

Комбинация флуоресцентного изображения и локальной спектрофотометрии при флуоресцентной диагностике раннего рака гортани и бронхов

В.В.Соколов*, Е.В.Филоненко*, Л.В.Телегина*, Н.Н.Булгакова**, В.В.Смирнов**

Представлены результаты сравнительных исследований аутофлуоресценции и 5-АЛК-индуцированной флуоресценции протопорфирина IX, используемых в диагностике раннего рака гортани и бронхов. В процессе эндоскопического исследования проанализированы аутофлуоресцентное и 5-АЛК-индуцированное флуоресцентное изображения тканей гортани и бронхов. Для верификации находок, полученных в свете флуоресцентного изображения, использован метод локальной спектрофотометрии. Показано, что такой комбинированный подход может эффективно применяться для улучшения диагностики предрака и раннего рака, для выявления первичного множественного опухолевого поражения, а также для диагностики остаточной опухоли или раннего рецидива после эндоскопического, хирургического или лучевого лечения. Разработанный подход позволяет минимизировать число ложноположительных результатов и уменьшить количество биопсий, обычно используемых при эндоскопическом поиске в белом свете скрытых очагов рака.

Ключевые слова: лазерная медицина, флуоресцентная диагностика, фотосенсибилизаторы.

1. Введение

В основе метода флуоресцентной диагностики (ФД) опухолей лежат два явления: 1) избирательность накопления фотосенсибилизаторов в тканях злокачественных новообразований и возможность их обнаружения по характерной флуоресценции из освещаемой лазерным излучением области и 2) различия в интенсивности и спектральном составе собственной (ауто- или эндогенной) флуоресценции здоровых и патологически измененных тканей при их возбуждении лазерным излучением в видимом и УФ диапазонах спектра. Метод ФД активно развивался в последние десятилетия как в нашей стране, так и за рубежом благодаря активному внедрению в клиническую практику различных фотосенсибилизаторов, совершенствованию волоконной оптики и оптоэлектронной техники.

2. Флуоресцентная диагностика с использованием фотосенсибилизаторов и эндогенных флуорохромов

Клинические исследования в области ФД рака были начаты в МНИОИ им. П.А.Герцена совместно с ИОФ им. А.М.Прохорова РАН (Отдел оптической спектроскопии) в 1992 г., когда были разрешены первые в России клинические испытания метода фотодинамической терапии (ФДТ) рака. К настоящему времени накоплен значительный опыт флуоресцентного детектирования ранних

форм злокачественных опухолей дыхательных путей и пищеварительного тракта – проведено более 1000 флуоресцентных обследований с использованием фотосенсибилизаторов Фотогем, Фотосенс и Аласенс [1–3].

Наиболее перспективным для целей ФД оказался препарат Аласенс (5-аминолевулиновая кислота, 5-АЛК). Избыточное введение в организм 5-АЛК, предшественника синтеза гема, приводит к селективному накоплению в опухолевых клетках эндогенного фотосенсибилизатора протопорфирина IX [4]. Накопление протопорфирина IX в опухоли происходит в течение нескольких часов, сохраняется он в клетках до 1–2 сут. При возбуждении в одну из полос поглощения в синей или зеленой области спектра протопорфирин IX интенсивно флуоресцирует в красной области с максимумами на $\lambda = 635$ и 700 нм, что позволяет при возбуждении флуоресценции тканей получить высокий контраст между интенсивностями флуоресценции опухоли и окружающей здоровой ткани. Этот феномен и составляет основу 5-АЛК-индуцированной ФД.

По мере накопления опыта в области ФД с введением селективных фотосенсибилизаторов [5] был выявлен ряд ограничений в использовании данного метода в скрининговых диагностических программах. Это обстоятельство стимулировало возобновление интереса к поиску различий в аутофлуоресценции злокачественных опухолей и нормальных тканей, регистрируемой при возбуждении лазерным излучением без введения в организм фотосенсибилизаторов.

Спектр аутофлуоресценции биологических тканей в видимом диапазоне формируется определенными биологическими молекулами (эндогенными флуорохромами), флуоресцирующими на разных длинах волн. В синей области эффективно возбуждаются флавины, порфирины, НАДН и некоторые другие флуорохромы, флуоресцирующие в видимом диапазоне спектра [6].

Аутофлуоресценция злокачественных опухолей чело-

*Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена, Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр., 3; тел.: (095) 945 88 07, факс.: (095) 945 68 32, e-mail: vik123@online.ru

**Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; тел./факс: (095) 135 02 97, e-mail: koker@kapella.gpi.ru

века в красной области спектра впервые была описана Поликардом в 1924 г. [7]. Ее наличие автор объяснил присутствием в опухолях эндогенных порфиринов. Как показали современные исследования, накопление эндогенных порфиринов в некоторых типах злокачественных опухолей действительно может происходить на поздних стадиях их развития, особенно на стадиях распада и метастазирования [8]. На стадии предрака и раннего рака, как было показано Ламом [9], очаги патологии характеризуются резким падением интенсивности аутофлуоресценции в видимом диапазоне спектра относительно окружающих здоровых тканей.

