

---

---

# ОБЗОРЫ

---

---

УДК: 616.62–006.6–073

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ПОВЕРХНОСТНОГО РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

**В.В. Соколов<sup>1</sup>, И.Г. Русаков<sup>1</sup>, Н.Н. Булгакова<sup>2</sup>, Р.В. Ульянов<sup>1</sup>, А.А.Теплов<sup>1</sup>**

*Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена<sup>1</sup>  
Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН<sup>2</sup>*

В обзоре представлен анализ литературы, посвященной методам флуоресцентной диагностики поверхностного рака мочевого пузыря. Флуоресцентная диагностика позволяет выявлять плоские интраэпителиальные и микропапиллярные опухоли мочевого пузыря, уточнять границы опухолевого поражения и количество экзофитных образований при мультицентричном раке мочевого пузыря.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, флуоресцентная диагностика.

FLUORESCENT METHODS IN DIAGNOSIS OF SUPERFICIAL BLADDER CANCER (literature review)

V.V. Sokolov<sup>1</sup>, I.G. Rusakov<sup>1</sup>, N.N. Bulgakov<sup>2</sup>, R.V. Ulyanov<sup>1</sup>, A.A. Teplov<sup>1</sup>

*P.A. Gertsen Moscow Research Institute of Oncology<sup>1</sup>*

*A.M. Prokhorov General Physics Institute, Moscow<sup>2</sup>*

Analysis of literature data concerning fluorescent diagnostic methods for bladder cancer has been presented. Fluorescent diagnosis allows intraepithelial and micropapillary bladder tumors to be detected and the extent of tumor involvement and the number of exophytic lesions to be determined.

Key words: bladder cancer, fluorescent diagnosis.

Рак мочевого пузыря (РМП) составляет 70 % от всех опухолей мочевого тракта [1]. Ежегодно в России регистрируется 11267 больных с впервые выявленным диагнозом РМП [2]. Более чем у 70–85 % больных выявляется поверхностный РМП при T<sub>a</sub>, T<sub>is</sub>, T<sub>1</sub> [5].

Основным методом лечения поверхностного РМП остается трансуретральная резекция (ТУР) с частотой рецидивирования 87–95 % (в среднем 91 %) [48, 49]. Рецидивирование заболевания после ТУР обусловлено мультицентричностью поражения слизистой мочевого пузыря, наличием не выявленных до операции скрытых очагов *сг in situ* и возможностью имплантации опухолевых клеток во время ТУР.

Основными факторами прогноза течения поверхностного РМП являются степень дифференцировки опухоли, количество опухолей к моменту лечения, размер опухолевого экзофита,

T-категория, время до возникновения рецидива после ТУР. В группу с хорошим прогнозом течения относят РМП с единичной опухолью T<sub>a</sub>, высокой дифференцировкой, менее 3 см в диаметре, с отсутствием рецидива после ТУР в течение одного года.

К дополнительным факторам прогноза могут быть отнесены наличие очагов *сг in situ*, инвазия лимфатических щелей, плоидность ДНК, опухолевые белки (рецептор эпидермального фактора роста, компоненты соединительной ткани, базальной мембраны, десмосомальный гликопротеин, рецептор трансферрина), цитогенетические факторы (p53, *с-мус*, *с-erb*, B-2).

В процессе первичной и уточняющей диагностики поверхностного РМП решаются следующие вопросы: определение глубины инвазии, выявление дополнительных *сг in situ* (CIS), комплексное определение допол-

нительных факторов прогноза. Для решения этих вопросов в большинстве клиник нашей страны используют рутинную цистоскопию с гистологическим исследованием биоптатов и транскутанное ультразвуковое исследование. Однако в большинстве случаев обследование в таком объеме не позволяет выявить скрытые очаги CIS, при опухолях T<sub>a</sub> и T<sub>1</sub> не удается дать полную количественную и прогностическую характеристику, а в ряде случаев определить истинные границы опухолевого поражения. Неверная оценка опухолевого поражения МП приводит к частым рецидивам после ТУР, что, в свою очередь, ведет к прогрессированию опухолевого процесса, исключающего органосохраняющие методы лечения.

Значительный прогресс в диагностике поверхностного РМП многие авторы связывают с использованием флуоресцентных методов, обладающих высокой чувствительностью в выявлении интраэпителиальных опухолей малых размеров. Данный обзор посвящен истории развития и основным достижениям флуоресцентных методов в диагностике РМП.

## 1. Аутофлуоресцентная диагностика РМП

Возможность диагностики злокачественных опухолей по собственной эндогенной флуоресценции (аутофлуоресценции) является объектом исследований различных специалистов как в нашей стране, так и за рубежом в течение длительного времени [2, 46, 54].

### 1.1. Принципы аутофлуоресцентной диагностики

Спектр аутофлуоресценции (АФ) биологических тканей формируется из спектров флуоресценции отдельных эндогенных флуорофоров, которые имеют широкие полосы поглощения и флуоресценции в УФ и видимом диапазонах спектра. В ближнем УФ и синем диапазоне возбуждается интенсивная флуоресценция флуорофоров соединительной ткани (различные формы коллагена, эластин), дыхательной цепи (НАДН, флавины), а также флуоресценция эндогенных порфиринов. Различные стадии опухолевой трансформации могут быть связаны с изменениями в концентрации,

пространственном распределении и/или метаболической активностью определенных эндогенных флуорофоров. Эти изменения отражаются на интенсивности и форме спектров АФ и могут быть использованы для получения диагностической информации. Различия в спектрах между нормой и опухолевой тканью составляют основу аутофлуоресцентной диагностики (АФД) рака.

Несмотря на то, что уже в 70-х гг. прошлого столетия в литературе были опубликованы данные о различиях в концентрации эндогенных флуорофоров между нормальными и недифференцированными уротелиальными клетками [6], флуоресцентные измерения с поверхности слизистой оболочки МП *in vivo* стали возможны только в 80-х гг. благодаря развитию оптоволоконной и лазерной техники.

