

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 616.23-053.2-072.1:615.849.19

*Шавров А.А., Харитонов А.Ю., Шавров А.А. (мл.), Калашникова Н.А., Гайдаенко А.Е., Смирнов И.Е.*  
**КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЭНДОМИКРОСКОПИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ  
У ДЕТЕЙ**

Научный центр здоровья детей, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 2, стр. 1

Описаны принцип и методика новой диагностической технологии – конфокальной лазерной эндомикроскопии с использованием системы Cellvizio® и зонда Alveoflex (Mauna Kea Technologies, Франция) для изучения дистальных отделов нижних дыхательных путей в режиме реального времени. Ациноскопия была выполнена 12 больным 7–15 лет с различными формами патологии легких. Обсуждаются проблемы, связанные с реализацией данной технологии и перспективы ее практического применения.

Ключевые слова: конфокальная лазерная микроэндоскопия; дети; респираторная патология; ациноскопия; альвеоскопия.

*Shavrov A. A., Kharitonova A. Yu., Shavrov A. A. (junior), Kalashnikova N. A., Gaydaenko A. E., Smirnov I. E.*

**CONFOCAL LASER ENDOMICROSCOPY OF THE RESPIRATORY TRACT IN CHILDREN**

Scientific Centre of Child Healthcare, 2, bld. 1, Lomonosov avenue, Moscow, Russian Federation, 119991

There are described the principle and methods of the new diagnostic technology - confocal laser endomicroscopy with the use of Cellvizio® system and probe Alveoflex (Mauna Kea Technologies, France) for the study of the distal portions of the lower respiratory tract in real time. Acinoscopy was performed in 12 patients aged 7-15 years with various forms of lung diseases. The problems associated with the implementation of this technology and its potential practical application are considered.

Key words: confocal laser endomicroscopy, children, respiratory pathology, acinoscopy, alveoloscopy

Современный этап эндоскопической диагностики у детей характеризуется существенным прогрессом и увеличением информативности исследований [1, 2]. Развитие новых методов эндоскопической диагностики основано на появлении новых технологий, позволяющих получить высокий уровень информации путем проникновения в тонкие структурные органы и тканей, которые были ранее не доступны для визуализации и интерпретации. К таким технологиям можно отнести эндоскопию, позволяющую получить усиление изображения слизистой оболочки в 1400 раз, по сути – проводить световую микроскопию во время эндоскопического исследования [3]. Другим относительно новым методом эндоскопической визуализации является виртуальная хромоэндоскопия, которая за счет присутствия системы оптических фильтров позволяет более четко дифференцировать области опухолей и воспалительных изменений слизистой оболочки. В отличие от обычной хромоэндоскопии нет необходимости вводить дополнительные красящие или контрастные химические агенты [2].

Для расширения диагностического эндоскопического спектра нами предлагается новая медицинская технология – конфокальная лазерная эндомикроскопия (КЛЭМ) респираторной системы у детей, которая может быть использована при различных формах патологии органов дыхания [4].

Технология КЛЭМ основана на принципе конфокальной флуоресцентной микроскопии [5–8]. Лазер длиной волны 488 нм, расположенный в рабочей

станции, генерирует лазерный луч и передает его с помощью систем зеркал, качающихся во взаимоперпендикулярных направлениях. На выходе из рабочей станции лазерный луч проходит через многоволоконный фиброоптический зонд и попадает на поверхность исследуемой ткани. Часть света поглощается, а индуцируемый лазером эффект флуоресценции вызывает свечение тканей, которое идентифицируется конфокальным микроскопом, обрабатывается компьютером, позволяя получить динамическое монохромное изображение на мониторе [6]. Очевидно, что при КЛЭМ можно достигнуть визуализации только тех структур, которые дают эффект аутофлуоресценции. К основным эндогенным флуорофорам биологических тканей относятся флавины, протеины и порфирины. Каждый из этих флуорофоров имеет характерные спектры поглощения и эмиссии [7, 8]. При использовании монохроматического света длиной волны 488 нм возникает свечение биологических субстанций, богатых NADH, липопигментами, а также коллагена и эластина [4, 9, 10].

