

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

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

Повышение эффективности флуоресцентной диагностики новообразований кожи век и периорбитальной области эпителиального происхождения

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 «размытость» границ опухоли. 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 «размытости» границ опухоли K_{dith} , представляющего собой усредненную обратную величину к вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань. Повторный анализ флуоресцентных изображений с использованием показателя пролиферации и коэффициента «размытости» границ опухоли продемонстрировал повышение специфичности метода с 0,69 до 0,85 при сохранении показателя чувствительности, равного 0,7. Полученные данные, по мнению авторов, могут быть экстраполированы на новообразования другой локализации.

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

62

Введение

Флуоресцентная диагностика заболеваний кожи известна медицине с 40-х гг. XX в. [1]. Она основана на кратковременной фотолуминесценции, 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 флуоресцентных изображений [4–6]. Второе направление является более перспективным, т.к. позволяет проводить пространственную оценку распределения флуорофора и визуализировать границы новообразования [7], что особенно важно, например, при инфильтративной и мультицентричной формах базально-клеточного рака кожи, характеризующихся высоким риском послеоперационного рецидива [8–13], а также в случаях, когда определение объема резекции

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

Scientific Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Options for Improving Efficacy of Fluorescent Diagnostics of Eyelid and Periorbital Epithelial Tumors

Developed in 2006 by our institute, the method of primary detection of eyelid and periorbital epithelial 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 level of tumor border dithering. The authors analyzed autofluorescent data of 97 patients and determined medico-biological factors which could cause controversial results (all cases were histologically controlled). The averaged reciprocal of tumor border probability was proposed as a solution and named the coefficient of tumor border dithering K_{dith} . 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, obtained results can likely be extrapolated to neoplasm of other localization.

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).

века напрямую влияет на функциональный и косметический исход лечения [14]. Для анализа могут быть использованы данные индуцированной и нативной аутофлуоресценции эндогенного протопорфирина IX [4–6, 15]. Применение экзогенных флуорофоров (фотосенсибилизаторов) нецелесообразно вследствие длительности оказываемого эффекта [16].

Несмотря на привлекательность нативной аутофлуоресценции протопорфирина IX, не связанной с введением в организм токсичных и дорогостоящих индукторов флуоресценции, ее широкое применение долгое время сдерживалось отсутствием надежных методов математического анализа флуоресцентных изображений, позволяющих детектировать слабое свечение протопорфирина IX в его естественной концентрации [17, 18]. 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» [19]. Нами также был разработан метод определения вероятностных оптических границ новообразования на основе анализа статистической контрастности флуоресцентного изображения. Мы предположили, что более глубокий анализ полученных данных позволит количественно особенности инвазии опухоли посредством оценки «размытости» ее границ. Такая информация, несомненно, стала бы важным диагностическим критерием, повышающим эффективность аутофлуоресцентной диагностики в целом.

Цель исследования: изучить возможности повышения эффективности диагностики новообразований кожи век и периорбитальной области эпителиального происхождения на основе нативной аутофлуоресценции протопорфирина IX.

Пациенты и методы

Участники исследования

С 2009 по 2012 год в НИИ глазных болезней РАМН было обследовано 97 (61 женщина, 36 мужчин) пациентов в возрасте от 27 до 79 лет с новообразованиями кожи век и периорбитальной области (размером от 5 до 40 мм) без клинических признаков воспаления. 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

Всем пациентам предоперационно была проведена аутофлуоресцентная диагностика по методике, разработанной совместно с Е.А. Осиповой [19]. Для освещения исследуемой зоны использовали 2 люминесцентные лампы с максимумами возбуждающего излучения — 390, 415 и 433 нм. Фиксацию изображения осуществляли с помощью цифровой фотокамеры «Canon EOS 350». В соответствии с результатами гистологического исследования, были сформированы две группы: I — злокачественных (58 случаев) и II — доброкачественных (39 случаев) новообразований эпителиального происхождения. Кроме того, была сформирована группа из 15 здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 40 лет для

определения физиологического диапазона активности пролиферации в периорбитальной области.