Принципиальная возможность лазер-индуцированной АФД РМП впервые была показана в работе Alfano [9] на имплантируемых опухолях МП у грызунов. Диагностические различия регистрировались при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 488 нм и состояли в резком падении интенсивности АФ опухолей относительно нормальной слизистой МП.

### 1.2. Клинические результаты

Первые клинические исследования в этой области были проведены во Франции [12, 18]. Было показано, что при возбуждении излучением в УФ области (355 и 365 нм) интенсивность АФ в очагах CIS и переходно-клеточного рака (ПКР) была в 2,5 раза ниже, чем в нормальной уротелии. Основными флуорофорами, содержащимися в стенке МП, по-видимому, являются коллаген и НАДН [18].

Более глубокие исследования были проведены в США [40]. В работе, опубликованной в 1996 г., изучалась возможность АФ в дифференциальной диагностике злокачественных и доброкачественных опухолей МП. Результаты работы подтвердили данные, полученные другими авторами, о снижении (в этой работе до 20 раз) интенсивности АФ в очагах малигнизации относительно АФ нормальной слизистой. Во-вторых, было показано, что нормальная слизистая МП, очаги воспаления и злокачественные опухоли имеют достоверные различия в форме спектров АФ. Авторы разработали спектрально-

флуоресцентный диагностический алгоритм и оценили его диагностическую эффективность. Чувствительность, специфичность, положительные и отрицательные предсказательные величины выбранного алгоритма в дифференциальной диагностике злокачественных и доброкачественных поражений МП составили соответственно 97, 98, 93 и 99 %. В следующей работе этих авторов было впервые показано, что применение локальной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) для взятия прицельной биопсии в ходе рутинной цистоскопии позволяет снизить количество необходимых биопсий на 72 % [41].

Как отмечалось ранее, возбуждение в УФ части спектра (337 – 365 нм) эффективно возбуждает флуоресценцию молекул коллагена и восстановленного никотинамиддинуклеотида (НАДН). Глубина уротелия при наполненном МП составляет от 80 до 150 мкм. Глубина проникновения возбуждающего излучения составляет не более 500 мкм, а глубина слоя стенки МП, с которой измеряется сигнал АФ, составляет порядка 225 мкм [18]. По-видимому, основной вклад в регистрируемый спектр АФ вносит НАДН, который содержится во всех слоях стенки МП, и коллаген, который содержится в lamina propria и мышечном слое, но отсутствует в эндотелии. По мнению авторов, утолщение эндотелия в месте развития опухоли может приводить к ослаблению флуоресценции коллагена, которая излучается из подлежащих слоев стенки МП. Ранее такой механизм был предложен для объяснения причин падения интенсивности АФ при развитии интраэпителиальных опухолей бронха [47].

Что касается падения интегральной интенсивности АФ во всем регистрируемом диапазоне (300–700 нм), причиной этого авторы считают повышенное кровоснабжение опухолей, в результате чего часть излучения АФ опухолей перепоглощается оксигемоглобином. Однако предложенный механизм не может объяснить выявление при АФД очагов облигатного предрака (тяжелой дисплазии), преинвазивного и микроинвазивного рака, не имеющих повышенной васкуляризации.

Другой возможной причиной падения интенсивности АФ является уменьшение концентрации эндогенных флуорофоров в

неоплазированных клетках уротелия. Подтверждением этого предположения являются результаты, полученные Andjar [10]. В работе было показано, что при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 488 нм интенсивность флуоресценции уротелиальных клеток *in vitro* на порядок выше интенсивности АФ клеток переходного-клеточного рака МП (плохо-, умеренно- и хорошо дифференцированных). Поскольку спектры флуоресценции клеток при данном возбуждении были идентичны по форме спектрам флуоресценции флавинов, авторы сделали вывод о значительном уменьшении концентрации различных форм флавинов в клетках ПКР МП.

### 1.3. Аутофлуоресценция опухолей МП в красной области спектра

В заключение этой части обзора необходимо остановиться на вопросе об АФ злокачественных опухолей МП в красной области спектра (580–650 нм). Подробное исследование этого явления было проведено в работе мюнхенской группы, в которой на индуцируемой опухоли МП у крыс была изучена корреляция между интенсивностью «красной» флуоресценции и стадией перерождения нормальной слизистой оболочки МП: от дисплазии до инфильтративного рака [61]. Было показано, что АФ в красной области спектра возрастает по мере роста и развития опухолевого поражения. Это явление может быть связано с эндогенными порфиринами, накапливающимися в тканях злокачественных новообразований на различных стадиях их развития. Ткань злокачественной опухоли, имеющей высокую активность метаболизма и большую плотность микрососудов, может накапливать уро-, копро- и протопорфирины, поэтому в стадии активного роста и васкуляризации экзофитные опухоли МП имеют повышенную интенсивность флуоресценции в красной области спектра. «Красную» флуоресценцию дают также продукты гемолитических процессов. По мере возникновения в опухоли очагов ишемии «красную» флуоресценцию могут давать некоторые типы бактерий, способные продуцировать прото- и копропорфирины.

В очагах уротелиальных карцином с экзофитной формой роста регистрировалось до-

стоверное незначительное возрастание фоновой интенсивности АФ в области флуоресценции порфиринов (580–715 нм) при возбуждении с длиной волны 532 нм. Поскольку лазерное излучение данной длины волны эффективно возбуждает флуоресценцию порфиринов, можно предположить, что незначительный рост фоновой аутофлуоресценции в красной области спектра связан с повышением количества порфиринов, предшественников гема, в очагах неоплазии на начальной стадии процесса формирования сосудистой системы опухоли.

