

УДК 616.31-07:535.37

*E. G. Vakulovskaya¹, A. A. Stratonnikov²***FLUORESCENT DIAGNOSTICS WITH ALASENSE IN ORAL CANCER**¹ *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow*² *Natural Sciences Center of A. M. Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow***ABSTRACT**

The aim of the study was to work out the regimes of fluorescent diagnostics (FD) in oral cancer patients with new photosensitizer 5-aminolaevulinic acid (Alasense, «NIOPIC», Russia) (AS), to evaluate the toxicity of AS and to determine the efficacy of FD with AS. 28 patients with oral cancer were enrolled in the study. It was shown that FD provided diagnostically significant information about disease advance, borders of tumor growth, often exceeding clinically detected sites, allowed identification of subclinical lesions in patients with primary multiple cancer and locally spread recurrences. FD demonstrated high sensitivity and specificity. Photosensitizer AS had high fluorescent activity and no significant toxicity with the exception of short-term increasing the sensitivity of skin to direct sunlight. Combined analysis of both fluorescent image and spectrometric data gives a possibility to improve the outcome of FD in oral cancer patients.

Key words: fluorescent diagnostics, Alasense, oral cancer.

*Е. Г. Вакуловская¹, А. А. Стратонников²***ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ АЛАСЕНС У БОЛЬНЫХ РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА**¹ *ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва,*² *ЦЕНИ ИОФ им. А. М. Прохорова РАН, Москва***РЕЗЮМЕ**

Работа посвящена методике флюоресцентной диагностики (ФД) рака слизистой оболочки полости рта с новым отечественным фотосенсибилизатором Аласенс (АС), оценке токсичности препарата в различных дозах, определению его флюоресцентной активности и диагностической ценности. В результате исследования, проведенного на 28 пациентах, показано, что проведение ФД препаратом Аласенс позволяет получать диагностически значимую информацию у больных злокачественными новообразованиями слизистой оболочки полости рта, определять границы распространения процесса, часто существенно превышающие клинически определяемые, выявлять у больных первично-множественным раком и распространенными рецидивами субклинические очаги. ФД с АС характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Препарат АС обладает высокой флюоресцентной активностью и не обладает токсичностью, за исключением кратковременного повышения чувствительности кожи к прямому солнечному свету. Комбинация анализа флюоресцентного изображения опухоли и спектрометрического исследования ее позволяет существенно объективизировать результаты диагностики.

Ключевые слова: флюоресцентная диагностика, Аласенс, рак слизистой оболочки полости рта.

ВВЕДЕНИЕ

Флюоресцентная диагностика (ФД) злокачественных новообразований основана на избирательности накопления фотосенсибилизатора в опухоли и возможности его обнаружения по флюоресценции при освещении светом определенной длины волны, совпадающей с пиком поглощения препарата. ФД рака является

наиболее перспективной для обнаружения опухолей, локализующихся в поверхностных слоях (эпидермис, эпителий слизистой оболочки). Многие фотосенсибилизаторы I и II поколений обладают хорошей терапевтической активностью, однако характеризуются низкой флюоресцентной контрастностью и замедленным выведением из организма, которое обуславливает до-

вольно продолжительную кожную фототоксичность, и поэтому не имеют самостоятельного применения для ФД [2].

В последние годы активно используется для этих целей 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), участвующая в биосинтезе гема и являющаяся предшественником эндогенного фотоактивного соединения протопорфирина IX (ПпIX), обладающего интенсивной флюоресценцией (две полосы на 635 и 700 нм) и фотодинамической активностью [6, 7, 11]. Многочисленные исследования показали, что опухолевые клетки способны к повышенному накоплению Пп в присутствии экзогенной 5-АЛК, что связывают с большей активностью в опухолевых клетках ферментов начального этапа синтеза гема, а также со снижением активности в них феррохелатазы — фермента, превращающего ПпIX в гем [5, 10]. Важную роль также могут играть изменение активности и появление несвойственных мест внутриклеточной локализации порфириногендеаминазы — фермента, регулирующего синтез порфирина [8], изменение pH опухоли, особенности липидного обмена биомембран опухоли [4, 10]. Накопление ПпIX в опухоли происходит в течение нескольких часов, и высокий уровень его удерживается до 1–2 сут, в то время как в нормальных клетках Пп быстро превращается в фотонеактивный гем [6, 9, 11]. Результатом этого является флюоресцентный контраст опухоли относительно окружающей ткани.