Обработку изображений проводили в программе «Канцерплот» (рис. 1). В основу ее работы положен дифференциальный спектральный анализ, согласно которому в любой точке изображения с координатами (x, y) определяется долевое участие красного канала по формуле:

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

где $R\%_{x,y}$ — долевое 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 [20]. Их накопление обусловлено локальным дефицитом железа, развивающимся вследствие высокой митотической активности опухолевых клеток. Долевое участие красного канала в общем спектре флуоресценции отражает пролиферативную активность (показатель пролиферации) ткани в каждой точке [3]. Результаты расчетов выводятся в виде изолиний, очерчивающих области со сходными значениями пролиферации. Суждение об активности пролиферации новообразования в целом выносится после вычисления дельты пролиферации — разности значений показателя пролиферации для новообразования и прилежащих участков кожи, условно принимаемых за фон:

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

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

Таким образом, на первом этапе обработки флуоресцентных изображений для всех новообразований были получены данные об их пролиферативной активности.

Вторым этапом проводилась оценка вероятностных границ новообразования (патент RU 2400265). Целесообразность введения термина «вероятностные границы» обусловлена неравномерным характером инвазии опухоли, наличием зон скрытого роста и слабо выраженной (вплоть до полной идентичности спектров флуоресценции) функциональной атипии клеток. Поэтому была предложена методика оценки вероятности прохождения оптической границы опухоль/здоровая ткань в каждой точке изображения на основе анализа

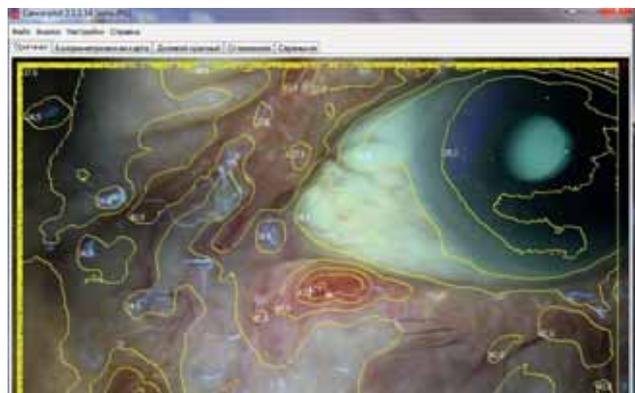


Рис. 1. Интерфейс программы «Канцерплот».



Рис. 2. Базально-клеточный рак кожи.

Примечание. а — базально-клеточный рак кожи, макрофото, б — аутофлуоресцентная фотография, в — красный канал аутофлуоресцентной фотографии.

его статистической контрастности. Она включает в себя несколько этапов:

1. Получение аутофлуоресцентного изображения на описанной выше установке (рис. 2).

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. 3а).

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

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

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

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 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} .

Совокупность измерений вероятностей прохождения границы составляет оптическое поле, описываемое гладкой трехмерной функцией. При программной визуализации разным значениям функции присваиваются разные оттенки серого (рис. 5): от темного (минимальная вероятность) до светлого (максимальная вероятность). Для удобства восприятия вероятностная граница переносится на исходное изображение (рис. 6).

Результаты и обсуждение

При обследовании группы здоровых добровольцев было установлено, что дельта пролиферации для любых соседних участков век и периорбитальной области в норме не превышает 3,9%.

Было выявлено, что флуоресцентная картина злокачественных и доброкачественных новообразований резко отличается. При обработке флуоресцентного изображения пациентки с плоскоклеточным раком кожи нижнего века (рис. 7б) была выявлена высокая пролиферативная активность в основании опухоли, на 12,5% превышающая фоновое значение для смежных неизмененных тканей (наружная половина нижнего века) (рис. 7в). Вероятностные оптические границы (рис. 7г) имели сложный рисунок и не везде могли быть определены с высокой степенью достоверности, что свидетельствует о высокой инвазивности новообразования. Синтетическая функция распределения (рис. 7д) имела два четко выраженных максимума, что отражает функциональную атипичность опухолевых клеток. При обработке флуоресцентного изображения пациента с доброкачественным образованием (рис. 8б), напротив, было обнаружено, что показатель пролиферации умеренно отклонялся от своих фоновых значений, $\Delta R = 6,3\%$ (в). Вероятностные оптические границы новообразования (г) с высокой степенью достоверности могли быть определены на всем протяжении. Построение синтетической функции распределения (д) не выявило выраженной функциональной атипичности в пределах опухоли (максимумы функции почти совпали).