## **2. Экзогенная флуоресценция в диагностике РМП**

### **2.1. Экзогенные флуоресцентные маркеры опухолей МП**

Первые попытки использования экзогенных флуоресцирующих маркеров в диагностике РМП были описаны в литературе в начале 60-х гг. прошлого столетия [64], где были впервые использованы тетрациклины (оральный прием) для флуоресцентного детектирования опухолей МП. По результатам исследований, проведенных позднее этими авторами в группе из 175 пациентов, чувствительность данной методики в диагностике РМП составила 81 %, специфичность – 84 % [65]. В 1983 г. группа японских ученых сообщила о внутривенном применении метиленового синего для флуоресцентной визуализации плохо дифференцированных и ранних микроинвазивных опухолей [32]. Однако эта методика не нашла дальнейшего применения из-за большого количества ложноотрицательных результатов: в диагностике CIS их количество составило 68 %, в диагностике дисплазии – 84 % [63].

### **2.2. Экзогенные фотосенсибилизаторы как флуоресцентные маркеры опухолей МП**

В конце 80-х гг. начинается эпоха активного изучения возможностей метода фотодинамической терапии (ФДТ) рака. ФДТ основана на деструкции злокачественных опухолей в результате взаимодействия излучения определенной длины волны и фотосенсибилизатора (ФС), предварительно введенного в организм пациента [17].

Применяемые в клинической практике ФС обладают повышенной тропностью к злокачественной опухолевой ткани и при системном (внутривенном) введении длительно задерживаются в опухолевой ткани и более быстро выводятся из окружающей здоровой ткани [15]. Кроме того, большинство фотосенсибилизаторов для ФДТ флуоресцируют в красной области спектра.

Избирательность накопления и удерживания ФС злокачественной опухоли, а также возможность ее обнаружения по характерной флуоресценции при освещении излучением определенной длины волны составляют основу флуоресцентной диагностики (ФД) рака.

Современная эпоха применения ФС в онкоурологии началась в 1976 г. с публикации Kelly, в которой на резецированных МП была показана принципиальная возможность флуоресцентного детектирования ПКР МП в результате избирательного накопления в опухолях производного гематопорфирина (HrD), ФС первого поколения. Через 24 ч после его внутривенного введения в дозе 2 мг/кг веса тела яркая красная флуоресценция HrD детектировалась в CIS, дисплазиях и экзофитных опухолях и не детектировалась в нормальной слизистой и аваскулярных опухолях после лучевой терапии [39].

Впервые флуоресцентная цистоскопия МП была проведена в 1982 г. с помощью одного из первых описанных в научной литературе устройств для флуоресцентной бронхоскопии [13]. В исследовании принимали участие 4 пациента, которым внутривенно вводили HrD в дозе 2,5 мг/кг за 2 ч до флуоресцентного исследования.

Флуоресценцию порфиринов возбуждали в полосу Soret, наиболее сильную полосу поглощения порфиринов с максимумом в районе 400–410 нм, с помощью выделенных линий ртутной лампы. Флуоресцирующие участки слизистой МП были морфологически подтверждены как CIS.

В целом применение экзогенных ФС первого поколения на основе производных гематопорфирина, таких как Фотофрин II (очищенная фракция HrD, Канада), Фотосан (Германия), Фотогем (Россия), не получило широкого распространения для целей ФД в силу длительной фотосенсибилизации кожи пациентов и не-

обходимости соблюдения светового режима в течение 4-6 нед после системного введения данных препаратов в терапевтических дозах (2-3 мг/кг в.т.).

В 1993 г. в ходе клинических испытаний препарата Фотофрин П (очищенная фракция HpD) было проведено исследование по снижению вводимой дозы до диагностических значений 0.35–0.5 мг/кг, что позволило получить удовлетворительные результаты при ФД дисплазии и CIS МП [12].

При внутривезикулярном введении, как показано на экспериментальных животных на примере Фотофрина П, не происходит его избирательного накопления в опухолевых тканях.

### 3. 5-АЛК индуцированная диагностика РМЦ

С начала 90-х гг. в онкоурологии активно исследовались возможности применения 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) для диагностики РМП.

#### 3.1. Основы метода

5-АЛК является эндогенным соединением, одним из промежуточных продуктов синтеза гема. Ее избыточное введение в организм (системно или местно) приводит к ингибированию последнего этапа синтеза гема и накоплению его предшественника – эндогенного протопорфирина IX (ПП IX) [57].

В присутствии избыточного количества экзогенной 5-АЛК в опухолевых клетках происходит повышенная индукция и накопление ПП IX. Так, в клетках ПКР МП синтезируется в 10 раз большее количество ПП IX, чем в нормальной уротелии [22].

Причины селективности до конца не изучены, однако высказываются следующие предположения: повышенная проницаемость опухолевых клеток способствует проникновению в них 5-АЛК; опухолевые клетки накапливают 5-АЛК-индуцированный ПП IX; в опухолевых клетках снижена активность феррохелатазы – фермента, превращающего протопорфирин в гем [57].

Накопление ПП IX в опухолевых клетках происходит в течение нескольких часов, в то

время как в нормальных клетках он быстро утилизируется путем превращения в гем. Поскольку ПП IX интенсивно флуоресцирует в красной области спектра с максимумами на 635 нм и 705 нм, результатом его накопления в опухолевых клетках является возможность выявления опухолей по флуоресценции 5-АЛК индуцированного ПП IX. Данный феномен составляет основу метода 5-АЛК индуцированной фотодинамической диагностики (ФДД) РМП [60].

Независимо от способа введения (локально или системно) 5-АЛК индуцированная флуоресценция ПП IX характеризуется высокой тропностью к эпителиальным структурам.