В Германии ФД рака мочевого пузыря с использованием 5-АЛК (Medac, Hamburg, Germany) проводится с 1992 г. С 1999 г. в ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН проводятся клинические испытания препарата Аласенс (5-аминолевулиновая кислота, ФГУП ГНЦ РФ «НИОПИК», Москва, Россия) для ФД и ФДТ у больных раком кожи, мочевого пузыря, слизистой оболочки полости рта.

При использовании разработанной для ФД аппаратуры возможно снятие и изучение спектров флюоресценции, а также получение двухмерных флюоресцентных изображений опухоли в видимом диапазоне спектра, что позволяет определить границы и распространенность процесса.

Задачами настоящего исследования было изучение возможностей применения для диагностики рака слизистой оболочки полости рта оригинального отечественного фотосенсибилизатора Аласенс (АС), разработка методики флюоресцентной диагностики у больных раком слизистой оболочки полости рта с АС, оценка токсичности и переносимости препарата в различных дозах, диагностической значимости ФД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Флюоресцентная диагностика с препаратом Аласенс проведена 28 больным раком слизистой оболочки полости рта, находившихся на стационарном лечении в НИИКО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в рамках 1–2-й фазы клинических испытаний как открытое исследование, при этом у 14 больных отмечался первичный рак, у 11 — рецидивный. У 2 больных был

первично-множественный метакхронный рак. Первично-множественный синхронный рак слизистой оболочки полости рта выявлен в результате ФД у 1 больной. Среди больных было 7 женщин в возрасте от 17 до 55 лет и 21 мужчина в возрасте от 47 до 73 лет. При морфологическом (цитологическом и/или гистологическом исследовании) у 26 пациентов был диагностирован плоскоклеточный рак (в 6 случаях — плоскоклеточный рак с ороговением, в 19 случаях — плоскоклеточный рак без ороговения, в 1 случае — низкодифференцированный плоскоклеточный рак), у 1 пациентки — цилиндрома, у 1 пациентки — аденокистозный рак. У 9 больных процесс локализовался на слизистой оболочке языка, у 5 — на слизистой дна полости рта, у 5 человек — на слизистой оболочке мягкого и твердого нёба, у 9 человек на слизистой оболочке щеки, ретромолярного пространства. Предшествующее лечение было проведено 20 больным и включало в себя химиотерапию (7 человек), лучевую терапию (10 человек), хирургическое и комбинированное лечение (4 человека), лазерные деструкции (2 человека), криодеструкцию (1 человек). Всем больным проводилось общеклиническое обследование с обязательной верификацией процесса, установлением стадии и распространенности заболевания до сеанса ФД. Применялись клинические, лабораторные, специальные методы исследования по следующей схеме: история болезни, клиническое обследование, общие анализы крови и мочи, биохимическое исследование крови (глюкоза, мочевины, креатинин, билирубин, АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза), ЭКГ, УЗИ лимфатических узлов шеи, рентгенография грудной клетки, фиброскопия полости рта и ротоглотки.

Пациент после введения препарата находился в затененной палате с изоляцией от прямого и рассеянного солнечного света в течение 24 ч во избежание фототоксических реакций со стороны кожи. Препарат АС в виде раствора (1,5 г АС, растворенного в 200 мл негазированной питьевой воды) в дозе 20–30 мг/кг массы тела больного, приготовленного непосредственно перед приемом, вводили перорально. 23 пациентам препарат вводили в дозе 20 мг/кг, 5 пациентам — в дозе 30 мг/кг. Спектрально-флюоресцентное обследование больных проводилось до введения, через 1, 2, 3, 4 и 24 ч после введения АС. ФД проводилась через 4 ч после приема раствора с препаратом. В качестве источника излучения, возбуждающего флюоресценцию ПпIX в тканях, использовались:

— источники оптического излучения ЦЕНИ ИОФ РАН (Москва, Россия) и/или флюоресцентный бронхоскоп D-Light/AF System (Karl Storz GmbH, Германия) с длиной волны в диапазоне от 380 до 442 нм с получением двухмерного флюоресцентного изображения;

— лазерная электронно-спектральная установка ЛЭСА-01-Биоспек (ЗАО «Биоспек», Россия) для регистрации спектров флюоресценции и определения флюоресцентной контрастности на границе опухоли/норма — гелий-неоновый лазер, длина волны 633 нм, выходная мощность 1–10 мВт;

— светодиодное видеофлюоресцентное устройство УФФ 630-67501-Биоспек.

Основными компонентами ЛЭСА-01-Биоспек кроме источника лазерного излучения являются спектраллизатор для приема флюоресценции и рассеянного лазерного излучения и его последующего анализа и волоконно-оптическая система для подведения лазерного излучения к исследуемому объекту и передачи получаемого сигнала на спектраллизатор [1]. Система светофильтров обеспечивает регистрацию сигналов флюоресценции и рассеянного лазерного излучения одновременно в диапазоне 630–750 нм. Спектрограф вместе с электроникой для сбора данных смонтирован на плате, встроенной в компьютер. Приемный сигнал оцифровывается, передается в память компьютера и изображается на дисплее в реальном масштабе времени. Получаемая информация обрабатывается специализированной программой компьютера. Такая относительно простая система позволяет получать спектр диффузного отражения и флюоресценции с частотой 0,1 с, что достаточно для мониторинга в реальном масштабе времени. Определялись спектр с анализом его по форме и амплитуде сигнала и интегральная интенсивность флюоресценции АС в разных точках опухоли и прилегающих к ней тканей, флюоресцентные границы опухоли, а также оценивалась интенсивность флюоресценции в нормальной слизистой оболочке полости рта, нижней губы, коже руки и лица пациентов. Определялось также соотношение между значениями интенсивности флюоресценции в опухоли и нормальной ткани, которое благодаря линейной связи между интенсивностью флюоресценции и концентрацией фотосенсибилизатора характеризует селективность накопления в опухолевой ткани. Линейность связи между интенсивностью флюоресценции и концентрацией ПпIX была выявлена при проведении предварительных спектрометрических измерений стандартов, содержащих различные концентрации препарата, и фантомных измерений этих образцов в моделях сред.

Переносимость и токсичность препарата АС и ФД с использованием АС определяли на основе клинического наблюдения за больными и оценки результатов лабораторного изучения показателей крови, мочи в динамике после введения АС и проведения ФД. Клиническое обследование больных включало оценку общего состояния больного, параметров гемодинамики (АД, пульс), функции внешнего дыхания (ЧДД), температуры тела до введения препарата, через 1 и 4 ч после введения Р. Определялся внешний вид кожи пациента и слизистых оболочек полости рта, фиксировалось появление аллергических, болевых реакций, токсических проявлений со стороны желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота) через 1, 4 и 24 ч после введения АС.