Указанная технология реализуется с помощью системы Cellvizio®, выпущенной компанией Mauna Kea Technologies (Франция). Для исследования состояния бронхолегочной системы применяются зонды Alveoflex, разрешающая способность которых достигает 3,5 мкм, диаметр оптического поля составляет 600 мкм, глубина исследования – 0–50 мкм.

Мини-зонд проводится через инструментальный канал эндоскопа. Минимальный требуемый диаметр инструментального канала, позволяющий провести зонд, должен быть не менее 2,2 мм, что позволяет использовать большинство бронхоскопов, представленных на рынке.

Перед проведением КЛЭМ осуществляется на-

Для корреспонденции (Correspondence to): *Шавров Андрей Александрович*, доктор мед. наук, зав. эндоскопическим отделением Научного центра здоровья детей, e-mail: shavrov@nczd.ru

стройка Cellvizio® в соответствии с инструкцией разработчиком Сайдекс, аналогично ДВУ эндоскопов. КЛЭМ проводится непосредственно во время бронхоскопии после завершения этапа общего рутинного эндоскопического исследования. По инструментальному каналу проводится лазерный зонд, который смещается в дистальном направлении до момента визуализации альвеолярных перегородок, т. е. до достижения ощущения слабого сопротивления ткани легкого. Это сопровождается появлением на экране динамически меняющейся монохромной микроскопической картины, которая может быть записана и воспроизведена для анализа. Учитывая увеличение продолжительности времени диагностической процедуры от 10 до 30 мин, исследование требует хорошей анестезии, а оптимальным вариантом является наркоз. Собственный опыт указывает на необходимость двух врачей и ассистента на этапе освоения технологии.

Следует отметить, что до появления КЛЭМ осмотреть бронхи диаметром менее 3 мм с помощью бронхоскопа не представлялось возможным. До настоящего времени эндобронхиальная диагностика различных форм патологии *in vivo* дистально расположенных отделов бронхов и структур паренхимы легкого оставалась невозможной и реализовывалась при патогистологическом исследовании полученных при биопсии фрагментов ткани или косвенно при цитологическом анализе материала бронхоальвеолярного лаважа. Определенный прогресс в улучшении глубины осмотра бронхиального дерева достигнут за счет программ «виртуальной» бронхоскопии при высокоразрешающей компьютерной томографии, однако пределом визуализации данного метода на нынешнем этапе развития являются терминальные бронхиолы.

При проведении данной технологии во время видеобронхоскопии у больных выполнено последовательное посегментное исследование респираторных отделов с помощью зонда Alveoflex и осуществлены видеозаписи. Затем мы оценивали полученные изображения по следующим параметрам: 1) визуализация структур респираторной бронхиолы (слой эластических и коллагеновых волокон в сагиттальной и аксиальной плоскостях бронхиальной железы) с определением количества, диаметра устья (в нм), наличие кист; визуализация альвеолярного хода с определением формы, ширины (в нм) и толщины (в нм) эластических волокон; 2) визуализация альвеолярных структур с характеристикой структуры (сохранена, нарушена частично, нарушена полностью), средней ширины альвеол (диаметры наименьшей и наибольшей), формы и толщины эластических волокон (в нм); 3) визуализация капилляров – диаметр (в нм), характер (извилистость, попадание в поле визуализации би- или трифуркаций); 4) определение толщины межальвеолярной перегородки (в нм); 5) выявление дистелектаза (есть/нет), оценка соотношения количества нормальных по объему и спавшихся альвеол; 6) характеристика «подвижного» (флотирующего) компонента с анализом альвеолярных макрофагов (единичные, умеренное количество, занимают все поле зрения); 7) определение альвеолярного секре-

та (имеется в виде пузырьков жидкости различного калибра)/отсутствует); 8) наличие посторонних включений. При необходимости изображения, полученные в ходе КЛЭМ, сравнивали с изображениями, полученными при световой микроскопии гистологических препаратов.

