

## МОРФОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ АУТОЛЮМІНЕСЦЕНТНОЇ ЕНДОСКОПІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РАКУ ГОРТАНІ

Клочков Є.І., Сержко Ю.О.

Отдел онкопатологии ЛОР-органов, Институт отоларингологии им. А. Коломийченко НАМН Украины, Киев

### The Morphological Grounds of Employment of Autofluorescent Endoscopy for Laryngeal Cancer Diagnosis

E.I. Klochkov, Yu.O. Serezhko

Institute of Otolaryngology named by O. Kolomyichenko NAMS of Ukraine, Kiev

Received: March 24, 2016

Accepted: May 26, 2016

#### Адреса для кореспонденції:

Институт отоларингологии НАМН Украины  
вул. Зоологічна, 3, Київ, 03680  
тел.: (+38)-044-483-22-02  
e-mail: yalse@mail.ru

#### Summary

The autofluorescence of the larynx tumors from 63 patients was studied. The endoscopy shows green autofluorescence of different intensity. Histological investigation of cryostat specimens shows green autofluorescence of intact squamous epithelium, connective structures of tumor stroma and absence of cells autofluorescence in the cancer parenchyma.

The morphological study of biopsy, taken during laryngoendoscopy, shows that histological structures of tissue with weakly positive autofluorescence significantly more often are identified as the simple squamous epithelial hyperplasia, with absence of autofluorescence — as squamous cell cancer.

The using of autofluorescence when exophit and mixed forms of squamous cell cancer permit to reveal the local endoscopic effect of absent of autofluorescence. This raises the informativity of endoscopic investigation and improve the visualization of larynx cancer.

*Key words: larynx, morphology, endoscopy, cancer, autofluorescence.*

#### Вступ

Діагностика раку гортані, незважаючи на доступність цієї локалізації для візуального спостереження,

є однією з найскладніших проблем сучасної онкології. Складність визначення раку при місцево-поширених формах нерідко призводить до несприятливого прогнозу. Одним з напрямків ранньої діагностики передракових та ракових змін епітелію є сучасна аутолюмінесцентна ендоскопія, яка дозволяє досліджувати стан слизових оболонок *in vivo*. Фізичний принцип методу базується на збудженні власної, без використання флюорохромів, люмінесценції (аутолюмінесценції) живих тканин світлом з довжиною хвилі (375–440) нм. Для збудження аутолюмінесценції використовуються спеціальні джерела світла, такі як ксенонова лампа або напівпровідниковий лазер, що викликають свічення тканин в жовто-зеленій полосі спектру [1].

Кількість речовин, що люмінесцують в даній спектральній області досить велика, але тільки з деякими з них доводиться неминуче стикатись при дослідженні будь-яких клітин. До останніх належать компоненти систем енергетичного обміну, такі як відновлені піридин-нуклеотиди, (нікотинамідаденіндинуклеотид (НАДН),

нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФН) та окислені флавопротеїди (флавінмононуклеотид (ФМН), флавінаденіндинуклеотид (ФАД)). Відновлені форми НАД та НАДФ мають характерні спектри поглинання і полосу власної люмінесценції, максимум якої лежить в інтервалі (465–480) нм. Як це було встановлено ще Варбургом О., при переході НАДН і НАДФН в окислений стан вони втрачають здатність до люмінесценції. При зв'язуванні піридиннуклеотидів з дегідрогеназами максимум полоси люмінесценції зсувається в бік більш коротких довжин хвиль до 440 нм і інтенсивність люмінесценції збільшується. Окислені флавопротеїди люмінесцують при 520 нм. Власна люмінесценція притаманна також порфіриновій структурі, яка є основою простетичних груп таких поширених сполук, як цитохроми, пероксидаза, каталаза, гемоглобін і міоглобін. В гемопротеїнах люмінесценція дещо «згашена» присутністю атома заліза. Власну люмінесценцію також випромінюють в різних частинах оптичного спектру окремі амінокислоти, білки, волокнисті структури сполучної тканини. Тобто, джерелами люмінесценції в тканинах можуть виступати: коензими (ФМН, ФАД, НАДН, НАДФН); структурні протеїни (колаген, еластин, кератин); ендогенні порфірини (цитохроми, пероксидаза, каталаза). Аутолюмінесцентний профіль тканини, таким чином, залежить від гістологічної структури та біохімічного складу і завжди є сумою одиничних спектрів люмінесценції її елементів [2].

