

## Fluorescencinė navikų diagnostika

Ričardas Rotomskis<sup>1,2</sup>, Giedrė Streckytė<sup>1</sup>

Vilniaus universiteto <sup>1</sup>Lazerinių tyrimų centras, <sup>2</sup>Onkologijos institutas

**Raktažodžiai:** fluorescencija, savitoji fluorescencija, endogeniniai fluoroforai, endogeniniai porfirinai.

**Santrauka.** Straipsnyje pateikiama informacija apie audinių savitą fluorescenciją, jos kilmę bei galimybes panaudoti ją navikinėms ligoms diagnozuoti. Aptariamos sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos ypatybės ir jų taikymas audinių atpažinimui. Pateikiami *in vivo* matuoti sveikos odos ir apgamų fluorescencijos spektrai. Atlikta skirtingų eksperimentinio naviko hepatomos A22 sričių lyginamoji savitosios fluorescencijos spektrų skirtumų analizė. Nustatyta, kad skirtingų augimo stadijų navikiniai audiniai turi skirtingus savitosios fluorescencijos spektrus. Apibendrinus gautus eksperimentinius ir literatūros duomenis, daroma išvada, kad audinių savitosios fluorescencijos spektrai suteikia papildomos informacijos, galinčios padėti atpažinti sveiką ir navikinį audinį, tačiau galutinė išvada turi būti daroma atsižvelgiant ir į kitus požymius, nustatomus vizualinės apžiūros metu.

### Įvadas

Navikinių ligų diagnozavimas, ypač naviko pažeistų audinių atskyrimas nuo sveikų yra viena opiausių onkologijos problemų. Jai spręsti ieškoma ir naujų optinių neinvazinių metodų, kuriuos naudojant būtų galima nustatyti audinių būklę arba įvertinti įvairius audinių parametrus. Šie optiniai metodai dažnai vadinami „optine biopsija“, tačiau jie turi privalumą – galima apseiti be audinių mėginio išpjovimo ir gauti informacijos apie audinį atliekant tyrimą *in situ*. Žinoma, histopatologiniai tyrimai nepraras savo svarbos, tačiau tikslią vietą, iš kur imti mėginį, pirmiausia galima nustatyti neinvaziniu optiniu būdu.

Iš optinių metodų labiausiai paplito fluorescenciniai (1–9). Susidomėjimą optinės biopsijos metodais stiprina jų neinvazinis pobūdis, didesnis jautrumas ir skiriamoji geba palyginus su įprastais diagnostikos metodais: branduolio magnetiniu rezonansu, kompiuterine tomografija arba ultrasonografija. Taikant optinius metodus, šviesos signalai registruojami ir apdorojami iškart apžiūros metu, be to, tas pačias sritis galima tirti daug kartų.

Fluorescenciniai diagnostikos metodai pagrįsti audinio sudėtyje esančių molekulių fluorescencijos matavimu. Biologinius audinius sudaro baltymai, nukleorūgštys, lipidai ir fluorescuojantys bei nefluorescuojantys chromoforai. Biologinių fluoroforų fluorescencija paprastai sužadinama ultravioletinio ruožo šviesos, o fluorescuoja jie ultravioletinės ar matomos šviesos spektriniame ruože. Fluorescencinės diagnostikos

metodai skirstomi į nesensibilizuotosios ir sensibilizuotosios fluorescencijos metodus. Nesensibilizuotoji fluorescencinė diagnostika pagrįsta audinių endogeninių fluoroforų optiniu sužadinimu ir jų fluorescencijos stebėjimu. Endogeninių audinio fluoroforų skleidžiama fluorescencija vadinama savitąja fluorescencija. Jau gana seniai pastebėta, kad navikiniai audiniai ne tik savo morfologija, ląstelių forma bei augimo greičiu, bet ir optinėmis savybėmis skiriasi nuo sveikųjų. Ikinavikinių ir navikinių audinių fluorescencija skiriasi nuo sveikų audinių fluorescencijos. Sveikų ir naviko pažeistų audinių fluorescencijos spektrų skirtumų atsiranda dėl ligos sukeltų endogeninių fluoroforų sudėties pokyčių. Audinių fluorescencijos spektrai dažniausiai esti platūs be ryškių juostų, nes biologinius audinius sudaro daug įvairių molekulių, fluorescuojančių skirtingose spektro srityse, todėl vienareikšmiai įvertinti sveikų ir naviko pažeistų audinių sritis pagal jų savitosios fluorescencijos spektrus gana sunku. Nors savitosios fluorescencijos metodai nėra tokie tikslūs ir jautrūs kaip sensibilizuotos fluorescencijos, jie gali būti sėkmingai taikomi ankstyvajai navikų diagnostikai (10–14).

Siekiant geresnio sveikų ir pažeistų audinių fluorescencijos kontrasto, vartojamos egzogeninės fluorescuojančios medžiagos, geriau besikaupiančios navikiniuose audiniuose. Tomis medžiagomis gali būti ir fotosensibilizatoriai, kurie taikomi fotosensibilizuotajai navikų terapijai (FNT). FNT – tai naujas navikų gydymo metodas, pagrįstas fotosensibilizatoriaus

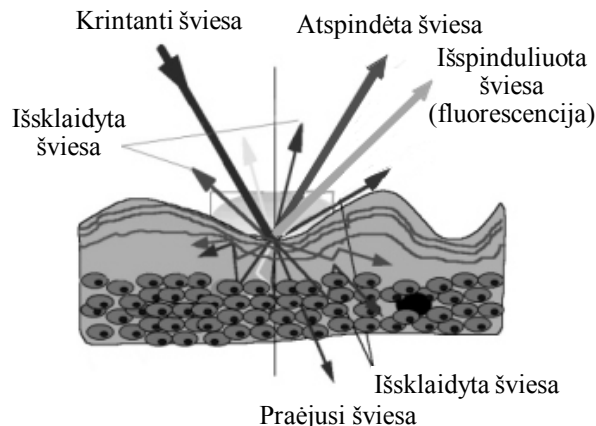
sužadiniu šviesa, t. y. sukelti citotoksines reakcijas. Fluorescencinės diagnostikos atveju naudojamos daug mažesnės sensibilizatorių ir šviesos dozės arba parenkami tokie sensibilizatoriai, kurie fotochemiškai neaktyvūs.

Sensibilizuotosios fluorescencinės diagnostikos metu, panašiai kaip ir FNT, sensibilizatorius vartojamas sistemškai arba išoriškai. Po kelių ar keliolikos valandų (nelygu, kokia sensibilizatoriaus prigimtis) daugiau sensibilizatoriaus susikaupia naviko pažeistuose audiniuose. Sužadinus tinkamo bangos ilgio šviesa (bangos ilgis parenkamas toks, kurį gerai sugeria sensibilizatorius) navike gausiau susikaupusių sensibilizatorių, matoma jo fluorescencija padeda nustatyti naviko lokalizaciją įvairiuose organuose, pavyzdžiui, šlapimo pūslėje (15), virškinimo trakte (16) arba plaučiuose (17).

### Fizikiniai fluorescencijos principai

Optinė biopsija, kurios duomenimis remiantis galima atpažinti audinius ir nustatyti jų pakitimus, pagrįsta šviesos sąveika su audiniais. Šviesa su biologiniu audiniu gali sąveikauti įvairiai (1 pav). Krintanti šviesa gali atsispindėti nuo audinio paviršiaus; prasiskverbti per audinį, nesukeldama jame jokių vyksmų; būti sugerta audinio molekulių ir sukelti fotochemines reakcijas; būti išsklaidyta audinyje, nes jis yra nehomogeniškas; būti sugerta tam tikrų molekulių ir išspinduliuota kaip fluorescencija.