Поскольку единственным методом получения визуального изображения ацинуса до последнего времени являлась оптическая микроскопия, экстраполяция результатов оптической микроскопии на полученные изображения при КЛЭМ позволяет определить сходство между выявленными структурами ацинуса и их изменения. При этом необходимо понимание врачом-эндоскопистом угла осмотра структур (например, бронхиол), имеющих выраженные отличия в трехмерном измерении. В данном случае разница составляет 90°. В то же время непосредственная визуализация ацинуса в меньшей степени зависит от угла среза и сопоставление данных КЛЭМ и оптической микроскопии осуществить проще. При изучении изображений КЛЭМ нами были отмечены повторяющиеся структуры овальной или округлой формы, не меняющие своего размера, диаметром около 200 мкм, что соответствует вестибулярному отделу респираторной бронхиолы 3-го порядка. Важным моментом, позволяющим нам обосновать это суждение, является то, что вслед за изображением стенки бронхиолы при проведении датчика в дистальном направлении визуализируются ячеистые структуры, представленные взаимопересекаемыми волокнами эластина, что довольно часто предваряется овальной структурой, являющейся, судя по всему, вестибулярным отделом или «альвеолярным ртом».

Попадание эластического волокна альвеолы в поле зрения зависит от того, насколько параллельна сканирующая поверхность зонда Alveoflex этому пучку, и если пучок света проходит перпендикулярно одному такому пучку, то соседняя альвеола обычно визуализируется в ином направлении и ее эластические волокна заметны в виде мелких сегментов.

Величина и характер извилистости видимых сегментов эластических волокон зависят от того, в каком состоянии растяжения находится альвеола в момент визуализации (КЛЭМ) или фиксации материала (оптическая микроскопия). Если она была сильно и быстро растянута, то в поле зрения/среза попадают очень мелкие сегменты тонких волокон, не считая тех редких в препарате участков, где поле зрения/срез совпадает с поверхностью растянутой альвеолы и, следовательно, параллелен эластическому пучку. Если альвеола находилась в состоянии полуспада, что характерно для ателектаза (физиологического или патологического), то в поле зрения/среза попадает множество скрученных спиралевидных сегментов эластических волокон, «нагромождающихся» друг на друга [11,12]. Патологические процессы в паренхиме легких могут проявляться на уровне ацинуса дистелектазическими изменениями. При световой микроскопии для этого явления характерны деформация и извитость эластиновых и мышечных волокон, утрата четких границ округлых полостей ацинуса, сужение альвеолярных ходов. Аналогичная изменения отме-

чены при КЛЭМ большого с пневмонией.

Как отмечено выше, важной структурой альвеолярных перегородок являются кровеносные сосуды в виде капилляров, густо оплетающих стенки воздушных пузырьков. Капилляры проходят внутри альвеолярной перегородки, обеспечивая каждые 2 соседние альвеолы. Изменение величины альвеол ведет за собой и изменение просвета капилляров. Кроме того, в просвете альвеол при использовании технологии КЛЭМ были выявлены пузырьки, меняющие размер и форму, которые соединялись и разделялись в процессе наблюдения. Вместе с тем КЛЭМ позволяет визуализировать строение базальной мембраны, включающей коллаген IV типа, ламинины и сульфатные протеоглики [13].

Нужно отметить также, что часто встречаемой структурной единицей при альвеоскопии является альвеолярный макрофаг (альвеолярный фагоцит, легочный макрофаг). Это одноядерная клетка, локализуемая в просвете альвеол и характеризующаяся эксцентрично расположенным полиморфным ядром с хорошо заметным ядрышком. Из всех легочных макрофагов около 93% являются свободными альвеолярными макрофагами и лишь 7% – интерстициальными макрофагами.