Аутолюмінесценція здорових тканин спостерігається в зеленій частині оптичного спектру в діапазоні від 470 до 800 нм. Епітелій передракових і злоякісних новоутворень випромінює люмінесценцію меншої інтенсивності, ніж епітелій нормальної слизової оболонки. Різниця між ними в інтенсивності випромінювання світла обумовлюється змінами у структурі тканин, зниженим вмістом в них компонентів систем енергетичного обміну, що здатні до люмінесценції, особливостями гемоциркуляції.

*Метою роботи* було виявлення структурних утворень нормальної та зміненої слизової оболонки, які випромінюють власну люмінесценцію, а також морфологічна верифікація встановлених при аутолюмінесцентній ларингоендоскопії патологічних змін голосових складок.

## Матеріали та методи

В роботі аналізувались результати проведеного гістопатологічного дослідження матеріалу від 63 хворих з новоутвореннями гортані. В 35 випадках виявлено плоскоклітинний рак різного ступеня диференціювання. У 9 хворих було встановлено інтраепітеліальні

ураження важкого ступеня, такі як гіперплазія багатошарового плоского епітелію (БПЕ) з дисплазією II (Д2) або III (Д3) ступеня, карцинома *in situ* (CIS). У 14 випадках констатовано просту гіперплазію БПЕ без дисплазії. Аденокарциному було діагностовано у 1 хворого, наявність грануляційної тканини в біоптаті — у 3 хворих, у 1 хворого виявлено туберкульозне ураження голосової складки.

Для вивчення аутолюмінесценції (первинна люмінесценція нативних тканин) слизової оболонки гортані використовувались криостатні зрізи заморожених в рідкому азоті тканин без їх подальшої фіксації і забарвлення. Монтовані на предметні скельця зрізи досліджувались в люмінесцентному мікроскопі при опроміненні синім світлом. Для визначення деталей гістологічної структури тканинні зрізи після люмінесцентної мікроскопії фіксувались у спирт-формаліні і забарвлювались гематоксиліном та еозином з подальшим дослідженням у світлооптичній системі мікроскопа (контроль I). Після цього препарат вдруге досліджувався у люмінесцентній системі мікроскопа для виявлення вторинної люмінесценції тканинних структур, викликаної флюорохромним забарвленням еозином (контроль II).

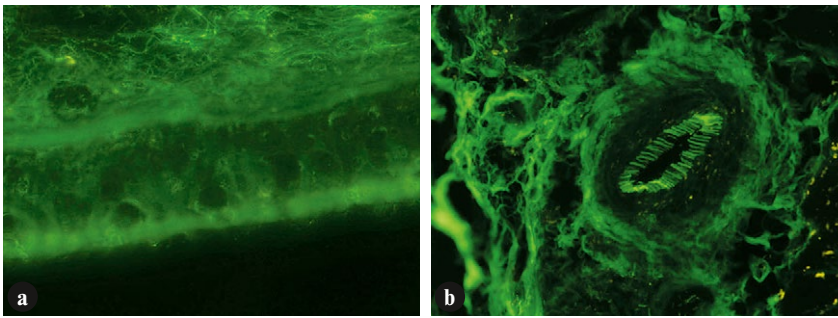
Люмінесцентна ендоскопія гортані проводилась за допомогою відеобронхоскопу *EVIS Lucera AFI BF-F260 (Olympus)*. Гістологічні дослідження проводились на люмінесцентному мікроскопі *Olympus BX 53* (Японія).

Статистична обробка отриманих результатів проводилась із застосуванням непараметричних критеріїв  $\chi^2$  та Фішера [3].