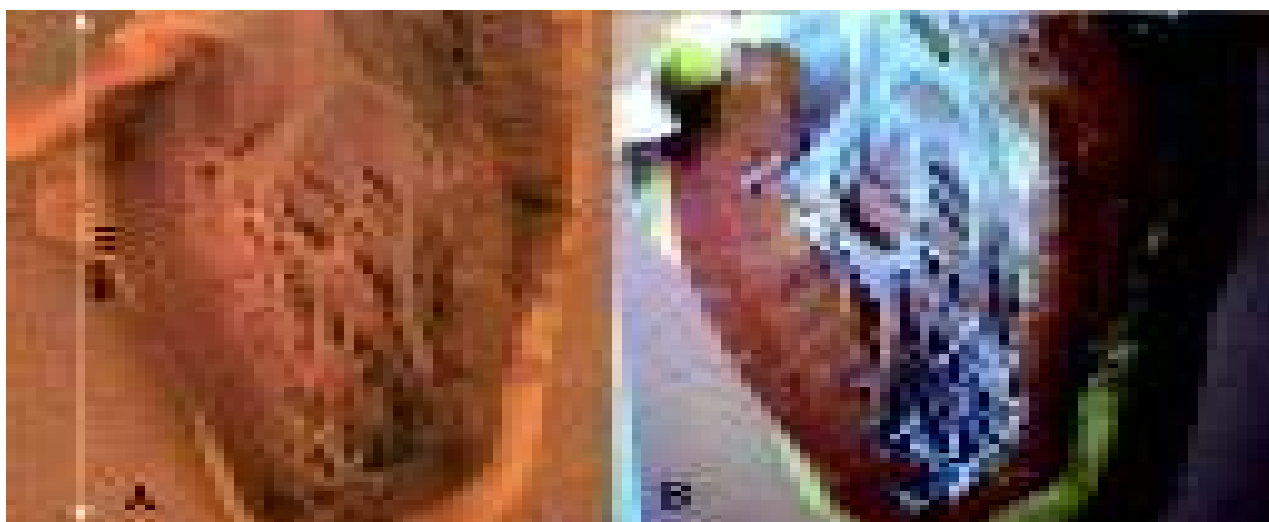
Šios audinyje esančios molekulės vadinamos fluoroforais. Dar vartojamas terminas „pigmentai“, nes



1 pav. Šviesos sąveika su audiniu

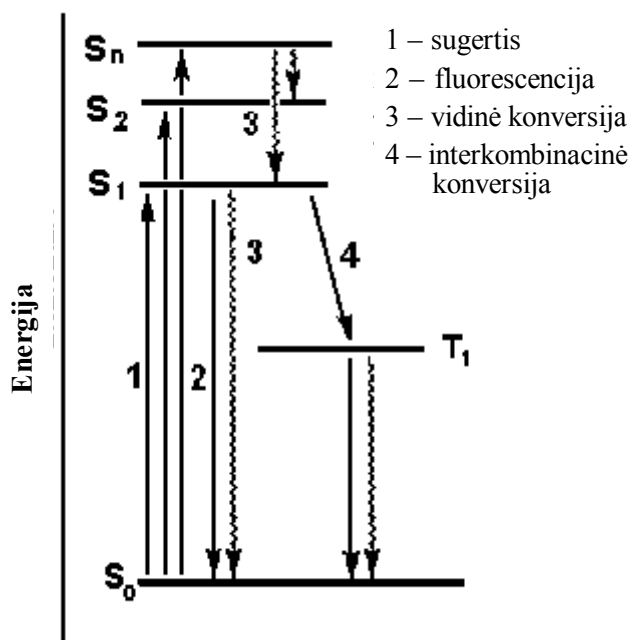
daugelis audinio sudėtyje esančių fluoroforų yra spalvoti. Kaip pavyzdys pateikiamas širdies tarpuskilvelinės pertvaros fluorescencijos vaizdas, išgautas apšvietus ultravioletine šviesa (2 pav.) Paveiksle matyti, kad skirtingi audiniai spinduliuoja skirtingą šviesą, kurios bangos ilgis (spalva) priklauso nuo audinių struktūros ir audinyje esančių fluoroforų. Audiniai, turintys daugiau kolageno, elastino ar aromatinių aminorūgščių (triptofano, tirozino), spinduliuoja mėlyną šviesą.

Visi fotofizikiniai ir fotocheminiai vyksmai prasideda audinio chromoforo (pigmento) molekulei sugėrus šviesos fotoną. Sugerties (absorbcijos) metu fotonas savo energiją gali atiduoti molekulei, kuri tampa elektroniškai sužadinta (3 pav. 1). Kambario temperatūroje beveik visos molekulės yra pagrindinės



2 pav. Širdies tarpuskilvelinė pertvara

Vaizdas dienos šviesoje (A), vaizdas apšvietus mėlyna 366 nm bangos ilgio šviesa (B).



3 pav. Jablonskio daugiaatomės molekulės energijos lygmenų diagrama

Šviesos sugertis iš nesužadintos pagrindinės molekulės būsenos ( $S_0$ ) į elektroniskai sužadintas molekulės būsenas ( $S_{1...n}$ ) (1). Fluorescencija vykstant elektrono šuoliui iš žemiausios neužpildytos būsenos ( $S_1$ ) į pusiausvirinę būseną ( $S_0$ ) (2). Nespindulinė sužadintos molekulės relaksacija į energiškai žemesnę būseną (3). Interkombinacinė konversija iš sužadintos singuletinės būsenos ( $S_1$ ) į tripletinę būseną ( $T_1$ ), iš kurios vyksta fotocheminiai procesai (4).

(nesužadintos) būsenos (3 pav.  $S_0$ ). Tai būseną, kai molekulės energija mažiausia ir elektronai išsidėstę energiškai žemiausiuose molekulės lygmenyse. Sužadinus molekulę, elektronas iš aukščiausio užpildyto lygmens ( $S_0$ ) peršoka į aukštesnį neužpildytą energinį lygmenį ( $S_{(1...n)}$ ), turintį didesnę energiją – taip molekulė sužadinama, tai reiškia, kad ji turi energijos perteklių.

Sužadinti molekulę gali fotonas, kurio energija lygi molekulės elektroninių lygmenų energijų skirtumui:

$$E_{\text{fotono}} = h\nu = E_2 - E_1 = DE,$$

kai:  $h$  yra Planko konstanta,  $\nu$  – fotono dažnis,  $E_1$  ir  $E_2$  nesužadintos ir sužadintos molekulės būsenų energijos (1).

Kiekviena elektroninė energinė būseną atitinka tam tikrą skaičių vibracinių lygmenų, o kiekvienas vibracinis lygmuo – tam tikrą skaičių rotacinių lygmenų. Sugėrusi fotoną, molekulė sužadinama į aukštesnį didesnės energijos lygmenį  $S_{(1...n)}$ . Paveiksle pavaizduotoje Jablonskio daugiaatomės molekulės lygmenų diagramoje (3 pav.) pažymėti galimi elektronų šuoliai

bei sužadintos molekulės energijos praradimo būdai. Sužadintoje molekulėje per labai trumpą laiką ( $10^{-13}$  s) elektronas iš aukštesnių didesnės energijos lygmenų nespinduliniu būdu peršoka į energiškai žemiausio sužadinto elektroninio lygmens nulinių virpesinių lygmenį, atiduodamas aplinkai energiją šilumos pavidalo (virpesinė relaksacija). Nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija. Iš žemiausio sužadinto elektroninio energinio lygmens  $S_1$  galimi trys relaksacijos vyksmai: vidinė konversija  $S_1 \rightarrow S_0$  (3 pav. 3) (energija atiduodama aplinkai šilumos pavidalo), interkombinacinė konversija  $S_1 \rightarrow T_1$  (3 pav. 4) (elektronas peršoka į tripletinę energinę būseną, iš kurios molekulė gali sukelti fotocheminius vyksmus, kurie FNT atveju sukelia vėlesnę ląstelės žūtį) ir fluorescencija  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{fluorescencijos}}$  (3 pav. 2) – molekulės sugrįžimas į pagrindinę  $S_0$  būseną išspinduliuojant fotoną. Kaip tik ši audinių sudarančių molekulių išspinduliuota šviesa ir yra savitoji fluorescencija. Kiekvieno fluoroforo savitoji fluorescencija pasižymi specifinėmis charakteristikomis, kurios priklauso nuo fluoroforo sąveikos su aplinkos molekulėmis, nuo audinio struktūros ir audinyje vykstančių apykaitos procesų. Ligos pažeistų audinių struktūra ir apykaitos procesai dažniausiai būna pakitę, todėl sveikų ir pažeistų audinių savitosios fluorescencijos spektrai skiriasi ir tai sudaro prielaidas audinius aptikti fluorescencinės diagnostikos metodais.