#### 3.2. Клиническое применение 5-АЛК индуцированной ФДД РМП

Большинство пионерских работ в данной области принадлежит группе урологов из клиники Гроссхадерн Мюнхенского Университета. Они впервые использовали внутривезикулярное введение 5-АЛК для диагностики РМП у человека [43]. Исследования были проведены в группе из 68 пациентов с РМП. 3% раствор 5-АЛК вводили внутривезикулярно, через 1–3 ч проводили флуоресцентную диагностику с помощью стандартного цистоскопа через специально подобранные фильтры. При возбуждении флуоресценции слизистой оболочки МП с помощью лазерного излучения в синей области спектра (406 нм) опухолевые поражения визуализировались в красной флуоресценции 5-АЛК индуцированного ПП IX, при этом чувствительность и специфичность составили 100 % и 68 % соответственно.

В настоящее время общепринятая методика ФДД с 5-АЛК заключается в следующем: вводимая доза 5-АЛК составляет 1–1,5 г, 30–50 мл раствора 5-АЛК (рН 4,5–6) вводится внутривезикулярно, время удержания раствора в МП составляет не менее 2 ч (2–3 ч в среднем). По истечении этого срока проводится флуоресцентная цистоскопия. Специально для целей ФДД фирма Карл Шторц (Германия) разработала флуоресцентную аппаратуру, которая включает в себя: осветительную систему для возбуждения флуоресценции (D-Light System), специальный цистоскоп с встроенным фильтром для наблюдения флуо-

ресценции МП, видеокамеру (Telecam SL-PDD, KARL SRORZ GmbH & Co, Tuttingem, Germany) и монитор. Осветительная система включает ламповый ксеноновый источник и оснащена специальным фильтром, характеристики пропускания (380–460 нм) которого соответствуют максимуму возбуждения флуоресценции ПП IX в синей области спектра. Встроенный в эндоскоп фильтр имеет широкую полосу пропускания излучения в видимом диапазоне спектра (450–700 нм). Это позволяет наблюдать изображение слизистой МП в свете аутофлуоресценции (зеленая часть спектра), в свете отраженного от ткани (синего) возбуждающего излучения и в режиме так называемого цветового контрастирования. Режим цветового контрастирования сбалансирован таким образом, что позволяет избежать зависимости от геометрии измерений, лучше различать опухолевые и нормальные ткани и подавляет неспецифическую красную флуоресценцию здоровой слизистой МП.

При флуоресцентной визуализации поверхности МП папиллярные уротелиальные опухоли, плоские образования, такие как CIS и тяжелая дисплазия, ярко флуоресцируют на фоне здоровой слизистой МП. Интенсивность флуоресценции плоских и папиллярных опухолей в 5 и более раз превышает флуоресценцию окружающей здоровой слизистой МП. Инвазивные опухоли также интенсивно флуоресцируют. В то же время специфическая флуоресценция ПП IX не регистрируется в сосудистом эндотелии, соединительной ткани и мышечном слое МП.

В период с 1995 по 1999 г. в клинике Гросхадерн проводились клинические испытания метода ФДД РМП, результаты которых представлены в работе Zaak [67]. В ходе клинических испытаний у 605 пациентов было проведено 1012 флуоресцентных цистоскопий. У 212 пациентов был первичный РМП, 393 пациента проходили контрольное обследование по поводу рецидива ПКР МП. Общее количество биопсий составило 2475 (в среднем 2,4 биопсии на одну флуоресцентную цистоскопию). Чувствительность составила 97 %, специфичность – 65 %. РМП был морфологически подтвержден в 552 случаях (54,5 %), из них 34,2 % опухолей были выявлены только по 5-АЛК индуцированной флуоресценции ПП IX. Выявляемость CIS была

повышена до 56,8 % по сравнению с рутинной цистоскопией в белом свете. Количество ложноположительных результатов составило 34,7 % (n=352), ложно-отрицательных – 7,6 % (n=75). Причиной ложно-отрицательных результатов авторы считают очень слабый сигнал флуоресценции, который дают маленькие плоские опухоли. Фактически визуализация таких опухолей находится на пределе технических возможностей флуоресцентного цистоскопа. Известно, что в результате фотофизических процессов, происходящих в молекуле ПП IX при освещении синим светом, его флуоресценция затухает [60]. Это явление называется выгоранием ФС, или фотобликингом. Накопленный клинический опыт проведения ФДД показывает, что при флуоресцентной цистоскопии ПП IX практически полностью выгорает после 30 мин освещения [20]. Причем чем меньше размер опухолевого поражения, тем меньшее количество в нем индуцированного флуорофора и слабее интенсивность флуоресценции, поэтому выгорание красителя может приводить к «обесцвечиванию» маленьких опухолей за более короткий срок.

По данным других исследований, максимальная чувствительность ФДЦ составляет 93,4 % относительно 46,7 % максимальной чувствительности рутинной цистоскопии, при этом отмечается, что проведение ФДД после ТУР уменьшает скорость рецидивирования РМП на 20 % [59].

В работе Daniltchenko приведены результаты рандомизированного сравнительного исследования 5-летней выживаемости 115 пациентов с ТУР при обычной рутинной цистоскопии (39 пациентов) и при 5-АЛК индуцированной флуоресцентной цистоскопии (42 пациента). В первой группе медиана выявления первого рецидива после ТУР составила 5 мес, во второй – 12 мес. Безрецидивная выживаемость в первой группе составила 25 %, во второй – 41 %. Частота рецидивирования через 2, 12, 36 и 60 мес после первоначальной ТУР составила 41, 61, 73 и 75 % в первой группе и 16, 43, 59 и 59 % во второй группе соответственно. Общее количество рецидивов в первой группе составило 82, во второй – 61. Продолженный рост опухоли в первой группе наблюдался у 9, во второй – у 4 пациентов [16].

В исследовании Filbeck через 2 года после ТУР частота рецидивирования поверхностного РМП в группе из 191 пациента составила 10 % после 5-АЛК ФДД и 24 % после обычной рутинной цистоскопии [26].