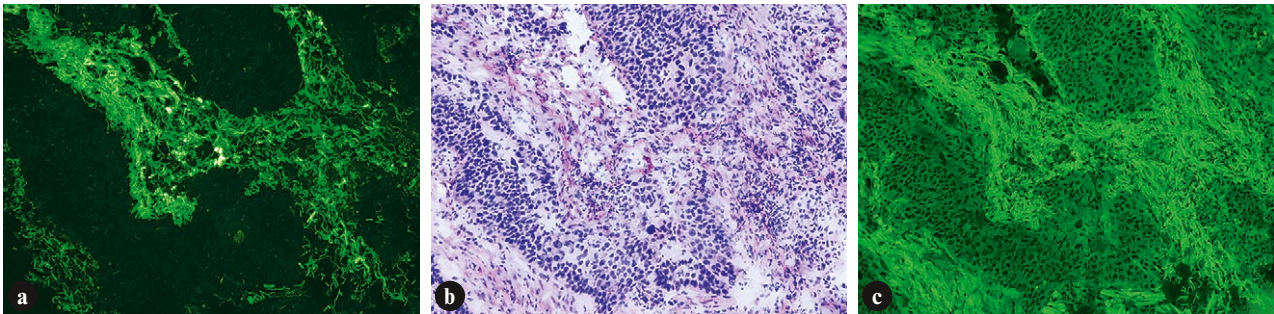
## Результати та обговорення

Аутолюмінесценція (АЛ) здорових тканин голосової складки спостерігалась в зеленій частині оптичного спектра. Цитоплазма епітеліоцитів базального і парабазального шарів випромінювала зелене світло меншої інтенсивності, ніж клітин зовнішнього шару, а також базальної мембрани епітелію. В зоні ядра епітеліальних клітин люмінесценція була відсутньою або була ледь помітною (рис. 1а). Волокнисті структури сполучнотканинної основи слизової оболонки демонстрували досить інтенсивну зелену АЛ (рис. 1б). Яскраву зелену АЛ давали гладенькі м'язові клітини середньої оболонки судин середнього діаметру, що зустрічались у власному шарі слизової оболонки (рис. 1б). При цьому тканини інтими та адвентиції судинної стінки такої АЛ не виявляли.

Співставлення результатів гістопатологічного і люмінесцентного ендоскопічного дослідження показало, що підтверджена гістологічно ракова пухлина голосової складки має при ендоскопії негативну АЛ.



**Рис. 1**  
Аутолюмінесценція нормальних тканин голосової складки, нефіксовані криостатні зрізи,  $\times 400$ .  
А. Багатoshаровий плоский епітелій.  
В. Волокнисті структури власного шару слизової оболонки та судина голосової складки.



**Рис. 2**  
Плоскоклітинний рак голосової складки, криостатний зріз,  $\times 100$ .  
А. Зелена аутолюмінесценція волокнистих структур строми, відсутність її в клітинах ракової паренхіми.  
В. Структура ракової пухлини, гематоксилін і еозин (контроль I).  
С. Викликана еозином вторинна люмінесценція клітин ракової паренхіми (контроль II).

Наявність в біопаті значного об'єму гіперплазованого плоского епітелію дає можливість ендоскопічно виявляти слабку позитивну АЛ ураженої слизової оболонки. При люмінесцентному морфологічному дослідженні тканин раку гортані було встановлено, що сполучнотканинна строма ракової пухлини демонструє той же характер та рівні АЛ, які притаманні стромальним структурам нормальної слизової оболонки голосової складки. Відмінності спостерігаються в характері люмінесценції клітин ракового епітелію, точніше у її майже повній відсутності, при використанні довжині хвилі збуджуючого світла. Мала місце зелена АЛ волокнистих структур строми пухлини і відсутність свічення клітин ракової паренхіми (рис. 2а). Додаткове забарвлення гістологічного препарату гематоксиліном і еозином (контроль I) дозволяло зорієнтуватись у гістологічній структурі досліджуваної тканини (рис. 2б).

Зовсім інший характер має вторинна люмінесценція тканин ракової пухлини, викликана флуорохромним забарвленням еозином (контроль II). Первинна люмінесценція (власна люмінесценція нативної тканини, аутолюмінесценція), при цьому, втрачається після формалінової фіксації тканинного об'єкту. Спостерігається яскраво зелена люмінесценція колагенових волокон строми пухлини, інтенсивно зелена люмінесценція цитоплазми клітин ракового епітелію і повна або майже повна відсутність свічення їх ядер (рис. 2с).

При аналізі результатів морфологічного дослідження тканин хворих у порівнянні з даними люмінесцентної ларингоендоскопії було встановлено певну закономірність (табл. 1). Розподіл даних свідчить про те, що гістологічна картина тканини, взятої при ендоскопічному дослідженні з зони зі слабкою позитивною аутолюмінесценцією, істотно частіше відповідає простій гіперплазії БПЕ, а при відсутності аутолюмінесценції — плоскоклітинному раку ( $p < 0,001$ ). Різниця між інтраепітеліальними ураженнями важкого ступеня і раком не досягає істотної різниці і виявляється на рівні тенденції. Проста гіперплазія БПЕ за рівнем аутолюмінесценції, що виявляється при ендоларингальному люмінесцентному дослідженні, відрізняється не суттєво від передракових станів епітелію.