У злокачественных новообразований век и периорбитальной области дельта пролиферации в основном составила от +6% до +10% (БКР, узловая форма, 25 случаев, рис. 9). Наиболее высокие цифры были отмечены при инфильтративной форме БКР (1 случай, ΔR 12,6%), а также при ПКР (2 случая, ΔR 15,7% и 11,2%). Однако в значительной части случаев (18) дельта пролиферации располагалась в зоне отрицательных и низких положительных значений (от -4% до +3,9%).

Мы считаем, что выявление низких и отрицательных значений показателя пролиферации в I группе может быть объяснено следующими причинами:

- медленным ростом новообразования;
- дегенеративным характером процесса (например, язвенная форма базально-клеточного рака кожи, $\Delta R < 0$ — здесь следует оговориться, что дельта пролиферации была отрицательной для всей области новообразования в 3 из 7 случаев язвенной формы БКР, в остальных 4 случаях мы получили отрицательную дельту пролиферации только на дне язвы, в то время как на периферии новообразования она составляла от +6% до +7%);

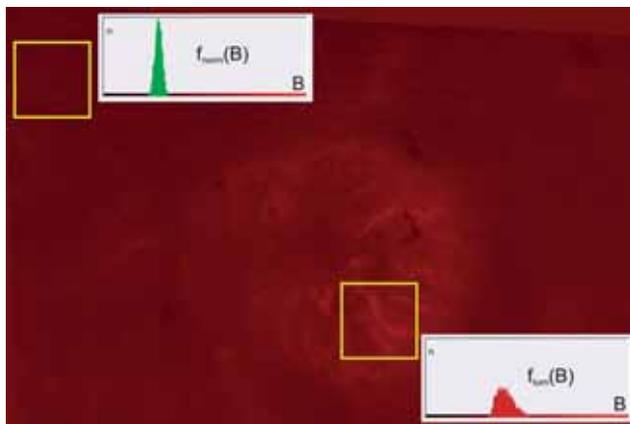


Рис. 3. Построение колориметрического массива V и функции f . *Примечание.* а — построение функции f_{norm} для участка здоровых тканей, б — построение функции f_{tum} для участка новообразования.

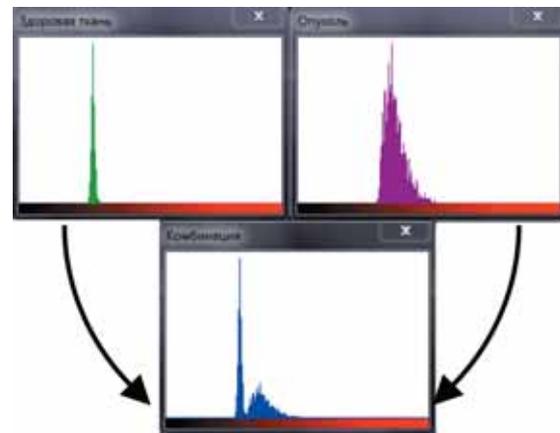


Рис. 4. Построение синтетической функции f_{model} .



Рис. 5. Поле вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань.



Рис. 6. Вероятностная граница между опухолью и здоровой тканью.

- вкладом поверхностно расположенных флуорофоров в суммарный спектр аутофлуоресценции зоны интереса (например, кератиновой бляшки), и тогда результат можно расценивать как ложноотрицательный.