В работе Кудашева описано, что через 2 года после ТУР частота рецидивирования РМП после флуоресцентной цистоскопии снизилась до 19,6 % относительно 39,6 % в контрольной группе [4].

### 3.3. Ложно-положительная флуоресценция

При ФДД с 5-АЛК индуцированная флуоресценция ПП IX различной степени интенсивности наблюдается в нормальной слизистой, в участках плоскоклеточной метаплазии, гиперплазии и воспаления. Неяркая флуоресценция ПП IX наблюдается при хронических воспалениях. Более яркую флуоресценцию ПП IX дает грануляционная ткань при воспалительных процессах после ТУР, поэтому флуоресцентную цистоскопию не рекомендуется проводить ранее чем через 6 нед после ТУР [10].

Была высказана гипотеза, что ложно-положительная флуоресценция в участках простой гиперплазии может быть связана с накоплением ПП IX в клетках уротелия на ранней стадии опухолевой трансформации, которая не выявляется при гистологическом исследовании. Это стимулировало проведение оценки специфичности флуоресцентной цистоскопии на молекулярно-генетическом уровне. Было показано, что до 70 % биоптатов с положительной флуоресценцией ПП IX и отрицательным результатом гистопатологии уже имеют генетические изменения, идентичные тем, которые присутствуют в папиллярных опухолях у тех же пациентов [34, 37, 56]. На основании данных результатов в новой классификации рака МП Всемирной организации здравоохранения уротелиальная гиперплазия рассматривается как возможный предрак [24, 70].

Таким образом, истинное количество ложно-положительных результатов ФДЦ МП может быть меньше, а истинная прогностическая значимость метода ФДД выше, поскольку метод позволяет выявлять раннюю предраковую трансформацию слизистой МП.

Причиной пониженной специфичности 5-АЛК индуцированной ФДД РМП является

и предшествующая внутривезикулярная химиотерапия [33]. Причем максимальное количество ложно-положительной флуоресценции (39,6 % относительно 25,7 % в группе без предшествующей терапии) регистрируется у тех пациентов, у которых интервал между внутривезикулярной терапией и проведением ФДД составлял менее 6 мес (количество ложно-положительной флуоресценции составляло 25,7 %).

Неспецифическая ложно-положительная флуоресценция наблюдается на выходе мочевого пузыря и предстательной части уретры почти у всех пациентов, и, как правило, в большинстве случаев здесь имеет место плоскоклеточная метаплазия. Артефактом является так называемая тангенциальная красная флуоресценция нормальной слизистой МП, которая всегда наблюдается при определенной геометрии расположения цистоскопа относительно поверхности МП.

### 3.4. Повышение специфичности 5-АЛК индуцированной ФДД

Для повышения диагностической точности и специфичности метода ФДД разрабатываются различные подходы. Эффективным является сочетание флуоресцентной визуализации с локальной флуоресцентной спектроскопией (ЛФС) [60, 2]. В МНИОИ им. П.А. Герцена разрабатывается комбинированный подход, при котором после выявления во флуоресцентном изображении подозрительных очагов в них *in vivo* проводятся измерения спектров флуоресценции в диапазоне 450–800 нм. Разработанный спектрально-флуоресцентный диагностический алгоритм учитывает не только интенсивность индуцированной флуоресценции ПП IX, но и интенсивность аутофлуоресценции в подозрительных участках, что позволяет повысить прогностическое значение метода [2]. В РОНЦ был разработан метод спектрального флуоресцентного контроля эффективности ТУР на биоптатах *ex vivo* [4].

Уже упомянутая ранее Мюнхенская группа для оптимизации 5-АЛК индуцированной ФДЦ применила АФД [31]. После проведения ФДЦ все участки, в которых регистрировалась положительная флуоресценция ПП IX, проверяли в режиме аутофлуоресцентного изображения. Всего было диагностировано 24 доброкаче-

ственных и 10 злокачественных опухолей (43 биопсии). Папиллярные опухоли, плоские поражения и нормальная слизистая МП показали контрастные различия в аутофлуоресцентном изображении. В результате специфичность комбинированного подхода составила 88 %, в то время как в данном исследовании специфичность одной 5-АЛК индуцированной ФДЦ составила 67 %.

Другим эффективным направлением повышения специфичности 5-АЛК индуцированной ФДЦ РМП оказалась модификация 5-АЛК в гексильный эфир 5-АЛК [50]. Клинические испытания показали, что в сравнении с АЛК инстилляция раствора гексильного эфира 5-АЛК в 20 раз меньшей концентрации индуцирует в 2–4 раза большее накопление в ПП IX, при этом скорость индукции возрастает в 2 раза. Более того, при использовании гексильного эфира 5-АЛК значительно снижается количество ложно-положительной флуоресценции (в среднем до 17 %) и замедляется выгорание ПП IX, что позволяет удлинить сеанс обследования [36, 53].

В 2005 г. препарат Гексвикс, на основе гексильного эфира 5-АЛК (PhotoCure ASA, Норвегия), был разрешен для диагностики РМП в 26 странах ЕС [70].

В нашей стране в ГНЦ РФ «НИОПИК» по оригинальной технологии синтезирована стандартная субстанция 5-АЛК и на ее основе совместно с МНИОИ им. П.А. Герцена разработан лекарственный препарат «Аласенс», который применяется для ФДЦ РМП.