Таким образом, появление и реализация новой технологии позволяют установить правильный диагноз. Мы полагаем, что указанная технология может иметь диагностическую ценность при болезнях, сопровождающихся изменениями сосудов ацинуса, появлением в просвете бронхиол и альвеол грануляционной ткани (облитерирующий бронхит), инородных масс или клеточных элементов (амилоидоз, протеиноз легких), деструкцией эластического каркаса (эмфизема). Кроме того, технология КЛЭМ, вероятно, может помочь в навигации трансбронхиальной биопсии [4, 11, 12], позволяя определить оптимальное направление проведения биопсийных щипцов, выполнить архивирование изображения и в реальном времени сделать предварительное заключение. Представляется перспективным использование специального набора, включающего тонкие щипцы и катетер, через который последовательно можно провести зонд Alveoflex для предварительной зоны оценки последующей биопсии, а затем цапку для забора материала. Это позволит точно сопоставлять данные при КЛЭМ и гистологическом исследовании, что повысит диагностическую ценность новой технологии.

Нужно отметить, что визуальная картина, которую получает бронхолог при исследовании, весьма далека от традиционных эндоскопических изображений трахеобронхиального дерева и в большей степени понятна специалистам в области микроскопии. Поэтому для интерпретации данных КЛЭМ в ряде случаев необходимо привлекать морфологов [4, 10].

Таким образом, новая технология лазерной конфокальной эндомикроскопии дыхательных путей позволяет в режиме реального времени *in vivo* проводить оценку состояния респираторного компартмента легких, визуализируя структуры с разрешением от 1 до 3,5 мкм. Отсутствие стандартов качественной и количественной оценки визуальных изображений ацинуса в процессе КЛЭМ требует расширения на-

учных исследований с анализом материала у гетерогенных категорий больных разного возраста.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лохматов М.М., Рыжкова Л.А., Харитонов А.Ю., Смирнов И.Е. Эффективность эрадикационной терапии эрозивно-язвенных поражений верхних отделов желудочно-кишечного тракта у детей. *Российский педиатрический журнал*. 2010; 5: 14–7.
2. Харитонов А.Ю., Шавров А.А., Смирнов И.Е., Калашникова Н.А. Узкоспектральная видеоэндоскопия в диагностике деструктивных изменений слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки у детей. *Российский педиатрический журнал*. 2012; 6: 20–4.
3. Kwon R.S., Wong Kee Song L.M., Adler D.G., Gonway J.D., Diehl D.L., Farraye F.A. et al. Endocytoscopy. *Gastrointest. Endosc.* 2009; 70 (4): 610–3.
4. Аверьянов А.В., Данилевская О.В., Сазонов Д.В., Забозлаев Ф.Г., Кузовлев О.П., Сотникова А.Г. Конфокальная лазерная эндомикроскопия дыхательных путей – проблемы и перспективы. *Клиническая практика*. 2011; 4: 4–12.
5. Thiberville L., Salaün M., Lachkar S., Dominique S., Moreno-Swiric S., Vever-Bizet C., Bourg-Heckly G. Confocal fluorescence endomicroscopy of the human airways. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009; 6 (5): 444–9.
6. Jabbour J.M., Saldia M.A., Bixler J.N., Maitland K.C. Confocal endomicroscopy: instrumentation and medical applications. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40 (2): 378–97.
7. Yserbyt J., Doms C., Decramer M., Verleden G.M. Probe-based confocal laser endomicroscopy of the respiratory tract: a data consistency analysis. *Respir. Med.* 2013; 107 (8): 1234–40.
8. Fuchs F.S., Zirlik S., Hildner K., Frieser M., Ganslmayer M., Schwarz S. et al. Fluorescein-aided confocal laser endomicroscopy of the lung. *Respiration*. 2011; 81 (1): 32–8.
9. Ohtani K., Lee A.M., Lam S. Frontiers in bronchoscopic imaging. *Respirology*. 2012; 17 (2): 261–9.
10. Thiberville L., Salaün M. Bronchoscopic advances: on the way to the cells. *Respiration*. 2010; 79 (6): 441–9.
11. Salaün M., Bourg-Heckly G., Thiberville L. Confocal endomicroscopy of the lung: from the bronchus to the alveolus. *Rev. Mal. Respir.* 2010; 27 (6): 579–88.
12. Newton R.C., Kemp S.V., Yang G.Z., Elson D.S., Darzi A., Shah P.L. Imaging parenchymal lung diseases with confocal endomicroscopy. *Respir. Med.* 2012; 106 (1): 127–37.
13. Thiberville L., Salaün M., Lachkar S., Dominique S., Moreno-Swiric S., Vever-Bizet C., Bourg-Heckly G. Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy. *Eur. Respir. J.* 2009; 33: 974–85.