В группе доброкачественных новообразований дельта пролиферации в большинстве случаев составила от +2% до +6%. Выявление относительно высоких значений дельты пролиферации во II группе можно объяснить:

- быстрым ростом новообразования (например, в случае кератоакантомы, старческого кератоза и др.);
- наличием субклинического воспаления;
- активной фазой рубцевания.

Ввиду того, что у значительной части пациентов обеих групп (27 и 12 случаев соответственно) дельта пролиферации попала в диапазон от +4% до +8% (т.е. в прямом применении метод обладает достаточно низкой специфичностью), мы выделили указанный диапазон в так называемую «зону неопределенности» и предложили оригинальное решение.

Решение проблемы «зоны неопределенности»

Для повышения специфичности метода нами был введен еще один параметр — коэффициент интерпозиции

K_{dith} , представляющий собой усредненную обратную величину к вероятности прохождения границы опухоль/здоровая ткань:

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

где K_{dith} — коэффициент «размытости» границ опухоли, P — вероятность прохождения границы опухоль/здоровая ткань, n — число точек, принадлежащих границе.

Результаты определения коэффициента «размытости» границ опухоли для разных значений дельты пролиферации представлены на рис. 10.

Видно, что в «зоне неопределенности» (т.е. в диапазоне от +4 до +8 по оси абсцисс) новообразования могут быть дифференцированы по коэффициенту «размытости» границ. У злокачественных новообразований он статистически выше, чем у доброкачественных, при тех же значениях дельты пролиферации. Точки, расположенные выше эмпирической прямой (см. рис. 10), связывающей дельту пролиферации и коэффициент «размытости» границ опухоли, с вероятностью 0,92 соответствуют злокачественному процессу.