### Endogeniniai fluoroforai

Biologiniai audiniai silpnai fluorescuoja juos apšvietus tam tikro bangos ilgio šviesa. Įprastoje baltos šviesos aplinkoje akimi audinių fluorescencija beveik nematoma. Tačiau, žadinant reikiamo bangos ilgio šviesa ir matuojant spektrus jautriais spektriniais prietaisais, galima užfiksuoti specifinį įvairių audinių švytėjimą. Audinius sudaro sudėtingas įvairiausių molekulių mišinys, tačiau už audinių fluorescenciją atsakingi keli fluoroforai (lentelė) (18), kurių fluorescencijos spektrų juostos yra plačios ir persiklojančios, todėl tikslus šių fluoroforų atpažinimas yra sunkus. Tam dažnai padeda tinkamai parinktas fluorescencijos žadinimo bangos ilgis (19, 20).

Pagrindiniai biologinių audinių endogeniniai fluoroforai – kolagenas ir elastinas (21) lokalizavęsi skaiduliniam jungiamajame audinyje. Kolageno fluorescencijos smailė *in vivo* yra ties 330 nm, elastino – ties 350 nm (22). Fluorescencijos smailės padėtis gali kisti priklausomai nuo audinio tipo. Jungiamajame audinyje kolageno fluorescencijos smailė yra ties 390 nm, elastino – ties 410 nm (18). Jungiamasis audinys, kuriame daug kolageno ir elastino, pasižymi labai inten-

**Lentelė. Endogeniniai fluoroforai**

Fluoroforas	Žadinimo bangos ilgis, nm	Apytikslis fluorescencijos bangos ilgis, nm	Fluoroforo šaltinis
Triptofanas	275	350	baltymai
Kolagenas	335	390	jungiamasis audinys
Elastinas	360	410	jungiamasis audinys
NADH	340	470	kvėpavimo grandinė
Flavinas	450	520	kvėpavimo grandinė
Porfirinas	405	635	bakterinės infekcijos, hemo biosintezė

syvia savitą fluorescenciją. Jungiamojo audinio fluorescencijos spektrai yra daug platesni negu grynujų kolageno ir elastino spektrai.

Kiti endogeniniai fluoroforai, ypač svarbūs navikų fluorescencinei diagnostikai, yra su ląstelės medžiagų apykaita susiję junginiai – tai redukuotas nikotinamidadeninukleotidas (NADH) (23) ir flavinai (24), aptinkami mitochondrijose ir citoplazmoje. NADH fluorescencijos smailė *in vivo* yra ties 500 nm, flavinų – ties 550 nm. Kadangi navikiniuose audiniuose vyksta intensyvesnė medžiagų apykaita, NADH fluorescencija tokiuose audiniuose gali būti kitokia negu sveikuose (25). Be to, sveikų ir navikinių audinių pH skirtingas, dėl to gali kisti redukuotos (NADH) ir oksiduotos (NAD<sup>+</sup>) formų santykis. Kadangi oksiduota forma fluorescuoja gerokai silpniau, mėlyna navikinių ir ikinavikinių audinių savitoji fluorescencija yra silpnesnė (23, 26).

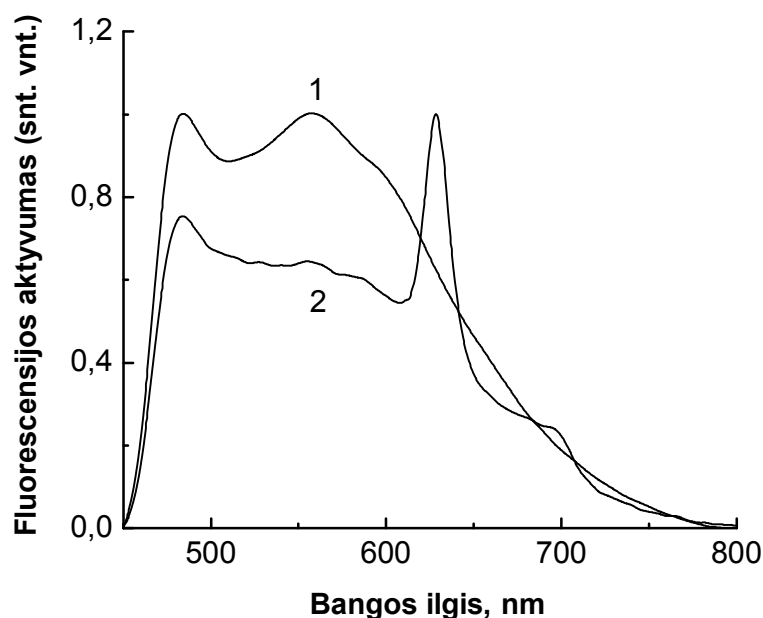
Kiti endogeniniai fluoroforai – tai trumpabangėje spektro srityje fluorescuojančios aromatinės aminorūgštys (triptofanas, tirozinas, fenilalaninas). Paprastai audiniuose fluorescuoja tik triptofanas, nes baltyminėje globulėje kitų aminorūgščių sugerta šviesos energija yra perduodama triptofanui. Be minėtų biomolekulių audinių fluoroforais gali būti lipopigmentai bei endogeniniai porfirinai (27). Endogeninių porfirinų fluorescencijos spektrų fiksavimas tapo ypač svarbus atradus endogeniniais porfiriniais sensibilizuotą navikų terapiją (28).

#### Sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos ypatybės

Savitą audinių fluorescenciją pagrįsta diagnostika remiasi tuo, kad navikinių darinių fluorescencija skiriasi nuo sveiko audinio (1,10,29). Daugumos fluoroforų fluorescencijos charakteristikos yra susijusios su tarpląstelinės medžiagos sandara ir medžiagų apykaita ląstelėje, todėl ir morfologiniai, ir citologiniai sveikų ir navikinių ląstelių pokyčiai, jų išsigimimas

gali būti nustatyti registruojant audinių fluorescencijos spektrus. Navikinių darinių diagnozavimas ir tikslus naviko ribų nustatymas susijęs su fluoroforų (triptofano, porfirino) koncentracijų pokyčiais, struktūriniais (kolagenas, elastinas) pakitimais, kvėpavimo grandinės aktyvumu (NADH, flavinai) arba šių pokyčių deriniais (30). Intensyvesnė triptofano fluorescencija pakitusios histologijos audiniuose pastebėta tiek *in vitro* eksperimentuose (31), tiek *in vivo* diagnozuojant šlapimo pūslės vėžį (20). Jungiamojo audinio fluorescenciją slopina jį dengiantis gleivinės sluoksnis. Epitelinės kilmės navikams (net ir ankstyvų stadijų) būdingas gleivinės sluoksnio sustorėjimas, dėl kurio susilpnėja jungiamojo audinio fluorescencija (32). Kadangi fluorescuoja tik redukuota NADH forma, oksiduotos-redukuotos formų koncentracijų pokyčius, susijusius su ląstelių kvėpavimo grandinės veikla, galima pastebėti registruojant NADH fluorescencijos intensyvumą (33).

Pirmasis savaiminę raudoną eksperimentinių navikų fluorescenciją pastebėjo ir teisingai priskyrė ją navike susikaupusiam porfirinui prancūzas A. Polikardas (34). Manyta, kad raudonai fluorescuoja išopėję navikai (35), todėl fluorescencija buvo priskirta endogeniniams porfirinams (36). Nekrozinėse navikų zonose aptinkami endogeniniai porfirinai priskiriami bakterijų veiklai (37, 38). Šio tyrimo duomenimis, navikinio audinio nekrozinėse srityse nėra endogeninio porfirino (39). Tačiau greitai proliferuojančiose navikinio audinio ląstelėse kaupiasi endogeniniai porfirinai, kurie pasižymi fluorescencija raudonoje spektro srityje. Navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektruose (4 pav.) gerai matoma endogeninių porfirinų juosta 600–700 nm srityje. Nekroziniuose navikų audiniuose esantys mikroorganizmai iš 5-aminolevulino rūgšties gali sintetinti raudonai fluorescuojančius porfirinus (40). Manoma, kad navikiniuose audiniuose dėl pakitusio metabolizmo (41) ir navikų hipervaskulizacijos (42) kaupiasi daugiau porfirinų (43, 44).



4 pav. Sveiko ir navikinio (hepatoma 22) audinio savitosios fluorescencijos spektrai *ex vivo*

1 – sveiko raumens audinio fluorescencija; 2 – navikinio audinio savitosios fluorescencijos spektras.