#### REFERENCES

1. Lokhmatov M.M., Ryzhkova L.A., Kharitonova A.Yu., Smirnov I.E. Efficiency of eradication therapy for erosive-ulcerative lesions of the upper gastrointestinal tract in children. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2010; 5: 14–7. (in Russian)
2. Kharitonova A.Yu., Shavrov A.A., Smirnov I.E., Kalashnikova N.A. Narrow-band imaging endoscopy in the diagnosis of destructive changes in the mucous membrane of the stomach and duodenum in children. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2012; 6: 20–4. (in Russian)
3. Kwon R.S., Wong Kee Song L.M., Adler D.G., Gonway J.D., Diehl D.L., Farraye F.A. et al. Endocytoscopy. *Gastrointest. Endosc.* 2009; 70 (4): 610–3.
4. Aver'yanov A.V., Danilevskaya O.V., Sazonov D.V., Zabozlaev F.G., Kuzovlev O.P., Sotnikova A.G. Confocal laser endomicroscopy of airways – problems and prospects. *Klinicheskaya praktika*. 2011; 4: 4–12. (in Russian)
5. Thiberville L., Salaün M., Lachkar S., Dominique S., Moreno-Swiric S., Vever-Bizet C., Bourg-Heckly G. Confocal fluorescence endomicroscopy of the human airways. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009; 6 (5): 444–9.
6. Jabbour J.M., Saldia M.A., Bixler J.N., Maitland K.C. Confocal endomicroscopy: instrumentation and medical applications. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40 (2): 378–97.
7. Yserbyt J., Doms C., Decramer M., Verleden G.M. Probe-based confocal laser endomicroscopy of the respiratory tract: a data consistency analysis. *Respir. Med.* 2013; 107 (8): 1234–40.
8. Fuchs F.S., Zirlik S., Hildner K., Frieser M., Ganslmayer M.,

- Schwarz S. et al. Fluorescein-aided confocal laser endomicroscopy of the lung. *Respiration*. 2011; 81 (1): 32–8.
9. Ohtani K., Lee A.M., Lam S. Frontiers in bronchoscopic imaging. *Respirology*. 2012; 17 (2): 261–9.
  10. Thiberville L., Salaün M. Bronchoscopic advances: on the way to the cells. *Respiration*. 2010; 79 (6): 441–9.
  11. Salaün M., Bourg-Heckly G., Thiberville L. Confocal endomicroscopy of the lung: from the bronchus to the alveolus. *Rev. Mal. Respir.* 2010; 27 (6): 579–88.
  12. Newton R.C., Kemp S.V., Yang G.Z., Elson D.S., Darzi A., Shah P.L. Imaging parenchymal lung diseases with confocal endomicroscopy. *Respir. Med.* 2012; 106 (1): 127–37.
  13. Thiberville L., Salaün M., Lachkar S., Dominique S., Moreno-Swires S., Vever-Bizet C., Bourg-Heckly G. Human in vivo fluorescence microimaging of the alveolar ducts and sacs during bronchoscopy. *Eur. Respir. J.* 2009; 33: 974–85.