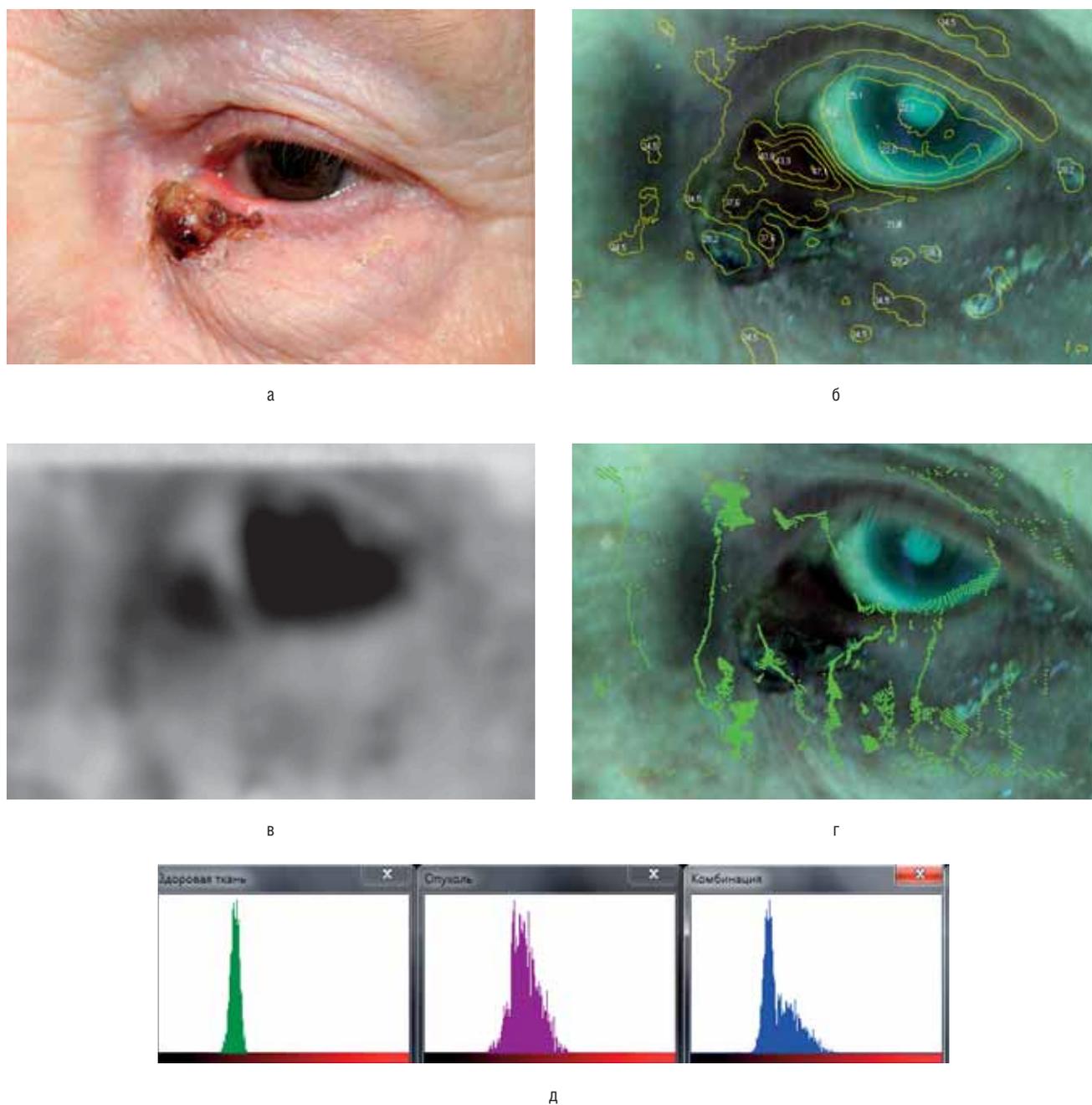


Рис. 7. Пациентка М. 73 года.

Примечание. а — плоскоклеточный рак внутренней части нижнего века (гист.), макрофото; б — аутофлуоресцентное изображение; в — аутофлуоресцентное изображение с нанесенными изолиниями показателя пролиферации; г — аутофлуоресцентное изображение с построенными вероятностными границами между новообразованием и здоровой тканью; д — функции распределения удельной яркости красного канала для участка здоровой ткани и опухоли, а также синтетическая функция для участка, на 50% занятого опухолью (комбинация).

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 «размытости» границ опухоли приведена в табл.

Таким образом, комплексное исследование пролиферации, вероятностных границ новообразования и коэффициента их «размытости» позволяет усовершенствовать первичную диагностику новообразований век и периорбитальной области эпителиального происхо-

ждения. Например, у пациентки М. (рис. 9) полученные данные о вероятностных границах плоскоклеточного рака нижнего века позволили внести коррекцию в объем резекции. Это особенно важно при локализации опухоли в трудных зонах, таких как внутренний угол глазной щели, когда расширение объема операции неизбежно сопровождается как минимум повреждением слезного мешка и медиальных связок век, а также асимметрией медиальных кантусов, но радикальная резекция, в свою очередь, чревата самыми драматичными осложнениями для этого типа новообразований.