В настоящее время наибольший клинический материал в аутофлуоресцентном диагностическом исследовании накоплен при раке легкого. Предраковая патология и ранние формы рака бронхов имеют, как правило, незначительные размеры (1–10 мм) и толщину (200–300 мкм), поэтому вероятность их обнаружения при обычной бронхоскопии в белом свете составляет всего около 36 %. В 1992 г. группа ученых из Канады показала [9], что локальные измерения аутофлуоресценции тканей при возбуждении излучением с длиной волны 442 нм повышает чувствительность обнаружения раннего рака в ходе бронхоскопии до 86 %.

С целью изучения возможностей метода был разработан флуоресцентный бронхоскоп LIFE System (Lung Imaging Fluorescence Endoscopy System, Xillix Technologies Corp., Канада), позволяющий получать флуоресцентные изображения участков поверхности слизистой бронхов. В 1994–1999 гг. в семи медицинских центрах США и Канады были проведены широкие клинические испытания аутофлуоресцентной бронхоскопии в диагностике раннего рака легкого с использованием указанной аппаратуры [10]. При возбуждении флуоресценции излучением He–Cd-лазера ($\lambda = 442$ нм) установка регистрирует аутофлуоресцентные изображения тканей бронхов в диапазоне 480–800 нм. После компьютерной обработки и нормировки видеозаписи формируется псевдоизображение, являющееся объектом диагностического анализа. Методика не включает проведение локальных спектрально-флуоресцентных измерений. По результатам испытаний бронхоскопа LIFE System в литературе представлен анализ более 1000 клинических наблюдений. Результаты испытаний показали, что если при бронхоскопии в белом свете детектируется около 40 % раннего рака бронхов, то при аутофлуоресцентной бронхоскопии – порядка 80 % [10–12].

Бронхоскоп LIFE System был также применен в аутофлуоресцентной диагностике рака гортани [13]. Полученные результаты показали крайне высокую чувствительность аутофлуоресцентной ларингоскопии – более 90 %. Однако было отмечено большое количество фактов ложноположительной аутофлуоресценции, обусловленной развитием рака на фоне хронического ларингита.

Таким образом, самостоятельно используемые методики ФД рака гортани и бронхов, основанные на анализе аутофлуоресцентных или 5-АЛК-индуцированных флуоресцентных изображений, обладают высокой чувствительностью, но недостаточной специфичностью. Несмотря на то что многие авторы отмечают возможность объективизации полученных изображений с помощью спектрально-флуоресцентных измерений, крайне мало работ, в которых были бы реализованы оба подхода [14].

В настоящей работе представлены первые результаты

клинического применения спектрально-флуоресцентной диагностической установки в комбинации с флуоресцентной бронхоскопией. Таким образом, были объединены оба подхода: регистрация и анализ флуоресцентных изображений (аутофлуоресцентного и 5-АЛК-индуцированного) и локальная спектрофотометрия биологических тканей. С целью выявления ранних скрытых форм рака гортани и бронхов были обследованы 37 пациентов из группы риска развития онкологического процесса. У 10 пациентов ФД проводилась многократно в процессе динамического наблюдения в течение одного-двух лет.

Полученные результаты имеют, несомненно, предварительный характер в силу ограниченности обследуемой группы пациентов, однако они показали высокую корреляцию (более 90 %) с данными морфологического анализа биопсийного материала, что свидетельствует о перспективности, надежности и эффективности применения флуоресцентных методов в диагностике рака гортани и бронхов.

3. Материалы и методы

3.1. Аппаратура для получения флуоресцентных изображений

В данной работе для регистрации флуоресцентных изображений в реальном времени в процессе ларинго- и бронхоскопий нами использовался гибкий флуоресцентный бронхоскоп D-Light/AF System (Karl Storz GmbH, Германия) [15], который позволяет проводить эндоскопическое исследование в белом свете, в свете собственной флуоресценции тканей и в свете индуцированной флуоресценции протопорфирина IX при возбуждении синим светом (380–460 нм и 380–440 нм соответственно). В качестве источника возбуждения в этой системе используется ксеноновая лампа с набором фильтров.

3.2. Аппаратура для получения спектров флуоресценции

Для проведения локальной спектрофотометрии слизистых оболочек дыхательных путей использовали разработанную в ИОФ РАН (ООО «Кластер») совместно с МНИОИ флуоресцентную диагностическую установку «Спектр–"Кластер"». Данная установка включает в себя волоконно-оптическое устройство доставки лазерного излучения и сбора флуоресцентного излучения, спектрограф, многоканальный линейный фотоприемник, персональный компьютер и лазерные источники излучения для возбуждения флуоресценции [16, 17]. В настоящей работе в качестве лазерного источника возбуждения использовали He–Cd-лазер ($\lambda = 442$ нм). Выбор источника возбуждения флуоресценции диктуется, прежде всего, тем обстоятельством, что излучение с $\lambda = 442$ нм позволяет эффективно возбуждать как аутофлуоресценцию, так и флуоресценцию индуцированного протопорфирина IX. В то же время оно минимально поглощается присутствующим в тканях гемоглобином.