Поступила 04.07.14  
Received 04.07.14

#### Сведения об авторах:

**Харитоновна Анастасия Юрьевна**, канд. мед. наук, врач эндоскопического отд-ния Научного центра здоровья детей, e-mail: anastasia08@mail.ru; **Шавров Антон Андреевич**, врач-эндоскопист эндоскопического отд-ния Научного центра здоровья детей, e-mail: shavrovnczd@yandex.ru; **Калашикова Наталья Алексеевна**, канд. мед. наук, доцент каф. анатомии ИВГМА, 153012, г. Иваново, Шереметьевский проспект, 8, e-mail: anastasia08@mail.ru; **Гайдаенко Андрей Евгеньевич**, мл., науч. сотр. эндоскопического отд-ния НЦЗД, e-mail: Gaydaenkoae@yandex.ru; **Смирнов Иван Евгеньевич**, доктор мед. наук, проф., зам. директора по науч. работе НИИ педиатрии НЦЗД, e-mail: smirnov@nczd.ru

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.61-018-053.2-073.916

**Смирнов И.Е., Комарова Н.Л., Герасимова Н.П., Видюков В.И.**

## НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ РАДИОНУКЛИДНОЙ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ У ДЕТЕЙ

Научный центр здоровья детей, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 2, стр. 1

Представлена новая диагностическая технология определения объема функционально активной почечной паренхимы, включающая внутривенное введение радиофармпрепарата, измерение активности в полном шприце, в шприце после инъекции и месте инъекции с помощью гамма-камеры, отличающаяся тем, что вводят меченый короткоживущий радионуклид технемаг  $^{99m}\text{Tc}$  в количестве 37–185 МБк с последующим проведением динамической сцинтиграфии с непрерывной записью кадров в течение 20 мин при экспозиции каждого кадра 20 с, затем определяют число импульсов в течение 100–120 с в зонах сцинтиграммы, соответствующих левой и правой почкам, а также в зонах мягких тканей, расположенных ниже изображений соответствующих почек, и вычисляют объем функционирующей паренхимы для каждой почки по предложенным формулам.

Ключевые слова: диагностическая технология; дети; динамическая сцинтиграфия почек; объем функционирующей паренхимы.

*Smirnov I. E., Komarova N. L., Gerasimova N. P., Vidyukov V. I.*

NEW RADIONUCLIDE TECHNOLOGY FOR THE ASSESSMENT OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF RENAL TISSUE IN CHILDREN

Scientific Centre of Child Healthcare, 2, bld. 1, Lomonosov avenue, Moscow, Russian Federation, 119991

There is presented the new diagnostic technology for the determination of the amount of functionally active renal parenchyma. It includes the intravenous injection of the radiopharmaceutical preparation, the measurement of the activity of the full syringe, in the syringe after injection and at the injection site, with a gamma camera, introduction of a short-lived labeled radionuclide Technemag  $^{99m}\text{Tc}$  in the amount of 37–185 MBq with followed by dynamic scintigraphy with continuous recording frames within 20 min under exposure at 20 seconds per frame. Then, there is determined the number of pulses during 100–120 seconds in scintigrams areas corresponding to the left and right kidneys and also in soft tissue areas located under of images of corresponding kidneys and the volume is calculated for each functioning kidney parenchyma according to the proposed formulas.

Key words: diagnostic technology; children; dynamic renal scintigraphy; the amount of functioning parenchyma.

Необходимость новой технология радионуклидной диагностики функционального состояния почек определяется тем, что в идеале врач-радиолог должен иметь приемлемую стратегию исследования, обеспечивающую достоверную и не-

обходимую информацию, чтобы руководствоваться ею при принятии диагностических и научных решений. Она должна включать в себя непредвзятое отношение к имеющимся данным, базироваться на самых современных технологиях и стимулировать мастерство исполнения диагностических процедур [1, 2].

Предложенный нами способ определения функционально активной ткани почек основан на использовании ионизирующего излучения, испускаемого нестабильными атомными ядрами – радионуклида-

Для корреспонденции (Correspondence to): **Смирнов Иван Евгеньевич**, зав. лаб. патофизиологии с блоком радионуклидных исследований ФГБНУ НЦЗД, доктор мед. наук, проф., e-mail: smirnov@nczd.ru