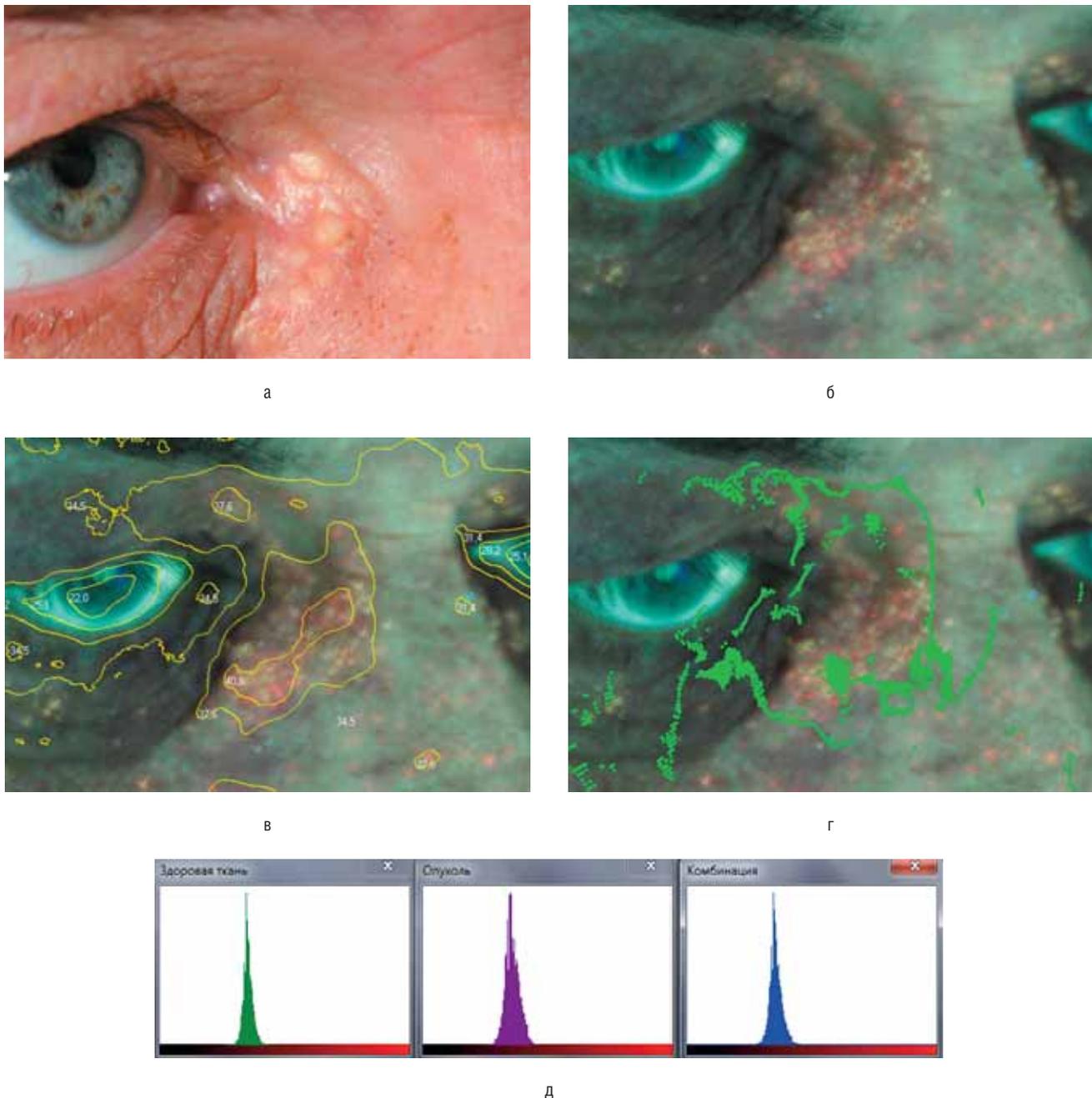


Рис. 8. Пациент О., 68 лет.

Примечание. а — внутренний угол глазной щели с протоковыми кератиновыми кистами (гист.), макрофото; б — аутофлуоресцентное изображение; в — аутофлуоресцентное изображение с нанесенными изолиниями показателя пролиферации; г — аутофлуоресцентное изображение с построенной вероятностной границей между новообразованием и здоровой тканью; д — функции распределения яркости красного канала для участка здоровой ткани и опухоли, а также синтетическая функция для участка, на 50% занятого опухолью (комбинация).

Заключение

На 97 пациентах с новообразованиями век и периорбитальной области эпителиального происхождения была впервые проведена апробация метода определения вероятностных оптических границ опухоли на основе анализа статистической контрастности флуоресцентного изображения. Ретроспективный анализ флуоресцентных изображений позволил выделить факторы, ограничивающие специфичность метода, и так называемую «зону неопределенности» - наиболее распространенный среди пациентов обеих групп

диапазон значений дельты пролиферации (от +4 до +8). Было предложено решение в виде коэффициента K_{dith} , количественно описывающего степень «размытости» границ новообразования, что, в свою очередь, отражает степень функциональной атипии опухолевых клеток и характер инвазии. Использование нового коэффициента существенно повышает специфичность метода (с 0,69 до 0,85) при сохранении чувствительности 0,7.