Для доставки возбуждающего лазерного излучения к ткани и излучения флуоресценции к фотоприемнику, в биопсийный канал эндоскопа вводится Y-образный кольцевой катетер, состоящий из кварцевых волокон. Один из концов катетера представляет собой одиночное волокно, идущее от лазера к ткани. Другой конец катетера – это пучок волокон, приходящих от ткани к спектрографу. На третьем конце катетера, расположенном

непосредственно у поверхности ткани, собираются все волокна, причем волокна доставки излучения флуоресценции размещены вокруг центрального волокна, по которому поступает возбуждающее лазерное излучение. Пространственное разрешение при обследовании поверхности определяется диаметром пятна диффузно рассеянного лазерного излучения и достигает порядка 1 мм, что позволяет достаточно точно определять границы микроопухоли. Излучение флуоресценции разлагается в спектр с помощью решетчатого полихроматора с дисперсией 35 нм/мм. Сигналы, поступающие с фотоприемника, регистрируются в спектральном диапазоне 350–800 нм. Полученные спектры отображаются многоканальным фотоприемником и обрабатываются с помощью ПК. Рассчитываемый по специальному алгоритму спектрально-флуоресцентный диагностический параметр D_f [18], позволяющий проводить количественную оценку и верификацию флуоресцентных изображений, отображается на экране компьютера также в реальном времени. Он определяется как $D_f = I_{620-650}/I_{500-520}$, где $I_{620-650}$ и $I_{500-520}$ – интегральные интенсивности регистрируемой флуоресценции в диапазонах 620–650 нм и 500–520 нм.

Методика проведения флуоресцентных исследований подробно описана в [19]. Для идентификации выявленных в процессе флуоресцентной бронхоскопии подозрительных участков проводится сканирование пятна возбуждающего лазерного излучения вдоль поверхности подозрительного участка, его границ и окружающих здоровых тканей; в реальном времени на экране компьютера отображаются регистрируемые спектры и осуществляется мониторинг диагностического параметра D_f . Все спектры записываются в момент контакта торца катетера с поверхностью слизистой оболочки. В среднем при каждом обследовании записывается около 30 спектров флуоресценции и соответственно фиксируется параметр D_f для всех типов исследуемых тканей. Все очаги флуоресценции с отклонениями от нормальных средних значений D_f подвергаются биопсии и морфологическому исследованию.

Необходимо отметить, что при измерениях спектров флуоресценции *in vivo* крайне важно соблюдать идентичные условия возбуждения, поэтому строго поддерживается определенная мощность возбуждающего лазерного излучения, измеряемая на конце волоконно-оптического катетера; регистрация каждого спектра проводится в условиях контакта конца катетера с поверхностью ткани. Это особенно актуально при флуоресцентных исследованиях трахеобронхиального дерева, когда измерения по касательной к поверхности ткани неизменно приводят к искажению интенсивности регистрируемых спектров.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Аутофлуоресценция

Результаты исследований показали, что при возбуждении в синем спектральном диапазоне наблюдается интенсивная зеленая флуоресценция нормальной ткани гортани и бронхов. В то же время интенсивность аутофлуоресценции в очагах предрака и раннего рака значительно меньше, чем интенсивность аутофлуоресценции в окружающей здоровой ткани. Данные локальной спектрофотометрии подтвердили резкие различия в интенсивности аутофлуоресценции здоровых и патологически измененных тканей в диапазоне 460–800 нм (см. рис. 1). Таким

образом, типичное аутофлуоресцентное изображение опухолей трахеобронхиального дерева, регистрируемое при эндоскопическом исследовании, – это темное пятно на фоне ярко-зеленой флуоресценции здоровой ткани.

Впервые феномен резкого падения интенсивности аутофлуоресценции опухолей при возбуждении в зеленой области спектра (512 нм) мы наблюдали в рамках клинических испытаний первого отечественного фотосенсибилизатора Фотогем в 1992–1994 гг., когда изучали избирательность его накопления в злокачественных новообразованиях [20]. В рамках этих клинических испытаний нами были проведены спектрально-флуоресцентные исследования более 200 пациентов с опухолями различных локализаций. У всех пациентов наблюдалось резкое падение интенсивности спектра излучения аутофлуоресценции злокачественных опухолей, что позволило разработать метод эндоскопической флуоресцентной диагностики злокачественных опухолей полых внутренних органов [17].