#### Savitosios fluorescencijos pritaikymas navikų diagnostikai

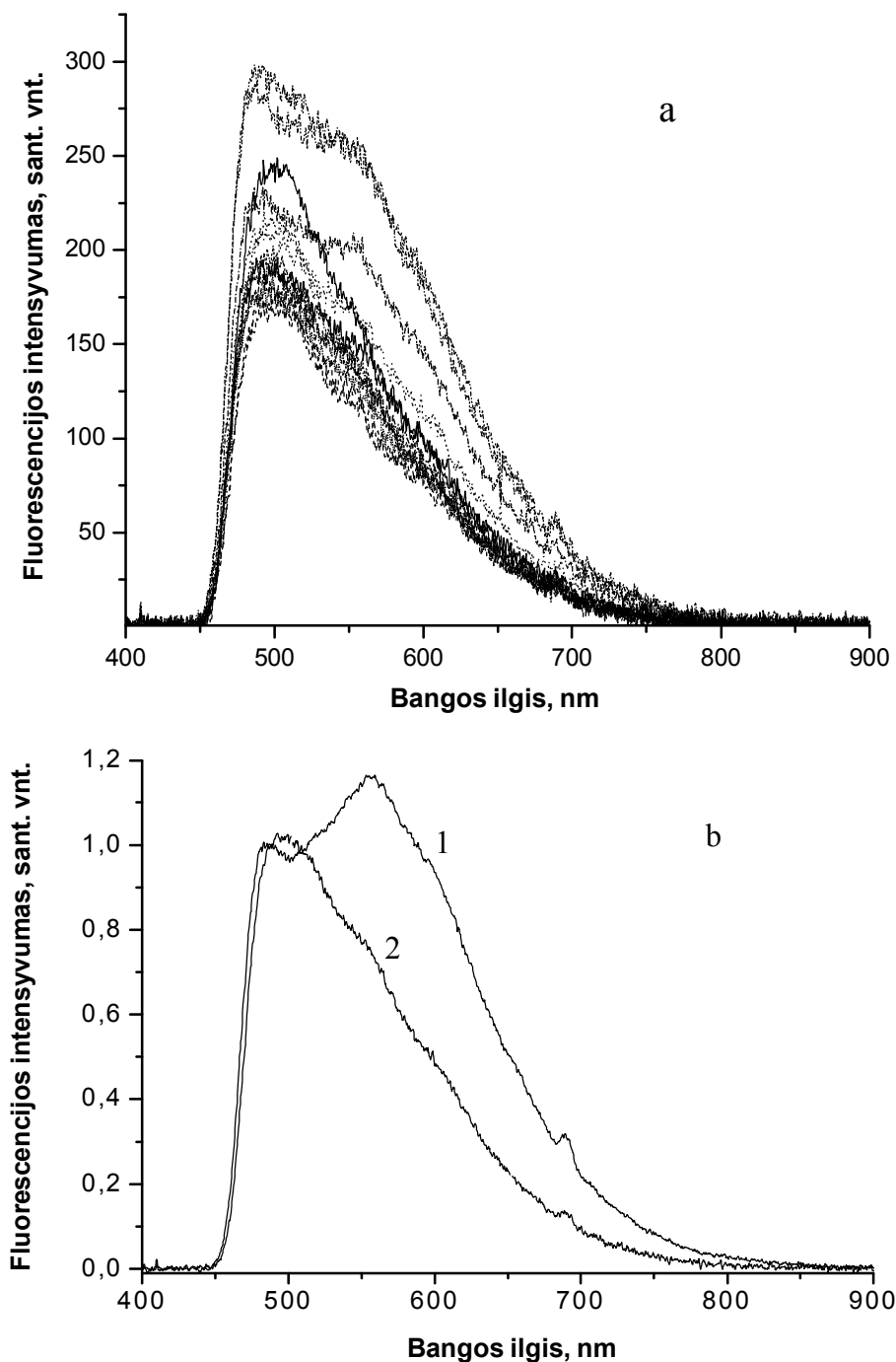
Pirmasis darbas, kur buvo pastebėti sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrų formos skirtumai, paskelbtas 1984 metais (1). Buvo matuota žiurkių inkstų, šlapimo pūslės ir prostatos sveikų ir navikinių audinių bei pelių šlapimo pūslės sveikų ir navikinių audinių savitoji fluorescencija žadinant 488 nm šviesa. Sveikų ir navikinių audinių spektriniai skirtumai priskirti skirtingai flavinų ir porfirinų fluorescencijai sveikų ir pakitusių ląstelių terpėse. Pirmieji moksliniai tyrinėjimai teikė vilčių galimam navikų diagnozavimui ir paskatino atlikti tolesnius navikinių audinių savitosios fluorescencijos tyrimus *in vitro* ir *in vivo*.

Tiriant įvairių organų: plaučių, skrandžio, žarnyno, gerklės, šlapimo pūslės, smegenų navikų pažeistus audinius, pastebimas žymus fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas mėlynai žalioje spektro srityje (12, 23, 45). Sumažėjęs fluorescencijos intensyvumas, žadinant azoto lazerio 337 nm bangos ilgio impulsu, siejamas su kofermento NAD<sup>+</sup>/NADH oksiduotos ir redukuotos formų kiekių pokyčiais. Oksiduota forma fluorescuoja silpniau negu redukuota.

Išmatuoti sveikų ir navikinių liežuvių (46), gaubiamosios žarnos (47), kiaušidžių (12) ir plaučių (13) audinių savitosios fluorescencijos spektrai patvirtino, kad navikinių audinių fluorescencijos intensyvumas mažesnis už sveikų.

Naudojant fluorescencinius metodus, galima įver-

tinti odos vėžio išplitimą. Odoje yra keletas fluoroforų, tačiau dažniausiai fiksuojama kofermento NADH fluorescencija. Pirmasis bandymas – fluorescenciniu metodu aptikti melanomas atliktas 1988 metais (48). Autoriai nustatė, kad, žadinant 365 nm šviesa ir matuojant fluorescenciją ties 470 nm, galima atskirti melanomą nuo ikivėžinių odos pakitimų. Pastebėta, kad melanomos srityje fluorescencijos intensyvumas buvo labai mažas, o pereinant į sritį tarp melanomos ir sveikos odos fluorescencijos intensyvumas didėjo. Savo hipotezę autoriai patikrino atlikę studiją, kur atrinkta daug pacientų (49). Kitos mokslininkų grupės atlikti tyrimai nepatvirtino duomenų apie savitosios fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą esant žmogaus odos melanomai (50). Šių tyrimų metu atliktas 408 pacientų odos savitosios fluorescencijos vaizdinimas (įtarus melanomą) žadinimui naudojant 366 nm šviesą ir registruojant signalą ties 475 nm. Melanoma odoje formuojasi stipriai pigmentuotų audinių vietoje, dažniausiai apgamuose, kuriuose yra dideli kiekiai pigmento melanino. Pigmentuota oda – apgamai pasižymi skirtingu savitosios fluorescencijos spektru (5 pav. B), kurio forma kinta priklausomai nuo apgamo atspalvių. Dėl to iš savitosios odos fluorescencijos spektrų sunku tiksliai atpažinti melanomines odos ligas. Tiksliam melanominių susirgimų identifikavimui fluorescenciniai duomenys buvo lyginami su histologinių tyrimų rezultatais. Buvo sukurtas melanomos nustatymo algoritmas, pagrįstas santykiu tarp maksimalios savitosios fluorescencijos melanomos išorėje



**5 pav.** Skirtingų žmonių rankos įvairių vietų odos savitosios fluorescencijos *in vivo* spektrai (A). Normalios ir pigmentuotos odos savitosios fluorescencijos *in vivo* suvidurkinti spektrai (B): (1) apgamų spektrų vidurkis, (2) nepigmentuotos odos spektrų vidurkis (visi spektrai normuoti į vienetinį intensyvumą, ties 488 nm)

Fluorescencijos žadinimui naudotas diodinis mėlynos šviesos šaltinis, spinduliuojantis 406 nm bangos ilgio šviesą. Visi spektrai matuoti vienodomis sąlygomis.

(iki 40 mm nuo melanomos krašto) bei minimalios fluorescencijos melanomos viduje apskaičiavimu. Naudojant šį algoritmą, melanomos atskyrimo nuo nemelanominių odos darinių selektyvumas buvo 82 proc., o specifiskumas – 78 proc.