### 3.5. Сравнение ДФ Ди ФДЦ

Szygula et al. провели сравнительное исследование двух флуоресцентных методов диагностики РМП. В группу входил 281 пациент после ТУР по поводу ПКР РМП без признаков рецидивов при обычной цистоскопии в белом свете. У 52 пациентов была проведена ФДЦ с 5-АЛК, у 229 — АФ диагностика. Для флуоресцентной цистоскопии была адаптирована диагностическая LIFE система (Ксилекс, Канада). По результатам исследования чувствительность и специфичность ФДЦ составили 90,91 и 66,60 % соответственно, АФД — 97,83 и 70,07 % соответственно. Таким образом, несмотря на небольшие различия, чувствительность АФД была достоверно выше,

чем чувствительность ФДЦ. Чувствительность и специфичность комбинации двух флуоресцентных методов составили 96,49 и 69,46 % соответственно, что достоверно превышало возможности обычного диагностического исследования в белом свете [62].

## 4. ФД РМП с препаратом Гиперицин

В последние годы большой интерес вызывает применение для целей ФД и ФДТ препарата природного растительного происхождения Гиперицина (*Hypericin perforatum*). Данный препарат является эффективным гидрофобным ФС с высоким квантовым выходом образования синглетного кислорода (0,73) и интенсивной флуоресценцией в красной области (594 и 642 нм) [38, 66].

D'Hallewin et al. первыми провели клиническое исследование возможностей флуоресцентной диагностики с препаратом Гиперицин при РМП [19, 20, 21]. В исследовании участвовали 87 пациентов, которым за 2 ч до проведения флуоресцентной цистоскопии внутривезикулярно вводили гиперицин в очень маленьких концентрациях (6 цМ препарата в 40 мл раствора). Флуоресцентную цистоскопию проводили с помощью D-Light System (Karl Storz GmbH). Чувствительность и специфичность в выявлении CIS МП составили 94 и 95 % соответственно. При этом отмечалось полное отсутствие выгорания флуоресценции Гиперицина в ходе всего обследования и последующей ТУР, а также отсутствие ложно-положительной флуоресценции воспалительных тканей. Ложно-положительная флуоресценция детектировалась только в случаях предшествующей внутривезикулярной БЦЖ терапии. Гиперицин рассматривается многими авторами как альтернатива 5-АЛК, однако применение этого препарата для флуоресцентной диагностики и ФДТ РМП пока находится на стадии клинического исследования [20, 21].

### Заключение

Представленные в данном обзоре клинические результаты убедительно показывают большой потенциал флуоресцентных методов в диагностике поверхностного РМП. Основными

достоинствами АФД и 5-АЛК индуцированной ФДД является эндогенное происхождение флуоресцентного контраста между здоровыми и патологически измененными тканями, эндогенное происхождение 5-АЛК и возможность ее местного (внутрипузырного) применения, а также отсутствие побочных эффектов. ФДД позволяет выявлять плоские интраэпителиальные и микропапиллярные опухоли МП, уточнять границы опухолевого поражения и, учитывая мультицентричность роста РМП, количество экзофитных образований.

Флуоресцентные методы, обладающие близкой к 100 % чувствительностью выявления поверхностных опухолей малых размеров, не позволяют определять глубину (инвазию) опухолевого поражения. Возможно, перспективным направлением в решении этой проблемы является сочетанное применение флуоресцентных методов с другими оптическими технологиями [14], в частности методом оптической когерентной томографии [3].