Механизмы, лежащие в основе данного явления, до конца не изучены, однако можно высказать следующие предположения: во-первых, в опухолевой ткани происходит уменьшение количества флуорохромов и (или) изменение их функционального состояния, обусловленное особенностями окислительно-восстановительных процессов; во-вторых, оптические свойства опухолевой ткани меняются вследствие повышения концентрации молекул, имеющих сильное поглощение в видимой части спектра [21]. Известно, что глубина проникновения в ткани возбуждающего излучения в УФ области спектра составляет 1–10 мкм, а при возбуждения в зеленой области – не более 1 мм. Изучение флуоресценции замороженных срезов тканей бронхов показало [22–24], что эпителиальный слой слизистой оболочки бронха (как в норме, так и при различных патологиях) флуоресцирует крайне слабо; подслизистый слой флуоресцирует ярко, но при этом интенсивность флуоресценции его поверхностного слоя существенно выше, чем подлежащего.

Мы полагаем, что основным фактором, определяющим падение интенсивности аутофлуоресценции раннего рака слизистой оболочки гортани и бронхов, является утолщение эпителия в очагах предрака и раннего рака. Теоретические расчеты интенсивности флуоресценции слизистой оболочки бронхов, проведенные в [22], показали, что при утолщении респираторного эпителия от 50 до 200 мкм интенсивность флуоресценции может уменьшиться в 2.5 раза. Реально при ранней стадии рака бронхиальный эпителий утолщается более чем на 200 мкм, что фактически «гасит» интенсивную флуоресценцию подслизистого слоя, т. е. в зоне злокачественного перерождения слизистая оболочка теряет свою прозрачность и в аутофлуоресцентном изображении в этом месте наблюдается затемнение.

На рис. 1 представлен наиболее характерный пример аутофлуоресцентной ларингоскопии пациента, страдающего хроническим ларингитом. При ларингоскопии в белом свете обе голосовые складки кажутся равномерно утолщенными, в то время как при обследовании в свете аутофлуоресценции на одной голосовой складке на фоне гомогенной зеленой флуоресценции было обнаружено темное пятно, обусловленное резким падением интенсивности аутофлуоресценции. Биопсия и последующий морфологический анализ показали наличие в этой зоне раннего рака.

Крайне низкий уровень интенсивности аутофлуоресценции злокачественных поражений позволил выявить у ряда больных рентгеногегативный ранний центральный рак легкого, невидимый при бронхоскопии в белом свете. Как следует из рис.2, в свете аутофлуоресценции опухоль проявляется в виде затемненного участка на фоне ярко-зеленой флуоресценции нормальной слизистой бронха. При локальной спектрофотометрии различия в интенсивностях аутофлуоресценции составляют от 5 до 10.

В то же время при аутофлуоресцентных исследованиях имеют место ложноположительные результаты. Падение интенсивности аутофлуоресценции регистрируется в месте удаленной злокачественной опухоли после эндоскопической ФДТ, лазерной деструкции и хирургического вмешательства. Можно предположить, что ложноположительная аутофлуоресценция обусловлена резким изменением оптических свойств ткани (травматизация и т. д.) вследствие указанных воздействий.

4.2. 5-АЛК-индуцированная флуоресценция протопорфирина IX

В настоящее время в России (ФГУП ГНЦ РФ НИО-ПИК) по оригинальной технологии синтезирована стандартная субстанция 5-АЛК и на ее основе разработан лекарственный препарат Аласенс. Нами изучалась флуоресценция здоровых и патологически измененных тканей гортани и бронхов в ходе эндоскопического исследования через 2–3 ч. после ингаляции с препаратом Аласенс.

В указанные сроки после ингаляции с Аласенсом в опухоли голосовой складки наблюдалась ярко-красная флуоресценция индуцированного протопорфирина IX, в то время как флуоресценция здоровой голосовой складки оставалась зеленой (аутофлуоресценция) (рис.3). Спектральные исследования показали, что диагностический параметр D_f , в здоровой голосовой складке составляющий 0.3, в опухоли возрастает до 15.5.

При некоторых хронических воспалительных процессах также регистрируется визуально однородная красная флуоресценция индуцированного протопорфирина IX. При сканировании пятна возбуждающего лазерного излучения и мониторинге диагностического параметра вдоль поверхности слизистой оболочки в зоне красного свечения величина D_f в среднем невелика и составляет 2.5–3, в то время как в здоровой ткани $D_f = 0.3 - 0.5$. Однако у некоторых пациентов на фоне умеренных значений диагностического параметра были обнаружены отдельные участки, на которых значение D_f достигало 9–15. Морфологическое исследование биопсийного материала выявило на этих участках ранний рак гортани.

Типичное изображение, регистрируемое при флуоресцентной бронхоскопии с препаратом Аласенс – умеренная красная флуоресценция опухоли на фоне ярко-зеленой флуоресценции окружающей здоровой слизистой бронха. При этом в измеренных спектрах нормальной слизистой бронха $D_f = 0.4$; в этих спектрах доминирует собственная флуоресценция с максимумом на 520 нм. Индуцированная красная флуоресценция протопорфирина IX практически отсутствует либо выражена незначительно ($D_f \leq 0.9$). Напротив, в опухоли интенсивность аутофлуоресценции во всем спектральном диапазоне (460–800 нм) крайне низка, а интенсивность флуоресценции индуцированного протопорфирина IX очень высока: $D_f = 7 - 15$. Формы регистрируемых спектров флуоресценции показаны на рис.4.