На основании первичных данных произведен статистический анализ показателей с использованием стандартных методов статистической обработки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При введении препарата реакций отмечено не было. При клиническом наблюдении за пациентами не было выявлено изменений их общего самочувствия, АД, ЧСС, ЧДД, температуры тела через 1, 4 и 24 ч после введения препарата и после проведения ФД. Не наблюдалось развития аллергических реакций, токсических проявлений со стороны желудочно-кишечного тракта в течение тех же сроков наблюдения. У пациентов также не было отмечено других проявлений общих местных и токсических реакций. Динамическое наблюдение за показателями крови и мочи показало отсутствие гемато-, нефро- и гепатотоксичности препарата АС и ФД с его использованием. В целом в группе из 28 больных колебания параметров биохимического анализа крови, мочи не превышали границ физиологической нормы, не было выявлено статистически значимых различий. Выполнение ФД не сопровождалось какими-либо неприятными ощущениями. Фототоксические реакции кожи лица и открытых участков кожи не обнаружены у пациентов, учитывая, что, находясь в стационаре, они соблюдали в течение 24 ч после введения АС ограниченный световой режим. При спектрометрии кожи лица и рук пациентов через 4 ч после приема препарата отмечалось достоверное увеличение интенсивности флюоресценции по сравнению с исходным фоновым, которое могло бы при нарушении светового режима вызвать фототоксические реакции кожи открытых участков тела. Достоверных отличий интенсивности флюоресценции кожи и слизистых оболочек полости рта, нижней губы у больных, принимавших АС в дозах 20 и 30 мг/кг массы тела соответственно, не выявлено. Интенсивность флюоресценции в опухоли, окружающей коже, слизистой оболочке полости рта нарастала в течение 3 ч после введения препарата, достигая максимума через 3–4 ч после введения АС.

При ФД у 28 больных раком слизистой оболочки полости рта наблюдалась флюоресценция всех визуально определяемых очагов. Визуализация опухоли получена у всех больных, контрастность колебалась в пределах 2,2–5,9 раза, при этом достоверных отличий в значениях контрастности при приеме препарата в дозах 20 и 30 мг/кг массы тела не выявлено. При наличии крупных новообразований более 1 см в диаметре отмечалась существенная неоднородность распределения препарата в опухоли (рис. 1, 2). Выраженное повышение интенсивности флюоресценции отмечалось в зонах эрозий и изъязвленных поверхностей. Флюоресценция у 9 больных раком слизистой оболочки полости рта (32,1 % общего числа больных) совпадала с клинически определяемыми (визуально и пальпаторно) границами опухоли, а у 17 больных (67,9 %) зона флюоресценции превышала видимые границы на величину от 0,3–0,5 до 4 см. Зона флюоресценции превышала видимые границы новообразования у всех больных в случаях язвенного или инфильтративного характера роста опухоли. Дополнительные очаги флюоресценции были выявлены у 4 (14,3 %) больных (об-

щее количество 7), при этом морфологически верифицирована опухоль в 6 (85,7 %) случаях, в одной из зон флюоресценции выявлен при цитологическом исследовании гиперкератоз слизистой оболочки. В дальнейшем лечение пациентов (химиолучевое, криодеструкция, хирургическое, фотодинамическое) проводилось с учетом данных ФД.

В качестве клинического примера приведем результаты ФД с препаратом АС у больного П., находившегося на стационарном лечении в отделении опухолей головы и шеи НИИКО ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН с диагнозом первично-множественный метастатический рак. Рак слизистой оболочки дна полости рта $T_3N_0M_0$, состояние после комплексного лечения (1982 г.). Рак кожи правой щеки, состояние после криодеструкции (1984 г.). Рак левой небной миндалины $T_4N_0M_0$, состояние после химиолучевого лечения (1995 г.). Рак кожи верхней губы, состояние после криодеструкции (1996 г.). Рак слизистой оболочки нижней челюсти, дна полости рта справа $T_4N_0M_0$, состояние после ФДТ и ПХТ. При поступлении в отделение шея деформирована, слева рубец после фасциально-фулярного иссечения клетчатки, регионарные лимфатические узлы не пальпируются. На дне слизистой оболочки полости рта справа и слева от срединной линии определяются опухолевые инфильтраты размерами до 2,5×2,0 см, опухолевая инфильтрация средней и задней трети слизистой оболочки нижней челюсти справа. На коже справа в проекции челюсти гнойное расплавление кожи размером до 1×2,0 см с воспалительной инфильтрацией.