Проведене тривимірне гістопатологічне дослідження операційного матеріалу хордектомії дозволило спостерігати декілька варіантів інфільтруючого

**Таблиця 1.** Розподіл результатів гістопатологічного дослідження в залежності від рівнів аутолюмінесценції при ендоскопії гортані

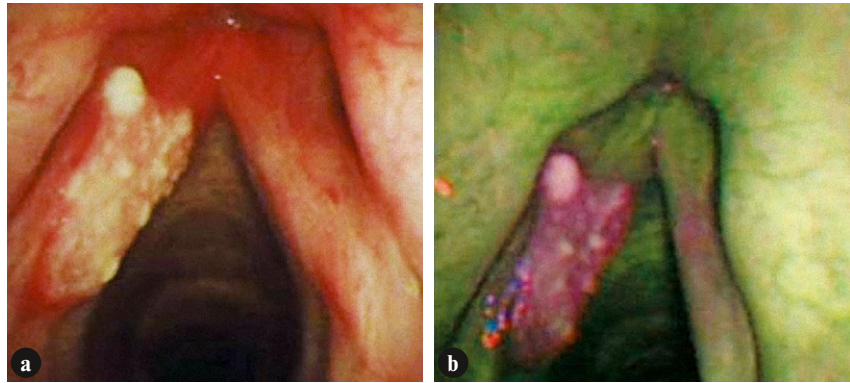
Гістологічний тип ураження	Рівень аутолюмінесценції		Всього
	Позитивна	Негативна	
Проста гіперплазія БПЕ	8 (57,2%)	6 (42,8%)	14 (100%)
Інтраепітеліальні ураження важкого ступеня (Д2, Д3, CIS)	4 (44,5%)	5 (55,5%)	9 (100%)
Плоскоклітинний рак	5 (14,3%)	30 (85,7%)	35 (100%)
Кількість спостережень	17	41	58
Істотність різниці	p1-2>0,05; p1-3<0,001; p2-3=0,067		

**Рис. 3**

Екзофітний рак голосової складки

А. Нативна відеоендоскопія.

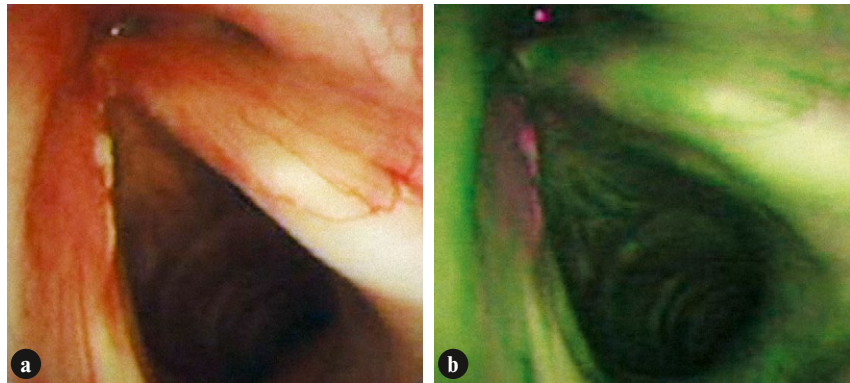
В. Аутолюмінесцентна відеоендоскопія.

**Рис. 4**

Ендофітний рак голосової складки

А. Нативна відеоендоскопія.

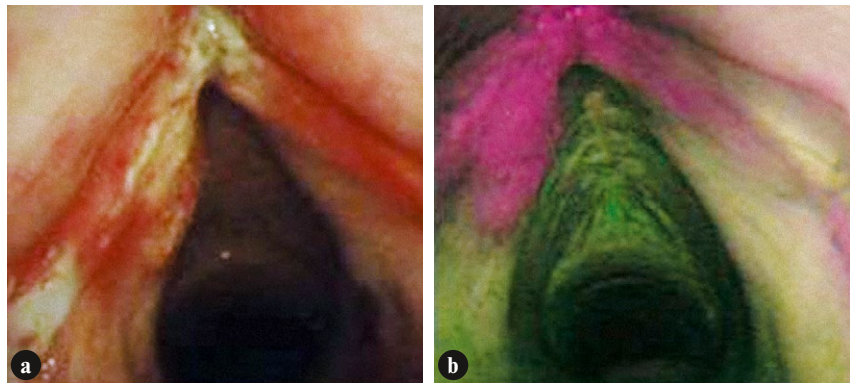
В. Аутолюмінесцентна відеоендоскопія.

**Рис. 5**

Екзоендофітний рак голосової складки, що поширюється у нижній її відділ та передню комісуру

А. Нативна відеоендоскопія.

В. Аутолюмінесцентна відеоендоскопія.