Особый интерес в наших исследованиях представляло изучение возможностей флуоресцентного детектирования предраковых очаговых изменений слизистых оболочек бронхов, не выявляемых при эндоскопическом обследовании в белом свете. Во флуоресцентном изображении очаги предраковой патологии, развивающиеся на фоне хронических воспалительных процессов, детектируются по красной флуоресценции индуцированного протопорфирина IX, интенсивность которой колеблется от слабой до умеренной. Однако диагностический параметр D_f , составляющий при хронических воспалительных процессах ~ 1.5 , в участках предрака возрастает незначительно (до 2.5), не достигая значений, характерных для раннего рака бронхов (от 7 и выше).

У ряда пациентов проведение флуоресцентной бронхоскопии позволило выявить ранний рентгеногегативный рак легкого, не детектируемый при бронхоскопии в белом свете и при использовании других методов диагностики (см. рис.4). У этих пациентов при проведении флуоресцентной бронхоскопии было выявлено неоднородное неяркое красное свечение. При измерении спектров внутри этой флуоресцирующей зоны и мониторинге параметра D_f были обнаружены подозрительные участки с $D_f = 9$, что существенно выше средних значений, зарегистрированных в этой зоне (1.5–2.5). Биопсия слизистой оболочки в зонах с высоким диагностическим параметром и последующий морфологический анализ подтвердили наличие рака.

У одного из пациентов этой группы в ходе флуоресцентной бронхоскопии были обнаружены четыре опухоли легкого. Все они характеризовались очень интенсивной красной флуоресценцией индуцированного протопорфирина IX. Значение D_f варьировалось в опухолях от 7 до 9, в то время как в нормальной слизистой оболочке (на расстоянии 5 мм от опухолей) оно составляло 0.6.

В ходе исследований были выявлены и ложноположительные результаты. Флуоресценция протопорфирина IX регистрировалась по линии резекции бронха через 3–4 месяца после оперативного вмешательства, что было связано с воспалением слизистой и ростом грануляции. Однако при ложноположительных сигналах диагностический параметр D_f не превышал 3.5, что гораздо ниже значений, характерных для опухолевого процесса. Таким образом, результаты разработанной методики локальной спектрофотометрии коррелируют с результатами морфологического анализа и в случае ложноположительной флуоресценции.

В целом у 94 % пациентов этой группы результаты флуоресцентного обследования были подтверждены результатами морфологического анализа, что свидетельствует о высокой чувствительности разрабатываемого метода. В ходе дальнейших исследований предполагается изучение его специфичности на большей группе пациентов.

5. Выводы

Таким образом, разрабатываемый нами подход, основанный на анализе флуоресцентных изображений (как аутофлуоресцентного, так и 5-АЛК-индуцированного) в комбинации с локальной спектрофотометрией, значительно увеличивает надежность выполнения прицельной биопсии в зоне «флуоресцирующего пятна», улуч-