Полученные данные, по нашему мнению, могут быть экстраполированы на новообразования другой локализации.

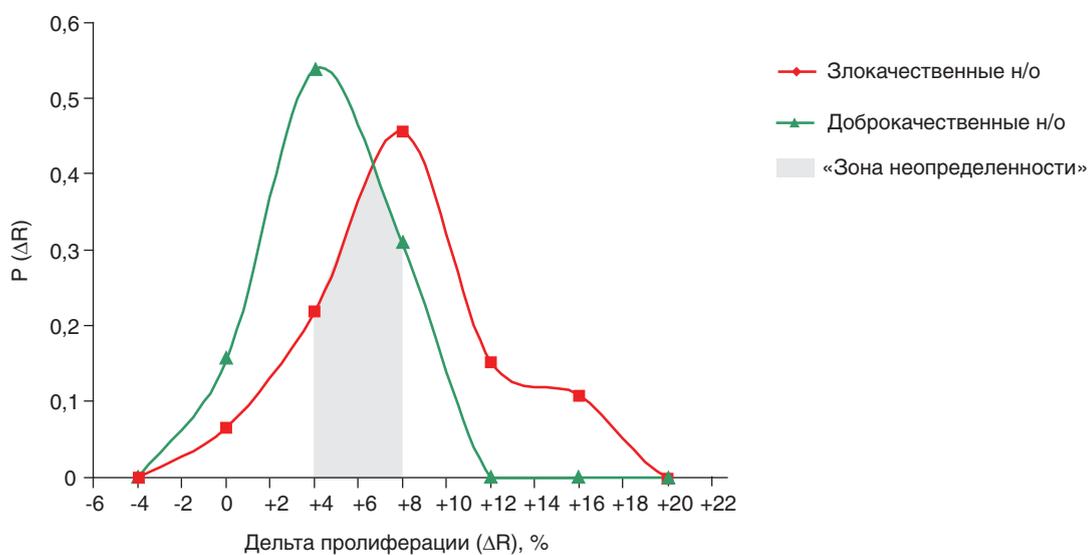


Рис. 9. Распределение пациентов в группах по значению дельты пролиферации

68

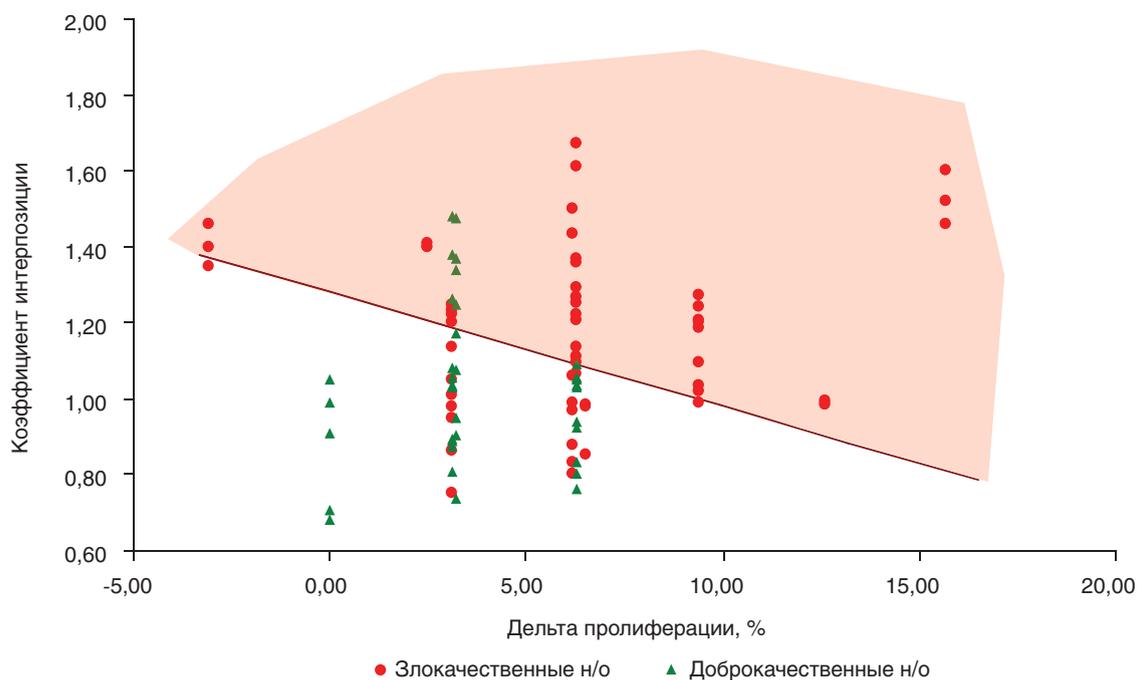


Рис. 10. Диаграмма соотношения коэффициента «размытости» границ опухоли и дельты пролиферации.

Примечание. Злокачественному процессу статистически соответствует область (выделена красным), отвечающая неравенству $K_{dith} > (-0,03) \times \Delta R + 1,3$.

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 «размытости» границ опухоли				
Положительный	6	40	Специфичность	0,85
Отрицательный	33	18	Чувствительность	0,71

Примечание. Н/о — новообразование.

ЛИТЕРАТУРА

4. Leuning A. et al. Fluorescence imaging and spectroscopy of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity. *Am J Surg.* 1996 Dec; 172 (6): 674–7.
5. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир. 1986. 496 с.
6. Бахтияров О.Р., Садыков Р.А. Порфирины и лазерное излучение в диагностике злокачественных опухолей. *Сов. Мед.* 1991 (11): 35–37.
7. Ericson MB, Uhre J, Strandeberg C, Stenquist B, Larko O, Wennberg AM, Rosen A. Bispectral fluorescence imaging combined with texture analysis and linear discrimination for correlation with histopathologic extent of basal cell carcinoma. *J Biomed Opt.* 2005 May–Jun.; 10 (3): 034009.
8. 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.
9. Payne J.W., Duke J.R., Butner R., et al. Basal cell carcinoma of the eyelids: a long-term follow-up study. *Arch Ophthalmol.* 1969; 81: 53–58.
10. Бровкина А.Ф. Офтальмоонкология. Руководство для врачей. М: Медицина. 2002. 421 с.