Diagnozuojant lytinių organų navikus, tinkamiausias fluorescencijos žadinimo ruožas yra 300–340 nm (12). Raudona navikinių audinių savitoji fluorescencija, sužadinama UV diapazono šviesos, panaudota diagnozuojant gerklės, skrandžio ir lytinių organų

navikus (43).

Nustatyta, kad endoskopiniai fluorescenciniai matavimai padeda geriau atskirti navikinius darinius nuo Bareto metaplazijos (51). Žadinant 330 nm šviesa, Bareto metaplazijos pažeista stemplės gleivinė fluorescuoja silpniau negu sveika, tačiau jos spektro forma išlieka nepakitusi. Savitosios fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas bei spektro formos pakitimai pastebėti esant vėlyvos stadijos displazijai bei gleivinės karcinomai. Tolesnei duomenų analizei naudoti savitosios fluorescencijos intensyvumų santykiai ties 390 ir 450 nm (kolageno ir NADH), 550 ir 450 (flavinų ir NADH) bei 390 ir 550 (kolageno ir flavinų). Taikant pastarąjį santykį, neoplazijos nuo Bareto metaplazijos nustatymo selektyvumas buvo 86 proc., specifiskumas – 95 proc.

Naudojant įprastą baltos šviesos bronchoskopiją, pavyksta diagnozuoti tik 50 proc. kvėpavimo takų navikų, todėl būtini alternatyvūs bronchų ir plaučių navikų diagnostikos metodai. Bronchų bei bronchų navikų (vėlyvos stadijos displazijos, karcinomos *in situ*, invazinio naviko) savitoji fluorescencija *in vivo* tirta žadinimui naudojant 405, 442 bei 488 nm šviesą (13). Spektrams būdingos dvi smailės ties 520 ir 595 nm, o fluorescencijos intensyvumas palaipsniui mažėja, kai displazija virsta karcinoma *in situ* bei pereina į invazinio naviko stadiją.

Kelios mokslininkų grupės paskelbė daug vilčių teikiančius rezultatus, kai savitoji fluorescencija naudota viršutinių kvėpavimo takų navikams diagnozuoti. Visais atvejais pastebėtas dėsningumas: ties 500 nm normalios gleivinės fluorescencijos intensyvumas yra didžiausias, tačiau jis pradeda mažėti sveikam audiniui peraugant į navikinį (52, 53).

Panašūs savitosios fluorescencijos intensyvumo pakitimai pastebėti esant bronchų navikams (54). Burnos gleivinės navikų savitosios fluorescencijos spektre, žadinant 410 nm šviesa, matomos juostos ties 635 ir 700 nm (52, 55). Panašius duomenis pateikia ir kiti autoriai (56), tyrę viršutinių kvėpavimo takų displazijos savitąją fluorescenciją. Santykinai padidėjusi savitoji fluorescencija raudonoje spektrinėje srityje buvo priskirta endogeniniams porfirinams.

Taikant savitosios fluorescencijos diagnostiką šlapimo pūslės vėžiui aptikti taip pat pastebėta, kad naviko (karcinoma *in situ*) ir sveikos šlapimo pūslės sienos spektro forma skirtinga (20). Žadinant šlapimo pūslės audinių savitąją fluorescenciją 337 nm šviesa ir matuojant fluorescencijos intensyvumų santykį ties 385 nm ir 455 nm, navikinių ir sveikų audinių atpažinimo selektyvumas ir specifiskumas buvo 95 proc. (19).

### Odos savitosios fluorescencijos spektrai

Optinės odos savybės atspindi odos struktūrą bei cheminę sudėtį. Šviesai sąveikaujant su oda, fotonai sugeriami arba išsklaidomi. Dalis šviesos atspindima nuo odos paviršiaus, o į odą patekusios šviesos dalis sugeriama, kita gi, daug kartų atspindėta, išeina per odos paviršių (1 pav.). Kuo stipresnė odos sugertis, tuo mažiau šviesos bus atspindėta arba išsklaidyta. Odoje yra fluoroforų, kurie fluorescuoja sužadinus juos UV arba trumposiomis regimosios spektro srities bangomis. Net mažiausi odos pakitimai atsispindi fluorescencijos spektruose. Taigi fluorescencijos spektrų matavimai įgalina pastebėti netgi ir nežymius odos pažeidimus ir iš jų diagnozuoti navikines ligas.

Sveikos odos savitosios fluorescencijos matavimai 450–800 nm spektriniame ruože, atlikti *in vivo* šviesolaidiniu spektrofluorimetru S2000-F1 (Ocean Optics) žadinimui naudojant 10 mW galios mėlynos šviesos diodą, spinduliuojantį ties 407 nm, parodė, kad odos fluorescencijos spektrų intensyvumas ir forma priklauso nuo žmogaus odos tipo ir jautriai reaguoja į bet kokius odos pažeidimus arba pakitimus.

Tiriant sveikos odos savitąją fluorescenciją, nustatyta, kad atskirų žmonių odos spektrai skiriasi. To paties žmogaus skirtingų kūno vietų odos fluorescencijos spektrai taip pat turi nedidelių skirtumų. Įvairių rankos vietų nenormuoti odos fluorescencijos spektrai pateikti 5 pav. A. Sunormavus spektrus, išryškėja spektrų formų skirtumai. Didžiausi skirtumai matomi tarp skirtingų žmonių odos fluorescencijos spektrų, o to paties žmogaus skirtingų vietų odos fluorescencijos spektrai gana panašūs. Apgamo savitosios fluorescencijos spektrai matuoti keliose vietose iš esmės savo forma nesiskiria. Ties 488 nm sunormuoti apgamo fluorescencijos spektrai pateikiami drauge su bendru dviejų žmonių odos fluorescencijos spektro vidurkiu (5 pav. B). Skirtumai tarp šių spektrų yra gerokai didesni nei tarp atskirų asmenų sveikos odos savitosios fluorescencijos spektrų, todėl galima teigti, jog apgamas turi specifinę savitąją fluorescenciją, kuri apsunkina tikslią melanominių odos susirgimų diagnostiką.

Apibendrinant gautus rezultatus, galima pažymėti, kad atskirų žmonių odos savitosios fluorescencijos spektrai yra skirtingi, todėl, taikant optinę biopsiją navikiniams odos pažeidimams aptikti, reikėtų remtis ne apibendrintu žmonių odos fluorescencijos spektru, o atlikti lyginamuosius matavimus registruojant to paties žmogaus sveikos odos ir įtartinų odos vietų fluorescencijos spektrus. Tokiu atveju specifiniai fluorescencijos spektrų pokyčiai įtartinose vietose gali būti naudojami tam tikrų odos ligų arba vėžinių odos pakitimų diagnozavimui bei jų diferenciacijai.

### **Ekspimentinio naviko hepatomas A22 savitosios fluorescencijos matavimai *ex vivo***

Dėl pakitusių apykaitos procesų navikiniuose audiniuose jų savitosios fluorescencijos spektrai turi specifinių skirtumų palyginus su sveikų audinių spektrais. Vieni esminių skirtumų, sąlygojančių sėkmingą navikinių darinių diagnostiką fluorescencinės spektroskopijos metodu, yra daug mažesnis navikinių audinių savitosios fluorescencijos intensyvumas žaliojoje spektro srityje (490–580 nm) ir intensyvesnė endogeninių porfirino tipo pigmentų fluorescencija 600–700 nm srityje (4 pav. 2 kreivė). Sveikų audinių spektrams būdinga juosta su smaile ties 560 nm ir jų savitoji fluorescencija yra žymiai intensyvesnė negu navikinių audinių (4 pav. 1 kreivė). Mūsų matavimai patvirtino kitų autorių (57, 58) duomenis apie tai, kad navikinių audinių savitoji fluorescencija 490–600 nm ruože yra silpnesnė negu sveikų, taip pat išryškino atskirų naviko sričių fluorescencijos specifiškumą.

Navikinių darinių savitosios fluorescencijos tyrimams naudotos C<sub>57</sub>B1 linijos pelės (patelės, 21–25 g svorio, 8–10 savaičių), kurioms buvo iškiepyta hepatoma A22. Matavimai pradėti praėjus septynioms dienoms po iškiepavimo esant naviko dydžiui 0,07 cm<sup>3</sup>; kiti matavimai atlikti praėjus 9, 12, 14, 16 ir 19 dienų po iškiepavimo (kol naviko dydis pasiekė 1 cm<sup>3</sup>). Kontroliniams matavimams paimti tų pačių pelių sveikų audinių (raumens) bandiniai.