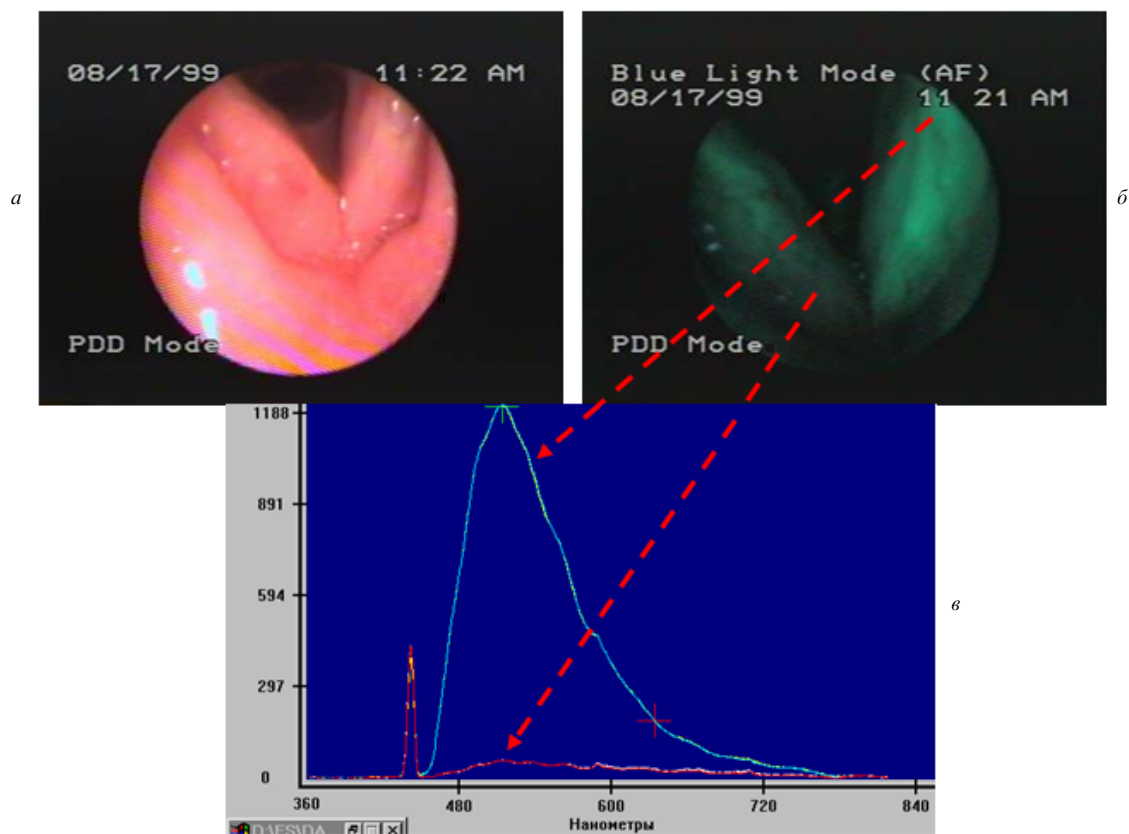


Рис.1. Аутофлуоресцентная ларингоскопия и локальная спектрофотометрия рака in situ голосовой складки на фоне хронического гиперпластического ларингита – эндоскопическое изображение голосовой связки в белом свете (а) и в свете аутофлуоресценции (б), а также спектры аутофлуоресценции нормальной слизистой оболочки голосовой складки и опухоли, измеренные при возбуждении излучением с $\lambda = 442$ нм (в).

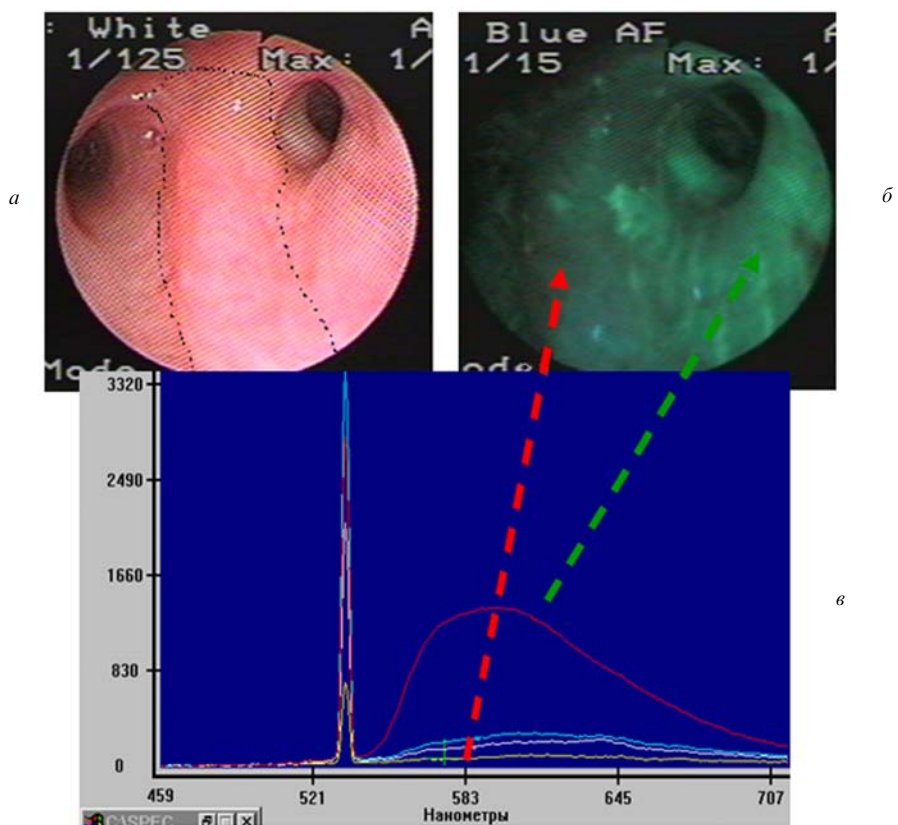


Рис.2. Аутофлуоресцентная бронхоскопия и локальная спектрофотометрия раннего рентгеногемативного рака легкого (SCC RULB) – эндоскопическое изображение бронха в белом свете (а) и в свете аутофлуоресценции (б), а также спектры аутофлуоресценции нормальной слизистой оболочки бронха и опухоли, измеренные при возбуждении излучением с $\lambda = 442$ нм (в)

