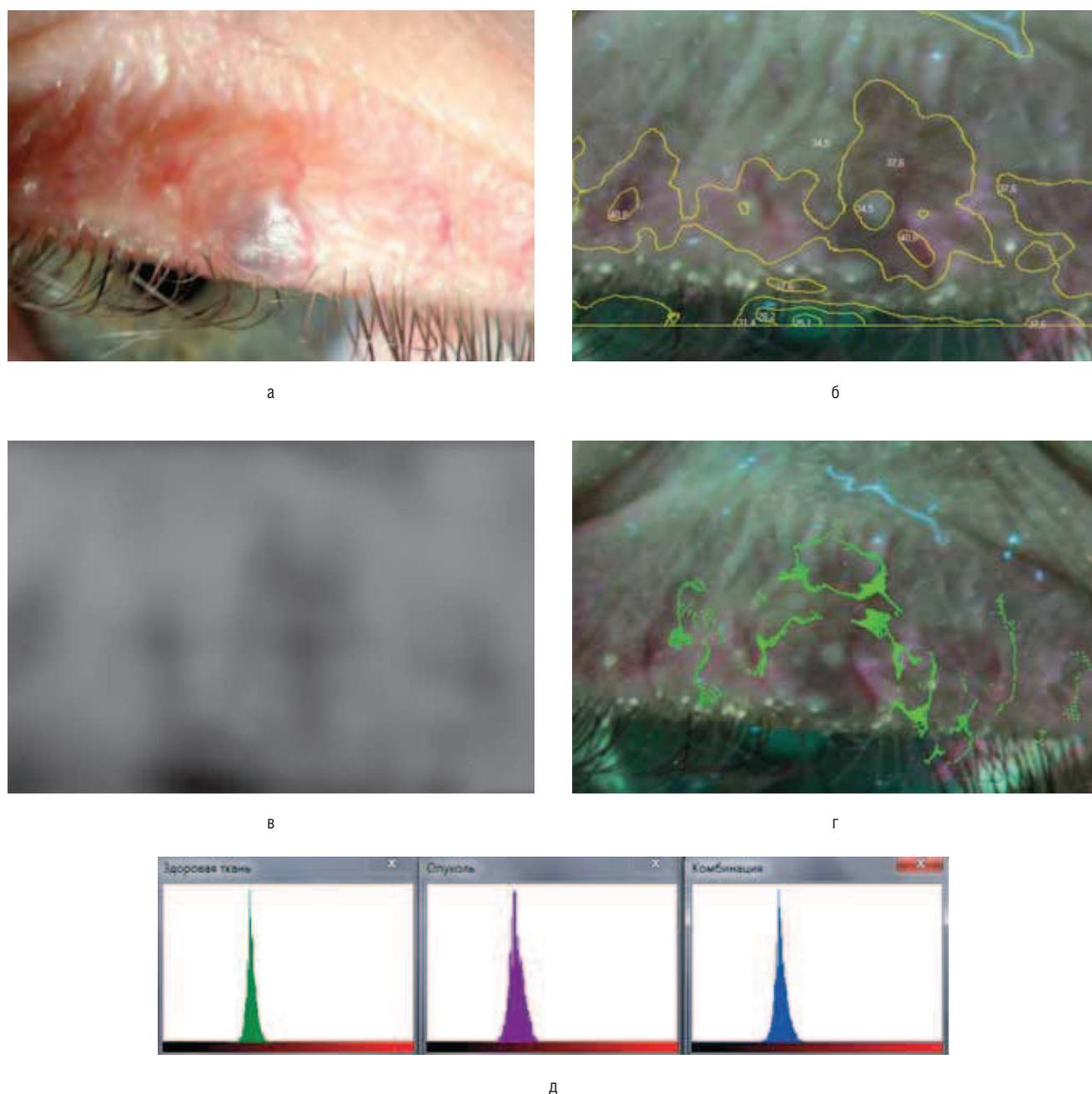


Рис. 10. Типичная аутофлуоресцентная картина доброкачественного новообразования. Гемангиома (гист.).