Fluorescencijos matavimams maždaug 3 mm storio mėginiai buvo patalpinti tarp dviejų stiklo plokštelių. Naviko zonos – nekrozinė, nepažeista nekrozės ir hemoraginė nustatytos mikroskopiškai.

Mėginių savitoji fluorescencija buvo matuota 450–800 nm spektriniame ruože šviesolaidiniu spektrofliuorimetru S2000-F1 (Ocean Optics). Fluorescencijos žadinimui naudotas mėlynos šviesos šaltinis LED ( $\lambda_{\text{zad}} = 405 \text{ nm}$ ).

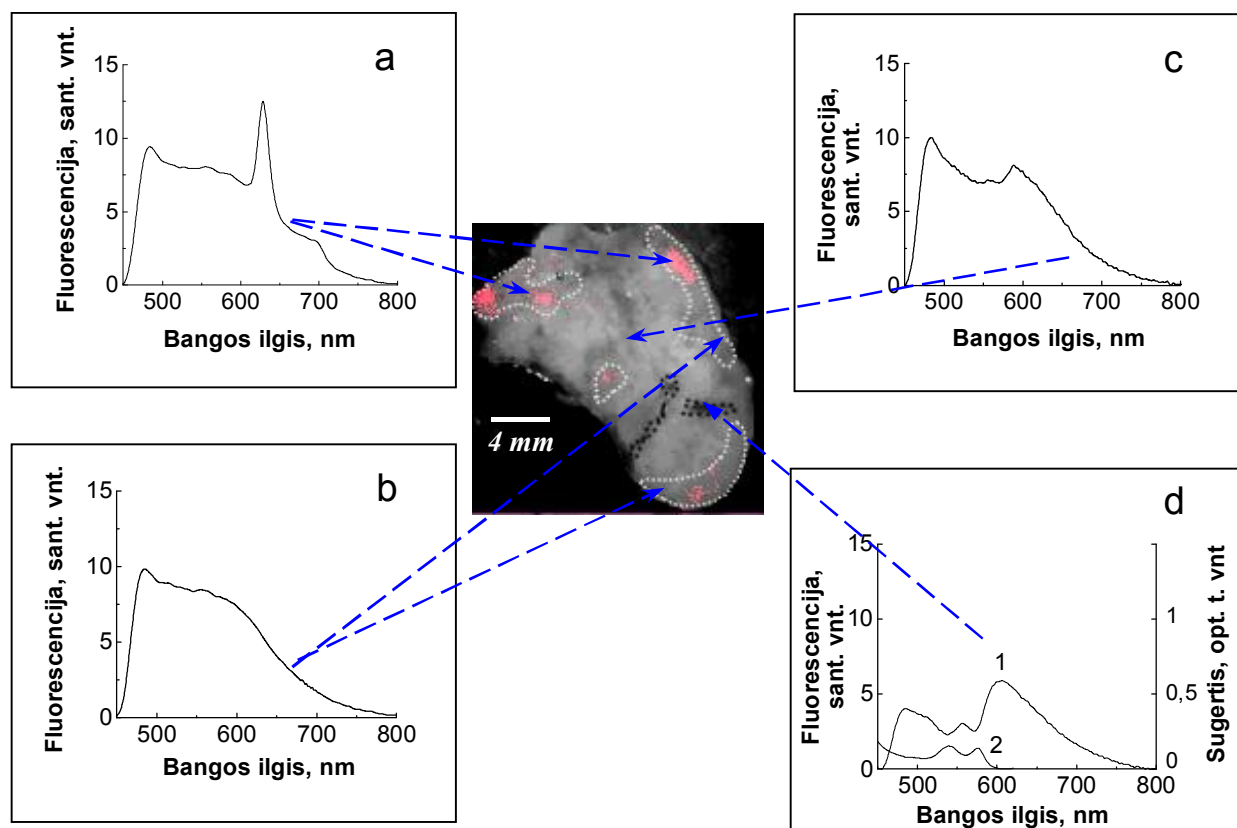
Morfologinė navikinių darinių analizė parodė, kad didelio tūrio navikams būdingos nekrozinės ir nekrozės nepažeistos sritys (6 pav.). Taip pat nustatyta, kad savitosios fluorescencijos spektrai gali būti iškreipti kraujo ekranavimo efekto, atsirandančio dėl kraujavimo pjūvio vietoje (6 pav.). Šis ekranavimo efektas gali paslėpti specifinius sveiko ir navikinio audinio savitosios fluorescencijos skirtumus, užtikrinančius tikslų navikinių audinių atpažinimą. Tiek sveikų, tiek ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrai pasižymi heterogeniškumu. Todėl buvo išmatuoti 90 nekrozės nepažeistų sričių, 60 nekrozinų naviko sričių, 33 hemoraginių naviko sričių ir 25 sveikų audinių mėginių savitosios fluorescencijos spektrai, kuriuos išanalizavę galėjome pateikti api-

bendrinančias išvadas, rodančias įvairių morfologiškai atpažintų atskirų navikinio audinio sričių savitosios fluorescencijos spektrų specifiškumą (39).

Lyginamoji savitosios fluorescencijos spektrų formos skirtumų analizė atlikta sunormavus spektrų vidurkius (7 pav.). Skirtingų navikų savitosios fluorescencijos spektrų vidurkiuose išryškėja du nekrozės nepažeistų navikinių audinių spektrų tipai (7 pav. 1 ir 2 kreivės). Esminiai skirtumai matomi 610–700 nm ruože. Spektrai, turintys siaurą juostą ties 633 nm ir plačią juostą ties 700 nm (7 pav. 2 kreivė), būdingi ribotoms nekrozės nepažeistoms sritims didelio tūrio navikuose (praėjus 14 ir daugiau dienų po iškiepavimo). Kitas spektrų tipas (7 pav. 1 kreivė) neturi šių juostų ir forma yra panašus į nekrozinų naviko audinių (3 kreivė) ir sveikų audinių (4 kreivė) spektrus 610–710 nm ruože. Pirmojo tipo spektrams būdingos fluorescencijos juostos ties 633 ir 700 nm priskiriamos endogeniniam protoporfirinui IX (28). Taigi didelio tūrio navikams būdingas netolygus endogeninių porfirinų pasiskirstymas atskirose nekrozės nepažeistose srityse. Antrojo tipo savitosios fluorescencijos spektrai (neturintys endogeniniams porfirinams būdingų juostų) būdingi mažo tūrio navikams ir kai kurioms didelio tūrio navikų nekrozės nepažeistoms sritims. Remiantis šiais duomenimis, darytina išvada, kad endogeninių porfirinų kaupimasis navikiniame (hepatoma A22) audinyje priklauso nuo naviko augimo stadijos: kol navikas mažas, jame endogeninių porfirinų neaptinkama; dideliuose navikuose endogeniniai porfirinai aptinkami tik atskirose nekrozės nepažeistose naviko srityse. Šie eksperimentinių tyrimų duomenys rodo, kad, norint atskirti sveiką ir navikinį audinį, nepakanka išanalizuoti savitosios fluorescencijos pokyčius vien raudonoje spektro srityje (600–700 nm), būtina atlikti platesnio spektrinio ruožo (495–750 nm) savitosios fluorescencijos spektrų analizę.