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Злокачественные новообразования в России в 2002 году (заболеваемость и смертность)* / Под ред. В.И. Чисова, В.В. Старинского, М., 2004.
2. *Состояние онкологической помощи населению России в 2003 году* // Под ред. В.И. Чисова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2004. 195 с.
3. *Загайнова Е.В., Стрельцова О.С., Орлова А.Г. и др.* Комбинированное использование флуоресцентной цистоскопии и оптической когерентной томографии для диагностики рака мочевого пузыря // *Онкоурология: Материалы I Конгресса Российского общества онкоурологов*. М., 2006. С. 81–82.
4. *Кудашев Б.В.* Применение метода флуоресцентной диагностики для повышения радикализма трансуретральной резекции мочевого пузыря: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2001.
5. *Матвеев Б.П., Фигурин К.М., Кагзякин О.Б.* Рак мочевого пузыря. М., 2001.
6. *Романенко А.М., Миргородская Л.Н.* Гистохимические характеристики окислительно-восстановительных ферментов в эпителиальных опухолях мочевого пузыря // *Вопросы онкологии*. 17:43, 197.
7. *Русakov И.Г., Быстров А.А.* Хирургическое лечение, химио- и иммунотерапия больных поверхностным раком мочевого пузыря // *Практическая онкология*. 2003. Т. 4, № 4. С. 214–224.
8. *Чисов В.И., Соколов В.В., Булгакова Н.Н., Филоненко Е.В.* Флуоресцентная эндоскопия, дермаскопия и спектрофотометрия в диагностике злокачественных опухолей основных локализаций // *Российский биотерапевтический журнал*. 2003. Т.2, №4. С.45–56.
9. *Alfano R.R., Tata D.B., Tomashofsky P. et al.* Laser undused fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue // *IEEE Quantum Electron*. 1984. Vol. 20. P. 1502.
10. *Anidjar M., Cussenot O., Blais J. et al.* Argon laser induced autofluorescence may distinguish between normal and tumor human urothelial cells: a microspectrofluorimetric study // *J. Urol*. 1996a. Vol. 55. P. 1771–1774.
11. *Babjuk M., Soukup V., Petrik R. et al.* 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence cystoscopy during transurethral resection reduces the risk of recurrence in stage Ta/T<sub>1</sub> bladder cancer // *BJU International*. 2005. Vol. 96. P. 798–802.
12. *Baert L., Berg R., Van Damme B. et al.* Clinical fluorescence diagnosis of human bladder carcinoma following low-dose Photofrin injection // *Urology*. 1993. Vol. 41. P. 322–330.
13. *Benson Jr R.C., Farrow G., Kinsey J. et al.* Detection and localization of in situ carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative // *Mayo ClinProc*. 1982. Vol. 57. P. 548–555.
14. *Crow P., Stone N., Kendah C.A. et al.* Optical diagnostics in urology: current applications and future prospects // *BJU International* 2003. Vol. 92. P. 400–407.
15. *Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.* Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagn Photodyn Ther* 2004. Vol. 1. P. 279–93.
16. *Danilchenko D., Riedl C.R., Sachs M.D. et al.* Long-term benefit of 5-aminolevulinic acid fluorescence assisted transurethral resection of superficial bladder cancer: 5-year results of a prospective randomized study // *The Journal of Urology*. 2005. Vol. 174; 6,2119–2133.
17. *Dougherty T.J., Gomer C., Henderson B. et al.* Photodynamic therapy [Review] // *J. Natl. Cancer Inst*. 1998. Vol. 90. P. 889–905.
18. *D'Hallewin M.A., Baert L., Vanherzeghe H.* Fluorescence imaging of bladder cancer // *Acta Urol. Bel.*, 1994. Vol. 62. P. 49.
19. *D'Hallewin M.A., De Witte P., Waelkens E. et al.* Fluorescence detection of flat bladder carcinoma in situ after intravesical instillation // *J. Urol*. 2000. Vol. 164. P. 349–351.
20. *D'Hallewin M., Kamuhavyra A., Roskams T. et al.* Hypericin-based fluorescence diagnosis of bladder carcinoma. *BJU Int* 2002; Vol. 89. P. 760–763.
21. *D'Hallewin M.A., Bezdetsnaya L., Guillemain F.* Fluorescence detection of bladder cancer: a review // *Eur. Urol*. 2002. Vol. 42. P. 417–25.
22. *Datta S.F., Loh C.S., MacRobert A.J. et al.* Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma // *Br. J. Cancer*. 1998. Vol. 78. P. 1113–1118.
23. *Dugan M., Crawford E., Nseyo U.* Photodynamic therapy (PDT) after transurethral resection (tur) for superficial papillary bladder carcinoma (SBC): a randomized trial // *ProcASCO*. 1991. Vol. 10. P. 173.
24. *Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. eds.* World Health Organization of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press, 2004.
25. *Filbeck T., Pichlmeier U., Knuechel R. et al.* Reducing the risk of superficial bladder cancer recurrence with 5-aminolevulinic acid induced fluorescence diagnosis. Results of a 5-year study // *Urologe A*. 2003. Vol. 42. P. 1366–1373.
26. *Filbeck T., Pichlmeier U., Knuechel R. et al.* Clinically relevant improvement of recurrence-free survival with 5-aminolevulinic acid induced fluorescence diagnosis in patients with superficial bladder tumors // *J. Urol*. 2002. Vol. 168. P. 67–71.
27. *Filbeck T., Pichlmeier U., Knuechel R., Wieland W.F., Roessler W.* Do patients profit from 5-aminolevulinic acid induced fluorescence diagnosis in transurethral resection of bladder carcinoma? // *Urology*. 2002. Vol. 60. P. 1025–1028.
28. *Filbeck T., Roessler W., Knuechel R. et al.* 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy applied at secondary transurethral resection after conventional resection of primary superficial bladder tumors // *Urology*. 1999. Vol. 53. P. 77–81.
29. *Filbeck T., Roessler W., Knuechel R. et al.* Clinical results of the transurethral resection and evaluation of superficial bladder carcinomas by means of fluorescence diagnosis after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid // *J. Endourol*. 1999. Vol. 13 P. 117–121.
30. *Filbeck T., Wimmershoff M.B., Pichlmeier U. et al.* No generalized skin phototoxicity after application of 5-aminolevulinic acid