росту ракової пухлини в оточуючі тканини. При екзофітній формі пухлини ростуть в просвіт голосової щілини та поширюються поверхнево в напрямку передньої і задньої комісури. Глибина залягання комплексів ракових клітин досягає рівня слизових залоз, без поширення на більш глибокі ділянки підслизового шару. При фіброендоскопії у таких випадках спостерігається новоутворення голосової складки з дрібногорбистою поверхнею, що виступає над слизовою оболонкою (рис. 3а). Люмінесцентна ендоскопія гортані виявляє негативну АЛ, яка чітко обмежує ділянку раку голосової складки (рис. 3б). Спостерігається локальний ендоскопічний ефект відсутності АЛ тканин ушкодженої ділянки на тлі позитивної АЛ оточуючої слизової оболонки.

При ендофітному ураженні пухлина інфільтрує піддепітеліальну ділянку та поширюється у навколоскладковий простір. Маскування ендофітного раку при ендоскопії у білому світлі пов'язано з одноманітністю змін поверхні слизової оболонки при запальних і пухлинних процесах (рис. 4а). Особливо це спостерігається при передракових станах та на ранніх стадіях розвитку інвазивної пухлини. Інформативність візуалізації раку гортані може бути підвищено завдяки використанню ефекту аутолюмінесценції при ендоскопічному дослідженні. Застосування цього методу дозволяє спостерігати ділянки з негативною АЛ слизової оболонки в зоні ураження голосника (рис. 4б).

При змішаному екзоендофітному ураженні пухлина, поряд з поширенням по поверхні слизової обо-

лонки, яке пов'язане з руйнуванням та заміщенням нею епітеліального покриву, інфільтрує підепітеліальну ділянку та глибші шари тканини аж до внутрішньої поверхні щитоподібного хряща. Ендоскопічна картина, що спостерігається у таких випадках при нативній та аутолюмінесцентній ендоскопії, буде відповідати проявам наявного екзофітного компонента злоякісної пухлини (рис. 5).

Інфільтрація пухлиною глибоких шарів тканин, за нашими даними, може бути простою і випереджаючою [4]. Під випереджаючим інфільтруючим ростом ми розуміємо поширення пухлини в межах параваскулярного і параневрального просторів, яке збільшує її проникнення в тканини, що добре простежується при мікроскопічному дослідженні. Параваскулярний випереджаючий ріст пухлини може бути горизонтальним і вертикальним, в залежності від орієнтації кровоносних судин. Такий тип поширення, мабуть, зустрічається частіше, ніж може здаватися на перший погляд, оскільки результат його маскується масивом пухлинної тканини, а виявлені в ньому судини не завжди є продуктом пухлинного ангиогенезу. Цим механізмом, зокрема, можна пояснити поширення раку гортані на передню поверхню щитоподібного хряща в щитовидну залозу.

## Висновки

1. Морфологічним субстратом аутолюмінесцентного випромінювання тканин гортані, які дають зелену люмінесценцію при опроміненні синім світлом, є елементи структури слизової оболонки (колагенова строма, клітини нормального плоского епітелію, його базальна мембрана).
2. У раковій пухлині сполучнотканинна строма демонструє той же характер і рівні АЛ, які притаманні волокнистим структурам нормальної слизової оболонки голосової складки.
3. Відмінністю в характері люмінесценції клітин ракового епітелію від нормального є її повна або майже повна відсутність, що спричиняє локальний ендоскопічний ефект відсутності АЛ при екзофітних та змішаних формах раку гортані.
4. Гістологічна структура тканин з ділянки зі слабкою позитивною аутолюмінесценцією істотно частіше відповідає простій гіперплазії багат шарового плоского епітелію, а відсутність її при люмінесцентній ендоскопії — плоскоклітинному раку.
5. Використання явища аутолюмінесценції додає інформативності ендоскопічному дослідженню, дозволяє більш чітко, ніж при ендоскопії у білому світлі, візуалізувати рак гортані.

## Література

1. Янов Ю.К., Степанова Ю.А., Юрков А.Ю. и соавт. (2010) Аутофлюоресцентная диагностика заболеваний гортани. Росс. оториноларингология. 4: 95-99
2. Lakowicz J.R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. (Baltimore). Springer. p. 63-95
3. Гублер Е.В., Генкин А.А. (1973) Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. (Ленинград). «Медицина». 142 с.
4. Клочков Е.И., Сережко Ю.А., Лукач Э.В. (2015) Использование трехмерной гистологии в микроскопически контролируемой хирургии гортани. Материали XII з'їзду отоларингологів України (Львів). с. 267