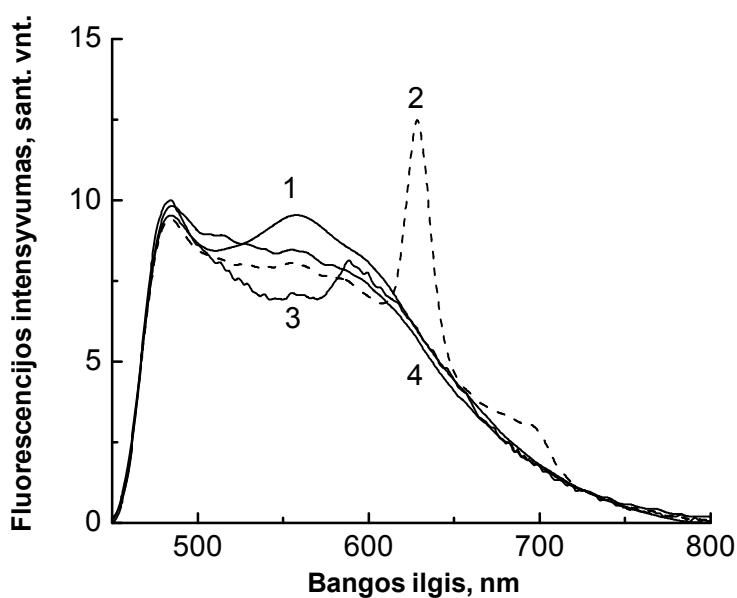
Nekrozinų navikinių audinių sričių savitosios fluorescencijos spektrų forma (7 pav.) gerokai skiriasi nuo nekrozės nepažeistų naviko sričių ir sveikų audinių spektrų 490–600 nm srityje. Nekrozinų sričių spektrams būdingas mažesnis fluorescencijos intensyvumas ir įdubos ties 536 ir 577 nm. Tokios pat įdubos būdingos ir navikinių audinių hemoraginėms sritims (7 pav.). Kraujo sugerties juostų smailių padėtis sutampa su navikinių audinių hemoraginėms sritims būdingomis įdubomis ties 536 ir 577 nm. Taigi šios įdubos gali būti kraujo hemoglobino reabsorbcijos pasekmė. Pirma, toks spektrų formos pokytis hemoraginėse navikų srityse apsunkina tikslų navikinių ir sveikų audinių ribų atskyrimą, antra, tokie savitosios





6 pav. Išoperuoto naviko pjūvio vaizdas

Pažymėtos skirtingos morfologijos navikinio audinio sritys ir tarpuose pavaizduoti atitinkamų sričių savitosios fluorescencijos ir kraujo sugerties spektrai: a – nekrozės nepažeistos navikinio audinio sritys, pasižyminčios intensyvia endogeninių porfirinų fluorescencija 600-700 nm ruože; b – nekrozės nepažeistos navikinio audinio sritys, neturinčios endogeninių porfirinų; c – nekrozinės navikinio audinio sritys; d – kraujosruvų audinyje sritys (1 – audinio fluorescencijos spektras; 2 – kraujo sugerties spektras).



7 pav. Normuoti sveiko ir navikinio (hepatoma 22) audinių savitosios fluorescencijos spektrai ir jų vidurkiai išmatuoti *ex vivo*

1 – sveiko audinio (odos virš raumens); 2, 4 – nekrozės nepažeisto navikinio audinio; 3 – nekrozinio navikinio audinio.

fluorescencijos spektrų pokyčiai gali padėti spektroskopiškai atpažinti kraujosruvas audiniuose arba kraujo indų pažeidimus.

Apibendrinant galima teigti, kad santykinai mažesnis fluorescencijos intensyvumas 495–600 nm spektriniame ruože ir endogeninių porfirinų fluorescencijos juostų 600–700 nm spektriniame ruože formavimasis navikinių audinių spektruose galėtų būti panaudotas navikiniams audiniams aptikti. Tačiau tikslus navikinių audinių atpažinimas galimas tik remiantis vizualia apžiūra, t. y. nustačius, ar apžiūrime vietoje nėra kraujosruvų ar nekrotizavusio audinio. Taigi savitosios fluorescencijos spektrų analizė suteikia daug papildomos informacijos, galinčios padėti atpažinti sveiką ir navikinį audinį, tačiau galutinė išvada turi būti daroma atsižvelgus ir į kitus faktorius, nustatamus vizualios apžiūros metu.

Žadinant audinio fluoroforus UV ar mėlyna šviesa ir naudojant jautrius fluorescencijos spektrų matuoklius, galima vizualizuoti naviko pažeistas audinio sritis arba aptikti ankstyvos stadijos naviką, kai morfologiniai audinio pakitimai akimi dar sunkiai pastebimi. Eksperimentiniai savitosios fluorescencijos matavimų duomenys sudarė prielaidas optinės biopsijos prietaisui sukurti. Toks prietaisas (8 pav.) (59) gali padėti tiksliau nustatyti pažeisto ir sveiko audinio ribas vizualios apžiūros metu, apšviečiant įtartinas vietas mėlyno šaltinio skleidžiama šviesa. Tai dar nėra galutinė optinės biopsijos metodo, pagrįsto audinių savitosios

fluorescencijos matavimu, realizacija, tačiau sukurtasis prietaisas yra kompaktiškas ir paprastas naudoti, todėl gali būti naudojamas kaip papildoma diagnostinė priemonė.

**Padėka.** Autoriai dėkoja Vilniaus universiteto Onkologijos instituto darbuotojoms prof. L. Griciūtei ir dr. J. Didžiapetrienei už svarbias pastabas ir patarimus audinių morfologijos ir histologijos klausimais; J. Labanauskienei ir A. Sukackaitei – už pagalbą dirbant su eksperimentiniais gyvūnais. Taip pat dėkojame Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto Biofotonikos grupės studentams ir doktorantams J. Makaryčevai, M. Tamošiūnui, J. Veniui ir V. Legeniui, kurie per kelerius metus padėjo surinkti didelę audinių savitosios fluorescencijos duomenų bazę, kuria remdamiesi autoriai galėjo išanalizuoti šimtus fluorescencijos spektrų ir pasiūlyti navikinių ir sveikų audinių atpažinimo galimybes naudojant optinės biopsijos metodą. Reiškiame padėką Odos ir lazerinės chirurgijos centro vadovui dr. K. Babajanui už pateiktus odos bandinius, Valstybinio patologijos centro darbuotojui E. Žurauskui – už pateiktus širdies audinių bandinius. Tyrimai buvo finansuojami Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondo remiamos mokslo programos „Šviesa biomedicinoje: diagnostika ir terapija“ ir kompleksinio tyrimo darbo „Žmogaus širdies laidžiosios sistemos vizualizacija fluorescencinės spektroskopijos metodu“ lėšomis.



8 pav. Portatyvus mėlynos šviesos šaltinis, skirtas paviršinių audinių vizualiai apžiūrai

## Fluorescence diagnostics of tumors

Ričardas Rotomskis<sup>1,2</sup>, Giedrė Streckytė<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laser-induced Research Center, <sup>2</sup>Institute of Oncology, Vilnius University, Lithuania

**Key words:** fluorescence, autofluorescence, endogenous fluorophores, endogenous porphyrins.

**Summary.** The intrinsic autofluorescence properties of biological tissues can change depending on alterations induced by pathological processes. In this paper, autofluorescence properties of normal and tumor tissue are presented and possibilities of the application of autofluorescence as a parameter for *in situ* cancer detection in different organs are discussed. Data obtained during *in vivo* measurements of normal and pigmented skin autofluorescence are presented. Autofluorescence of experimental tumor (hepatoma A22) was measured to discriminate the optical differences between necrotic, non-necrotic and hemorrhagic areas of tumor and healthy tissue. It was concluded that the uneven distribution of endogenous porphyrins fluorescence in non-necrotic tumor tissue as well as the absence of endogenous porphyrins fluorescence in the small experimental tumors complicated the diagnosis of cancerous tissue based on the autofluorescence measurements.

Correspondence to R. Rotomskis, Laser-induced Research Center, Vilnius University, Saulėtekio ave. 3<sup>rd</sup> corps, 10222 Vilnius, Lithuania. E-mail: Ricardas.rotomskis@ff.vu.lt