Проведена ФД с АС (доза 30 мг/кг массы тела больного) через 4 ч после перорального приема препарата с исследованием на установке ЛЭСА-01-Биоспек, получены также двухмерные флюоресцентные изображения с помощью лазера (ЦЕНИ ИОФ РАН, длина волны 440 нм). Выявлены зоны флюоресценции на слизистой оболочке нижней челюсти, дне полости рта справа и 1 дополнительная зона флюоресценции на слизистой дна полости рта слева размером до 3,0×2,7 см. Все зоны существенно превышали клинически определяемые границы опухоли на 2–3 см, также выявлена дополнительная зона флюоресценции на коже, частично совпадающая с зоной гнойного расплавления кожи и превышающая ее на 2,0 и 1,5 см в разных направлениях. Спектры флюоресценции и гистограммы концентрации препарата в тканях больного представлены на рис. 1 и 2. Отмечалась выраженная неоднородность содержания препарата в опухоли. При цитологическом исследовании кожи и мягких тканей дна полости рта как в основных, так и в зонах дополнительной флюоресценции выявлен плоскоклеточный ороговевающий рак. При рентгенографии — краевая деструкция альвеолярного отростка и тела нижней челюсти, справа — врастание опухоли. В дальнейшем тактика лечения больного определена с учетом данных ФД.

Вторым клиническим примером высокой чувствительности и специфичности метода ФД с препаратом

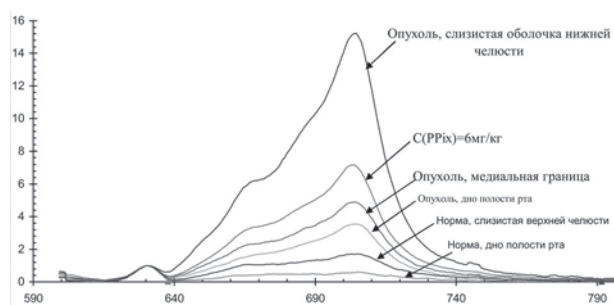


Рис. 1. Спектры флюоресценции Аласенс в тканях больного П. через 4 ч после введения препарата в дозе 20 мг/кг и в стандартном образце, содержащем 6 мг/кг ПпIX

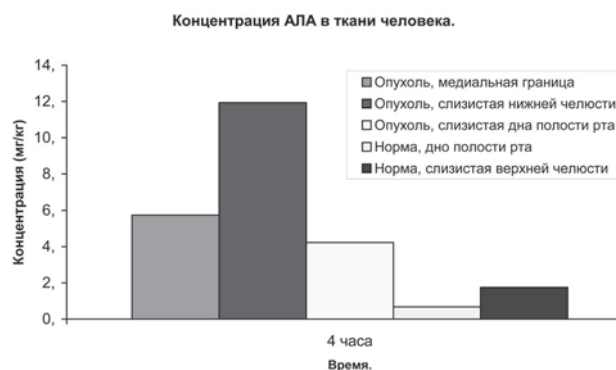


Рис. 2. Концентрация препарата Аласенс в тканях пациента П. через 4 ч после введения препарата в дозе 20 мг/кг

АС может служить история болезни пациента с Р., 57 лет, поступившего в отделение с диагнозом рак гортани, состояние после хирургического лечения, рубцовый стеноз. При осмотре на боковой поверхности слизистой языка обнаружена зона лейкоплакии размером до 1,2×2,0 см. При цитологическом исследовании — дискариоз и атипия отдельных ядер. Проведена флюоресцентная диагностика с АС (доза 20 мг/кг массы тела больного) через 4 ч после перорального приема препарата. Проведено исследование на установке ЛЭСА-01-Биоспек и получены двухмерные флюоресцентные изображения с помощью лазера (ЦЕНИ ИОФ РАН, длина волны 440 нм). Выявлена зона флюоресценции на слизистой оболочке языка, частично совпадающая с клинически определяемой зоной лейкоплакии и превышающая границы образования на 0,3–0,5 см в направлении кверху и 1,2 см в направлении кзади. Отмечена выраженная неоднородность содержания препарата в зоне флюоресценции по данным спектрометрии. Интенсивность флюоресценции нижней части образования была незначительно выше, чем окружающей слизистой оболочки, коэффициент контрастности 1,4–1,6 в различных участках, в т. ч. в зоне взятой ранее биопсии. Интенсивность флюоресценции верхней части образования была существенно выше, чем окружающей слизистой оболочки и нижней части образования, коэффициент контрастности 2,8–3,1 в различных

участках. При прицельной биопсии верхнего участка в зоне более интенсивной флюоресценции образования и последующем гистологическом исследовании выявлен плоскоклеточный ороговевающий рак. В дальнейшем тактика лечения больного определена с учетом данных ФД и распространенности опухоли.