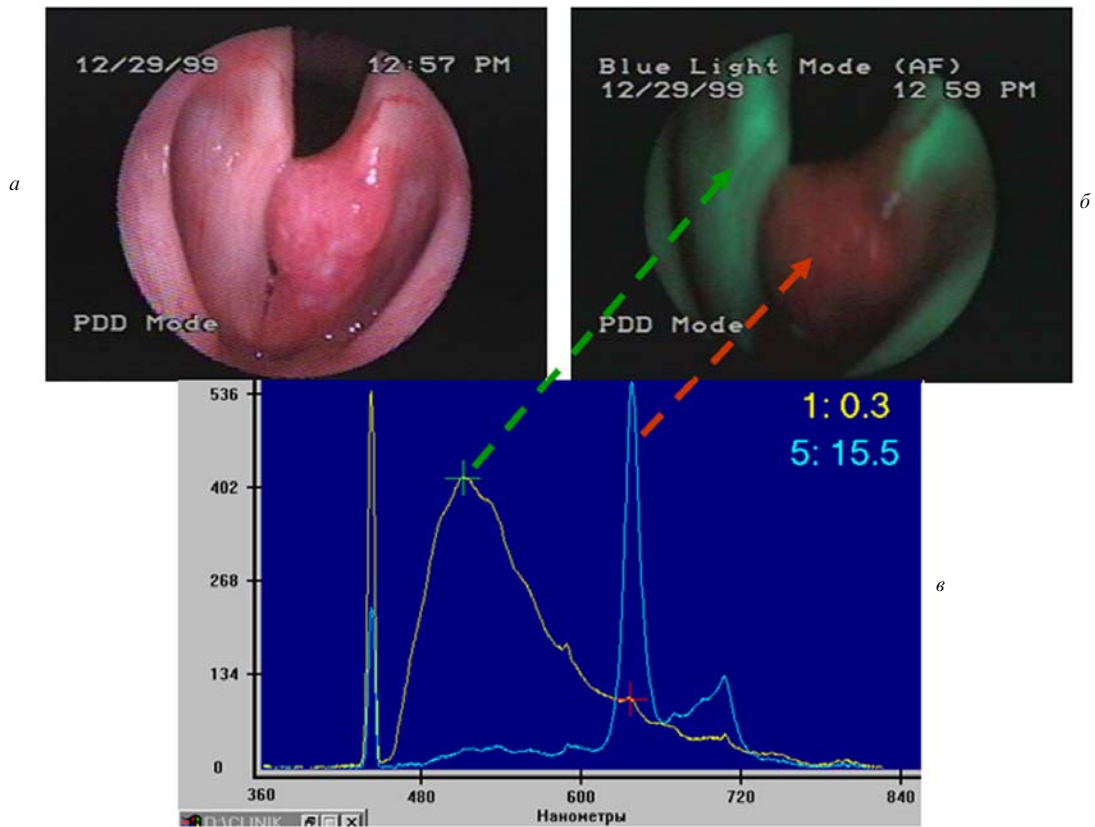


Рис.3. Флуоресцентная ларингоскопия и локальная спектрофотометрия рака левой голосовой складки через 2 ч после ингаляции с препаратом Аласенс – эндоскопическое изображение голосовой связки в белом свете (а) и в свете флуоресценции (б), а также спектры флуоресценции нормальной слизистой оболочки голосовой складки ($D_f = 0.3$, спектр № 1) и опухоли ($D_f = 15.5$, спектр № 5), измеренные при возбуждении излучением с $\lambda = 442$ нм (в).