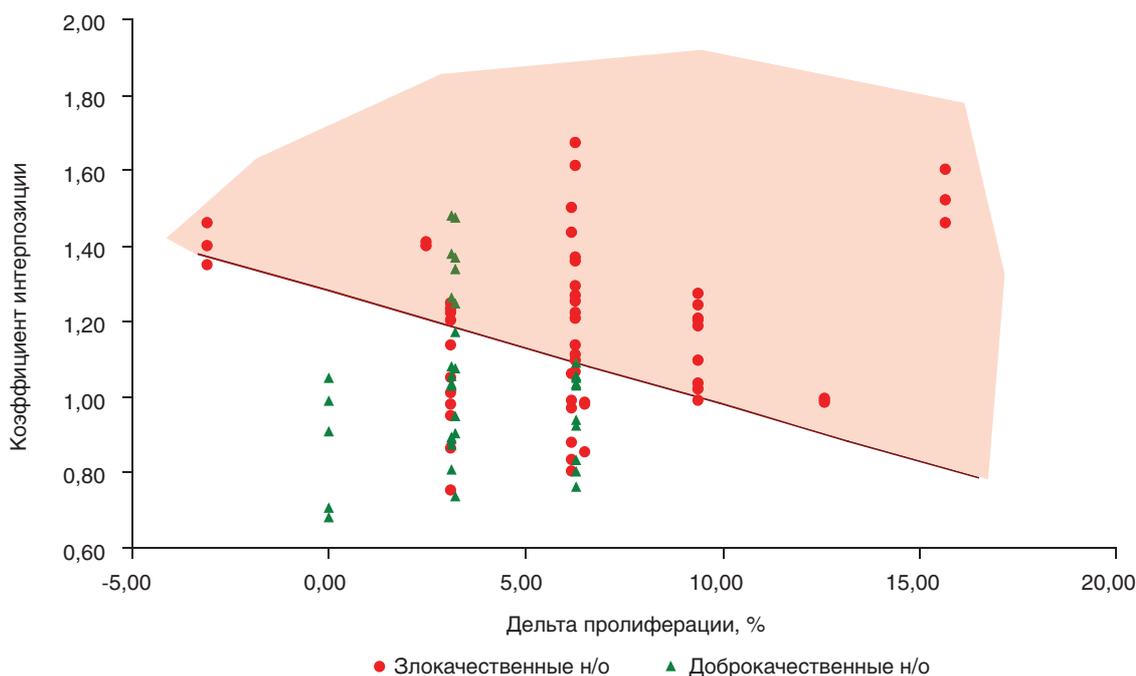
Примечание. а — абсорбционная фотография; б — аутофлуоресцентное изображение с нанесенными изолиниями; в — поле вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань; г — вероятностная граница опухоль/здоровая ткань; д — функции распределения яркости красного канала для участка здоровой ткани (слева) и опухоли (в середине), а также синтетическая функция для участка, на 50% занятого опухолью (справа).

При обработке флуоресцентного изображения (б) обнаружено, что фактор пролиферации в области новообразования не отклоняется от своих фоновых значений, $\Delta R = 0\%$. Умеренные девиации показателя (в пределах 3,1%) обусловлены непатогенной васкуляризацией верхнего века, о чем свидетельствует регулярный характер изолиний, очерчивающих сосудистую сеть. Вероятностная граница новообразования (в—г) имеет простую форму и с высокой степенью достоверности может быть определена на всем протяжении. Построение синтетической функции распределения (д) не выявило функциональной атипии в пределах опухоли (функция имеет 1 максимум). Это хорошо согласуется с низкой контрастностью поля вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань (в).

где K_{dith} — коэффициент интерпозиции новообразования и окружающих тканей, P — вероятность прохождения границы опухоль/здоровая ткань, n — число точек, принадлежащих границе.

Результаты определения коэффициента интерпозиции для разных значений дельты фактора пролиферации представлены на рис. 11.