- for fluorescence diagnosis of superficial bladder cancer // Urol. Int. 2000. Vol. 64. P. 126–8.
31. *Frimberger D., Zaak D., Stepp H. et al.* Autofluorescence imaging to optimize 5-ALA-induced fluorescence endoscopy of bladder carcinoma // Urology. 2001. Vol. 58. P.372–375.
  32. *Fukui I., Yokokawa M., MItani G., Ohwada F. et al.* In vivo staining test with methylene blue for bladder cancer // J. Urology. 1983. Vol. 130. P. 252–255.
  33. *Grimbergen MCM, Van Swol CFP, Jonges TGN et al.* Reduced specificity of 5-ALA induced fluorescence in photodynamic diagnosis of transitional cell carcinoma after previous intravesical therapy // Eur. Urol. 2003. Vol. 44. P. 51–56.
  34. *Hartmann A., Rosner U., Schlake G. et al.* Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis // Lab. Invest. 2000. Vol. 80. P. 709–718.
  35. *Jichlinski P., Forrer M., Mizeret J. et al.* Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results // Lasers Surg Med. 1997. Vol. 20. P. 402–408.
  36. *Jichlinski P., Guillou L., Karlson S.J. et al.* Hexyl aminolevulinic acid fluorescence cystoscopy: new diagnostic tool for photodiagnosis of superficial bladder cancer – a multicenter study // J. Urol. 2003. Vol. 170. P. 226–229.
  37. *Junker K., Kania C., Fiedler W., Hartman A. et al.* Molecular genetic evaluation of fluorescence diagnosis in bladder cancer // Int. J. Oncol. 2002. Vol. 20(3). P. 647–653.
  38. *Kamuhabwa A., Cosserat-Gerardin I., Didelon J. et al.* Biodistribution of hypericin in orthotopic transitional cell carcinoma bladder tumors: implication for whole bladder wall photodynamic therapy // Int J. Cancer. 2002. Vol. 97. P. 126–132.
  39. *Kelly J.E., Snell M.E.* Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder // J. Urol. 1976. Vol. 115. P. 150–151.
  40. *Koenig F., McGovern F.J., Althausen A.F., Deutsch T.F., Schomacker K.T.* Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer // J. Urol. 1996. Vol. 156. P.1597–1601.
  41. *Koenig F., McGovern E.J., Enquist H. et al.* Autofluorescence guided biopsy for the early diagnosis of bladder carcinoma // J. Urol. 1998. Vol. 159. P.1871–1875.
  42. *Koenig F., McGovern F.J., Larnie R. et al.* Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced 5-aminolevulinic acid. BJU Int 1999. Vol. 83. P. 129–135.
  43. *Kriegmair M., Baumgartner R., Knuechel R. et al.* Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid // Urology. 1994. Vol. 44. P. 836–841.
  44. *Kriegmair M., Baumgartner R., Knuechel R. et al.* Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence // J. Urol. 1996. Vol. 155. P. 105–109.
  45. *Kriegmair M., Zaak D., Rothenberger K.H. et al.* Transurethral resection for bladder cancer using 5-aminolevulinic acid induced fluorescence endoscopy versus white light endoscopy // J. Urol. 2002. Vol. 168. P. 475–478.
  46. *Kurie J.J., Lee R., Morice G. et al.* Hong Autofluorescence bronchoscopy in the detection of squamous metaplasia and dysplasia in current and former smokers // J. Natl. Cancer Inst. 1998. Vol. 90. P. 991–995.
  47. *Lam S., MacAulay C., Hung J. et al.* Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device // J. Thorac Cardiovasc Surg 1993. Vol. 105. P. 1035–1040.
  48. *Lamm D.L.* Long term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. (Review) // Urol Clin North Am 1992. Vol. 19. P. 573–580.
  49. *Lamm D.L.* Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer. J. Urol. 1985. Vol. 134. P. 40–47.
  50. *Lange N., Jichlinski P., Zellweger M. et al.* Photodetection of early human bladder cancer based on the fluorescence of 5-aminolevulinic acid hexylester-induced protoporphyrin IX. a pilot study. Br. J. Cancer. 1999. Vol. 80. P. 185–193.
  51. *Lipson R.L., Baldes E.L., Olsen A.M.* Hematoporphyrin derivative: a new aid of endoscopic detection of malignant disease // J. Thorac Cardiovasc Surg. 1961. Vol. 42. P. 623–629.
  52. *Lipson R.L., Gray M.L., Baldes E.J.* Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Proceedings of the IXth International Cancer Congress. 1966. P. 323.
  53. *Marti A., Jichlinski P., Lange N. et al.* Comparison of aminolevulinic acid and hexylester aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX distribution in human bladder cancer // J. Urol. 2003. Vol. 170. P. 428–432.
  54. *Niepsuj K., Niepsuj G., Cebula W. et al.* Autofluorescence endoscopy for detection of high-grade dysplasia in short-segment Barrett's esophagus // Gastrointest Endosc. 2003. Vol. 58. P. 715–719.
  55. *Nseyo U., Dehaven J., Dougherty T.* Photodynamic therapy (PDT) in the management of patients with resistant superficial bladder cancer: a long term experience // J. Clin Laser Med Surg. 1998. Vol. 16. P. 61–68.
  56. *Obermann E.C., Junker K., Stoehr R. et al.* Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses // J. Pathol. 2003. Vol. 199. P. 50–57.
  57. *Penq Q., Berg K., Moan J., Kongshaug M., Nesland J.M.* 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research // Photochem Photobiol. 1997. Vol. 65. P. 235–251.
  58. *Popken G., Schutze-Seeman W., Seiler K.U. et al.* Intravesical administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) Safety and pharmacokinetics of 5-ALA and its metabolite protoporphyrin IX // Eur. J. Clin Pharmacol. 2000. Vol. 56. P. 241–246.
  59. *Riedl C.R., Danilichenko D., Koenig F. et al.* Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer // J. Urol. 2001. Vol. 165. P. 121–123.
  60. *Stepp H., Wagner M., Zaak D., Knuchel R.* Fluorescence diagnosis of bladder tumours using 5-ALA -fundamentals and results. Munich; 1999.
  61. *Stroka R., Baumgartner R., Buser A. et al.* Laser assisted detection of endogenous Porphyrin in Malignant Diseases, Proceedings of SPIE, 1991. Vol. 1641. P. 99–105.
  62. *Szygula M., Woiciechowski B., Adamek M., Pietrusa A. et al.* Fluorescent diagnosis of urinary bladder cancer - a comparison of two diagnostic modalities // Photodiagnosis and Photodynamic therapy. 2004. Vol. 1. P. 23–26.
  63. *Vicente J., Chechile G., Algaba F.* Value of in vivo mucosa-staining test with methylene blue in the diagnosis of premalignant and tumoral lesions of the bladder // Eur. Urol. 1987. Vol. 13. P. 15–16.
  64. *Whitwore W.F., Bush I.M., Esquivel E.* Tetracycline ultraviolet fluorescence in bladder carcinoma // Cancer. 1964. Vol. 17. P. 1528–1532.
  65. *Whitwore W.F., Bush I.M.* Ultraviolet cystoscopy // JAMA. 1986. Vol. 203. P. 153–155.
  66. *Yamazaki T., Ohta N., Yamazaki I., Song P.S.* Excited state properties of hypericin: electronic spectra and fluorescence decay kinetics // J. Phys Chem. 1993. Vol. 97. P. 7870–7875.
  67. *Zaak D., Frimberger D., Stepp H. et al.* Quantification of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection // J. Urol. 2001. Vol. 166. P. 1665–1669.
  68. *Zaak D., Hungerhuber E., Schneede P. et al.* Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions // Cancer. 2002. Vol. 95. P. 1234–1238.
  69. *Zaak D., Stepp H., Baumgartner R., Schneede P. et al.* Ultraviolet-excited (308 nm) autofluorescence for bladder cancer detection // Urology. 2002. Vol. 60. P. 1029–1033.
  70. *Zaak D., Karl A., Knuchel R. et al.* Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. BJU International 2005. Vol. 96. P. 217–222.

Поступила 14.06.07