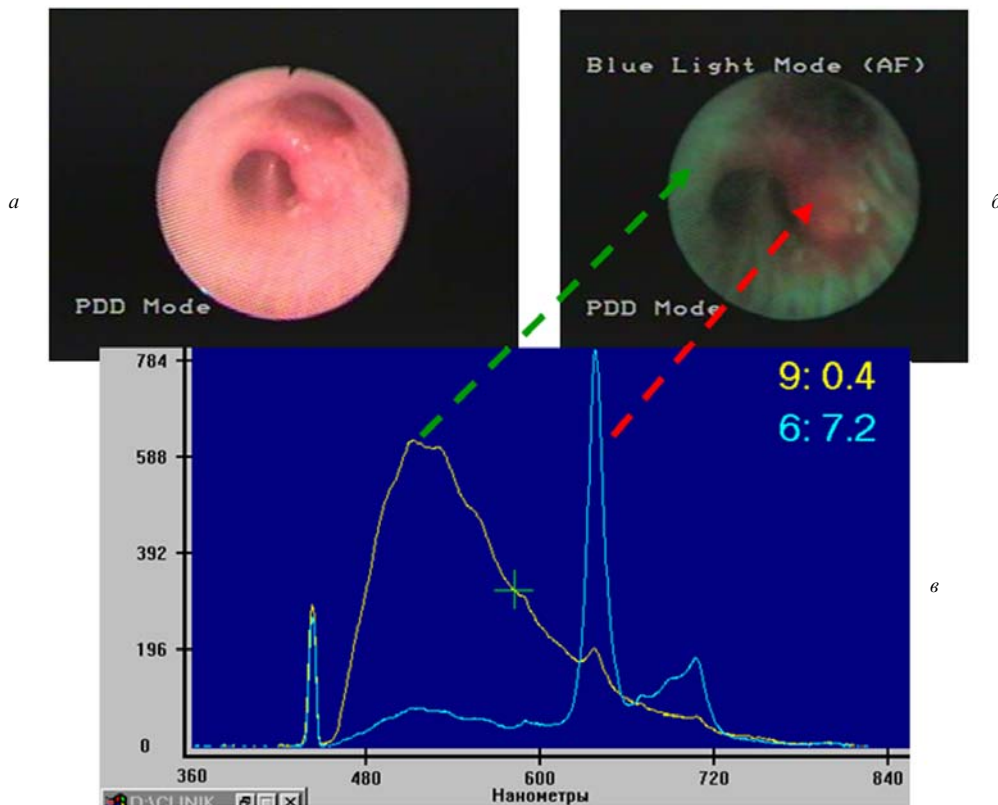


Рис.4. Флуоресцентная бронхоскопия и локальная спектрофотометрия раннего рентгеноотрицательного рака легкого (SCC RB2) через 2 ч после ингаляции с препаратом Аласенс – эндоскопическое изображение бронха в белом свете (а) и в свете флуоресценции (б), а также спектры флуоресценции нормальной слизистой оболочки бронха ($D_f = 0.4$, спектр № 9) и опухоли ($D_f = 7.2$, спектр № 6), измеренные при возбуждении излучением с $\lambda = 442$ нм (в).

шает диагностику предрака и раннего рака, остаточной опухоли или раннего рецидива после предшествующего лечения, а также может быть эффективно использован для выявления первичного множественного опухолевого поражения. Разработанный подход позволяет минимизировать число ложноположительных результатов и количество биопсий, обычно необходимых при эндоскопическом поиске скрытых очагов рака в белом свете.

1. Sokolov V.V., Chissov V.I., Trakhtenberg A.K., Mamontov A.S., Frank G.A., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2728**, 39 (1996).
2. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. и др. *Хирургия*, **5**, 37 (1995).
3. Zharkova N., Kozlov D., Smirnov V., Sokolov V., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2325**, 400 (1994).
4. Ackerman G., Abels C., Vaeumer W., et al. *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **47**, 121 (1998).
5. Baumgartner R., Huber R.M., Schulz H., et al. *Photochem. Photobiol.*, **36**, № 2, 169 (1996).
6. Карнухов В.Н. *Цитология*, **XVIII**, № 4, 408 (1976).
7. Policard A. *CR Soc. Biol.*, **91**, 1423 (1924).
8. Stroka R., Baumgartner R., Buser A., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **1641**, 99 (1991).
9. Lam S., Hung J.Y., Kennedy S.M., et al. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **146**, № 6, 1458 (1992).
10. Lam S., MacAulay C., LeRiche J.C., Palcic B. *Cancer*, **89** (11 Suppl.), 2468 (2000).
11. Kennedy T.C., Lam S., Hirsch F.R. *Oncologist*, **6**, № 3, 257 (2001).
12. Kurie J.M., Lee J.S., Morice R.C., et al. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **90**, № 13, 991 (1998).
13. Delank W., Khanavkar B., Nakhosteen J.A., Stoll W. *Laryngoscope*, **110** (3 Pt.1), 368 (2000).
14. Pichler J., Stepp H., Baumgartner R., et al. *Lasermedizin*, **13**, 151 (1998).
15. Häußinger K., Stanzel F., Huber R.M., et al. *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*, **5**, 105 (1999).
16. Zharkova N., Kozlov D., Polivanov Yu., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2328**, 196 (1994).
17. Чиссов В.И., Соколов В.В., Жаркова Н.Н., Филоненко Е.В., Сухин Г.М. *Матер. научно-практической конф. Северо-западного региона России «Лазерные и информационные технологии в медицине XXI»* (С-Пб: изд-е ГНЦЛМ, 2001, с.513).
18. Соколов В.В., Жаркова Н.Н., Филоненко Е.В. Патент РФ № 2129273 «Способ эндоскопической флуоресцентной злокачественных опухолей полых органов» с приоритетом от 26.11.1997 г.
19. Соколов В.В., Жаркова Н.Н., Фабелинский В.И. и др. *Диагностика злокачественных опухолей на основе феноменов экзогенной и эндогенной флуоресценции: пособие для врачей* (М., 2001).
20. Sokolov V., Chissov V., Filonenko E., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2325**, 367 (1994).
21. Hung J., Lam S., LeRiche J. *Lasers Surg. Med.*, **11**, 99 (1991).
22. Lam S., MacAulay C., LeRiche J. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2324**, 2 (1994).
23. Bottiroli G., Dal Fante M., Marchesini R., et al. In: *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers* (Elsevier Science Publishers B.V., 1992, p.899).
24. Zonios G., Cothren R., Arendt J., et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **2324**, 9 (1994).