Видно, что в «зоне неопределенности» (т.е. в диапазоне от +4 до +8 по оси абсцисс) новообразования могут быть дифференцированы по коэффициенту интерпозиции. У злокачественных новообразований он статистически выше, чем у доброкачественных, при тех же значениях дельты пролиферации. Точки, расположенные выше эмпирической прямой (см. рис. 11), связывающей дельту



68 **Рис. 11.** Диаграмма соотношения коэффициента интерпозиции опухоль/окружающие ткани и дельты пролиферации, построенная для 97 новообразований.
Примечание. Злокачественному процессу статистически соответствует область (выделена красным), отвечающая неравенству $K_{dith} > (-0,03) \times \Delta R + 1,3$.

пролиферации и коэффициент интерпозиции, с вероятностью 0,92 соответствуют злокачественному процессу.

Применение нового коэффициента позволило значительно повысить специфичность метода в целом. Сравнительная оценка чувствительности и специфичности флуоресцентной диагностики с использованием только дельты пролиферации и сочетания дельты пролиферации и коэффициента интерпозиции приведена в табл.

Заключение

Впервые клинически апробирован метод определения оптических границ новообразования на основе анализа

статистической контрастности флуоресцентного изображения. Это, в свою очередь, позволило предложить новый параметр, количественно описывающий взаимопроникновение опухоли и здоровых тканей. Использование коэффициента интерпозиции существенно повышает специфичность (с 0,69 до 0,85) метода аутофлуоресцентной диагностики новообразований кожи и слизистых оболочек за счет решения проблемы «зоны неопределенности» при сохранении показателя чувствительности равного 0,7.

В новую версию программы «Канцеплот» добавлена возможность определения вероятностной границы новообразования и расчета коэффициента интерпозиции.

Методика может быть рекомендована для применения в общей онкологии и дерматологии.

Таблица. Сравнительная оценка чувствительности и специфичности флуоресцентной диагностики с использованием только дельты пролиферации и сочетания дельты пролиферации и коэффициента интерпозиции

Результаты оценки специфичности и чувствительности с использованием только дельты пролиферации				
	Доброкачественные н/о	Злокачественные н/о		
Положительный	12	40	Специфичность	0,69
Отрицательный	27	18	Чувствительность	0,70
Результаты оценки специфичности и чувствительности с использованием дельты пролиферации и коэффициента интерпозиции				
Положительный	6	40	Специфичность	0,85
Отрицательный	33	18	Чувствительность	0,71

Примечание. Н/о — новообразование.

REFERENCES

1. Costello M., Luttenberger L. Fluorescence with the Wood's filter as an aid in dermatological diagnosis. *N.-Y. S. J. Med.* 1944; 42: 1778–1784.
2. Landsberg G.S. Optika. 6-e izd. M.: FIZMATLIT. 2003. 846 с.
3. Zellweger M. Fluorescence spectroscopy of exogenous, exogenously-induced and endogenous fluorophores for the photodetection and photodynamic therapy of cancer. *Ecole Polytechnique Federale de Lausanne.* 2000; 2126: 233.
4. Sexton M., Johnes D.B., Maloney M.E. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1990; 23: 1118-1126.
5. Figge F. Fluorescence studies on cancer. *Can. Res.* 1944; 4 (8): 465–471.
6. Osipova E.A. Fluorescentnye metody issledovaniya opukholei vek i kon'yunktivy na osnove endogennykh i ekzogennykh fluoroforov. *Avtoref. dis ... kand. med. nauk. M.* 2009.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Новиков Иван Александрович, старший научный сотрудник научно-организационного отдела ФГБУ «НИИГБ» РАМН

Адрес: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11А

Тел.: (499) 248-01-25

E-mail: toiaia@rambler.ru

Груша Ярослав Олегович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом пластической и реконструктивной хирургии век и орбиты ФГБУ «НИИГБ» РАМН

Адрес: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11А

Тел.: (499) 248-01-25

Кирющенко Наталия Павловна, врач-офтальмолог ФГБУ «НИИГБ» РАМН

Адрес: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11А

E-mail: natalfa@yandex.ru