11. Scott K.R., Kronish J.W. Premalignant lesions and squamous cell carcinoma. In: Albert. D.M., Jakobiec F.A. Principles and Practice of Ophthalmology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders. 2000: 3369–3381.
12. Older J.J. Eyelid tumors. Clinical Diagnosis and Surgical Treatment. 2nd ed. New York: Raven Press. 2003: 14–19.
13. Kirkham N. Tumors and cysts of the epidermis. In: Elder D., Elenitsas R., Jaworsky C., et al., eds. Lever's Histopathology of the skin. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997: 708–716.
14. Груша Я.О., Исмаилова Д.С., Ризопулу Э.Ф. Хирургическое лечение злокачественных новообразований эпителиального происхождения. Опухоли головы и шеи. М., 2012; 2: 24–28.
15. Figue F. Fluorescence studies on cancer. *Can. Res.* 1944; 4 (8): 465–471.
16. Berq K. et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J Microsc.* 2005 May; 218 (2): 133–47.
17. Kopriva I., Persin A. Unsupervised decomposition of low-intensity low-dimensional multi-spectral fluorescent images for tumour demarcation. *Medical Image Analysis.* 2009; 13: 507–518.
18. Rahman et al. Evaluation of a low-cost, portable imaging system for early detection of oral cancer. *Head & Neck Oncology.* 2010; 2: 10
19. Осипова Е.А. Флуоресцентные методы исследования опухолей век и конъюнктивы на основе эндогенных и экзогенных флуорофоров: Дис... канд. мед. наук, М., 2009. 121 с.
20. Синичкин Ю.П. In vivo отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 2001. 92 с.

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

Е-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

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

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

Е-mail: natalfa@yandex.ru