### Literatūra

- Alfano RR, Tata DB, Cordero J, et al. Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. *IEEE J Quant Electron* 1984;20:1507-11.
- Proffo AE. Review of fluorescence diagnosis using porphyrins. *Proc SPIE* 1988;907:50-156.
- Andersson-Engels S, Wilson BC. In vivo fluorescence in clinical oncology: fundamental and practical issues. *J Cell Pharmacol* 1992;3:48-61.
- Papazoglou TG. Malignant and atherosclerotic plaque diagnosis - is laser induced fluorescence spectroscopy the ultimate solution? *J Photochem Photobiol B* 1995;28:3-11.
- Bigio IJ, Mourant JR. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy. *Phys Med Biol* 1997;42:803-14.
- Andersson-Engels S, af Klinteberg C, Svanberg K, et al. *In vivo* fluorescence imaging for tissue diagnostics. *Phys Med Biol* 1997;42:815-24.
- Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol* 1998;68:603-632.
- Hillemanns P, Weingandt H, Baumgartner R, et al. Photo-detection of cervical intraepithelial neoplasia using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Cancer* 2000;88:2275-82.
- Brewer M, Otzinger U, Silva E, et al. Fluorescence spectroscopy for in vivo characterization of ovarian tissue. *Lasers Surg Med* 2001;29:128-35.
- Alfano RR, Tang GC, Pradhan A, et al. Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues. *IEEE J Quant Electron* 1987;10:1906-11.
- Lam S, Hung J, Palcic B. Detection of lung cancer by ratio fluorometry with and without Photofrin II. *Proc SPIE* 1990;1201:561-8.
- Glassman W, Liu CH, Tang GC, et al. Ultraviolet excited fluorescence spectra from non-malignant tissues of the gynecologic tract. *Laser Life Sci* 1992;5:49-58.
- Hung J, Lam S, LeRiche J, et al. Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg Med* 1991;11:99-105.
- Makaryceva J, Tamosiunas M, Didziapetriene J, et al. Mathematical methods of healthy and cancerous tissues autofluorescence spectra imaging. Abstracts of IX International Conference on Laser Applications in Life Sciences. Vilnius; 2002. p. 52.
- Kriegmair M, Baumgartner R, Knuechel R, et al. Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced fluorescence. *J Urol* 1996;155:105-10.
- Messmann H. 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX for the detection of gastrointestinal dysplasia. *GI Endosc Clin N Am* 2000;10:497-512.
- Baumgartner R, Huber RM, Schulz H, et al. Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *J Photochem Photobiol B Biol* 1996;36:169-74.
- Stapp H, Sroka R, Baumgartner R. Fluorescence endoscopy of gastrointestinal diseases: basic principles, techniques and clinical experience. *Endoscopy* 1998;30:379-86.
- Koenig F, McGovern FJ, Althausen AF, et al. Laser-induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 1996;156:1597-1601.
- Anidjar M, Etori D, Cussenot O, et al. Laser-induced autofluorescence diagnosis of bladder tumours: dependence on the excitation wavelength. *J Urol* 1996;156:1590-6.
- Richards-Kortum R, Rava RP, Petras RE, et al. Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia. *Photochem Photobiol* 1991;53:777-86.
- Haringsma J, Tygat GN. Fluorescence and autofluorescence. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 1999;13:1-10.
- Lohmann W, Mussmann J, Lohmann C, et al. Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989;31:249-53.
- Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, et al. Cellular autofluorescence - is it due to flavins? *J Histochem Cytochem* 1979;27:44-8.
- Halangk W, Kuntz S. Use of NAD(P)H and flavoprotein fluorescence signals to characterize the redox state of pyridine nucleotide in epididymal bull spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1991;1056:274-8.
- Lohmann W, Paul E. In situ detection of melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften* 1988;75:201-2.
- Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, et al. Ultraviolet laser induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers Surg Med* 1992;12:63-78.
- Rotomskis R, Streckytė G, Gričiūtė L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai. (Photosensitized tumor therapy: primary processes.) Vilnius; 2002. p. 201-37.
- Bottiroli G, Croce AC, Locatelli D, et al. Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon: a comprehensive ex vivo study. *Lasers Surg Med* 1995;16:48-60.
- Van Dam J, Bjorkman DJ. Shedding some light on high-grade dysplasia. *Gastroenterology* 1996;111:247-9.

31. Pradhan A, Pal P, Durocher G, et al. Steady-state and time-resolved fluorescence properties of metastatic and non-metastatic malignant cells from different species. *J Photochem Photobiol B Biol* 1995;31:101-12.
32. Lam S, Becker HD. Future diagnostic procedures. *Thorac Endosc* 1996;6:363-79.
33. Schneckenburger H, Gschwend MH, Strauss WS, et al. Energy transfer spectroscopy for measuring mitochondrial metabolism in living cells. *Photochem Photobiol* 1997;66:34-41.
34. Policard A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeur experimentales examinee a la lumiere de woods. *C R Soc Biol* 1924;91:1423-8.
35. Ronchese F. The fluorescence of cancer under the Wood's light. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1954;7:971-6.
36. Ghadially FN, Neish WJP. Porphyrin fluorescence of experimentally produced squamous cell carcinoma. *Nature* 1960;188:1124-224.
37. Ghadially FN. Red fluorescence of experimentally induced and human tumours. *J Pathol Bacteriol* 1960;80:345-51.
38. Harris DM, Werkhaven J. Endogenous porphyrin fluorescence in tumors. *Lasers Surg Med* 1987;7:467-72.
39. Tamosiunas M, Makaryceva J, Labanauskiene J, et al. Autofluorescence of transplantable hepatoma A22 (MH-A22): prospects of tumour tissue optical biopsy. *Eksperimentalnaja Onkologija* 2004;26:118-24.
40. Ghadially FN, Neish WJP, Dawkins HC. Mechanisms involved in the production of red fluorescence of human and experimental tumours. *J Pathol Bacteriol* 1963; 85:77-92.
41. Moesta KT, Ebert B, Handke T, et al. Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases. *Cancer Res* 2001;61:991-9.
42. Kusunoki Y, Imamura F, Uda H, et al. Early detection of lung cancer with laser-induced fluorescence endoscopy and spectrofluorometry. *Chest* 2000;118:1776-82.
43. Yang Y, Fe Y, Li F, et al. Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin. *Laser Surg Med* 1987;7:528-32.
44. El-Sharabay MMH, El-Wassel AM, Hafez SA, et al. Porphyrin metabolism in some malignant diseases. *Br J Cancer* 1992; 65:409-12.
45. Andersson PS, Kjellen E, Montan S, et al. Autofluorescence of various rodent tissues and human skin tumors samples. *Lasers Med Sci* 1987;2:41-9.
46. Andersson-Engels S, Johansson J, Stenram U, et al. Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence. *IEEE* 1990;26:2207-17.
47. Yang Y, Tang CC, Bessler M, et al. Optical spectroscopy methods to detect colon cancer. *Proc SPIE* 1994;2135:36-9.
48. Lohmann W, Paul E. Native fluorescence of unstained cryosections of the skin with melanomas and naevi. *Naturwissenschaften* 1989;76:424-6.
49. Lohmann W, Nilles M, Boedeker RH. In situ differentiation between nevi and malignant melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften* 1991;78:456-7.
50. Chwirot BW, Chwirot S, Redzinski J, et al. Detection of melanomas by digital imaging of spectrally resolved UV light-induced autofluorescence of human skin. *Eur J Cancer* 1998; 34:1730-4.
51. Bourg-Heckly G, Blais J, Padilla JJ, et al. Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus: tissue characterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy* 2000;32:756-65.
52. Ingrams DR, Dhingra JK, Roy K, et al. Autofluorescence characteristics of oral mucosa. *Head Neck J Sci Specialities Head Neck* 1997;19:27-32.
53. Harries ML, Lam S, MacAulay C, et al. Diagnostic imaging of the larynx: autofluorescence of laryngeal tumors using the helium cadmium laser. *J Laryngol Otolaryngol* 1995;109:108-10.
54. Lam S, MacAulay C, Hung J, et al. Detection and dysplasia and carcinoma in situ with lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:1035-40.
55. Roy K, Bottrill ID, Ingrams DR, et al. Diagnostic fluorescence spectroscopy of oral mucosa. *Proc SPIE* 1995;2395:135-42.
56. Dhingra JK, Perrault DF, McMillan K, et al. Early diagnosis of upper aerodigestive tract cancer by autofluorescence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:1181-6.
57. Andersson-Engels S, Elnor A, Johansson J, et al. Clinical recording of laser-induced fluorescence spectra for evaluation of tumour demarcation feasibility in selected clinical specialities. *Lasers Med Sci* 1991;6:415-24.
58. Marchesini R, Brambilla M, Pignoli E, et al. Light induced fluorescence spectroscopy of adenomas, adenocarcinomas and non-neoplastic mucosa in human colon. *J Photochem Photobiol B Biol* 1992;14:219-30.
59. Bloznelytė-Plesnienė L, Novickovas A, Liutkevičiūtė-Navickienė J, et al. Fluorescence diagnosis of different skin and mucosal malignancies. Abstract book of IX International Conference on Laser Applications in Life Sciences. Vilnius; 2002. p. 105.

*Straipsnis gautas 2004 06 02, priimtas 2004 09 30*  
*Received 2 June 2004, accepted 30 September 2004*