Таким образом, проведенное нами исследование позволило отметить высокую чувствительность (100 %) и специфичность (96,4 %) метода ФД с препаратом АС, позволяющие в ряде случаев провести дифференциальную диагностику у больного на основании различий в интенсивности флюоресценции. Комбинация анализа флюоресцентного изображения опухоли и спектрометрического исследования ее позволяет существенно объективизировать результаты диагностики, т. к. спектрометрия позволяет получать количественные характеристики интенсивности флюоресценции, которые могут служить дифференциально-диагностическим критерием. Как известно из данных литературы [2, 3, 7, 12], ФД обладает высокой чувствительностью у больных раком мочевого пузыря, кожи, однако часто выявляется ложноположительная флюоресценция в зонах воспаления, биопсии, дисплазии [3, 12], что снижает специфичность диагностики. В нашей группе больных ложноположительная флюоресценция была выявлена только у описанного выше пациента в зоне лейкоплакии, хотя по данным спектрометрии интенсивность флюоресценции в зонах лейкоплакии и опухолевого роста достоверно отличалась. Ограниченность обследованной группы пациентов не позволяет нам в настоящее время делать заключение о численном дифференциально-диагностическом значении критерия контрастности, однако мы полагаем, что при значении коэффициента контрастности менее 2, вероятнее всего, имеют место предопухолевые изменения слизистой оболочки полости рта или другая сопутствующая патология, а чем выше коэффициент контрастности, тем достовернее может быть диагностирован рак слизистой оболочки полости рта.

ВЫВОДЫ

Проведение флюоресцентной диагностики с препаратом Аласенс позволяет получать диагностически значимую информацию у больных злокачественными новообразованиями слизистой оболочки полости рта, определять границы распространения процесса, часто существенно превышающие клинически определяемые, выявлять у больных первично-множественным раком и распространенными рецидивами субклинические очаги. ФД с АС характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Препарат АС обладает значительной флюоресцентной активностью и не обладает токсичностью, за исключением кратковременного повышения чувствительности кожи к прямому солнечному свету.

Клинические испытания препарата Аласенс (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва, Россия) для флюо-

ресцентной диагностики онкологических заболеваний проводились в рамках совместной Научно-технической программы Правительства Москвы, Министерства науки и технологий РФ «Разработка и внедрение в медицинскую практику новых методов и средств диагностики и лечения онкологических заболеваний».

ЛИТЕРАТУРА

1. Лоценов В. Б., Стратонников А. А., Волкова А. И., Прохоров А. М. Портативная спектроскопическая система для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля за фотодинамической терапией // Рос. хим. журн. — 1998. — Т. XLII, № 5. — С. 50–53.
2. Вакуловская Е. Г., Шенталь В. В. Фотодинамическая терапия и флюоресцентная диагностика у больных раком кожи головы и шеи // Матер. 6-й ежегодной Рос. онкол. конф. — М., 2002. — С. 44–45.
3. Baumgarthner R. Latest results of 5-ALA-based fluorescence diagnosis and other medical disciplines // Proc. SPIE. — Vol. 3563. — 1998. — P. 90–99.
4. Bech O., Berg K., Moan J. The pH dependency of protoporphyrin IX formation in cells incubated with 5-aminolevulinic acid // Cancer Lett. — 1997. — Vol. 113. — P. 25–29.
5. Berg K., Anholt H., Bech O. et al. The influence of iron helators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic acid-treated cells // Br. J. Cancer. — 1996. — Vol. 74. — P. 688–697.
6. Gibson S. L., Havens J. J., Foster T. H. et al. Time-dependent intracellular accumulation of delta-aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity // J. Photochem. Photobiol. — 1997. — Vol. 65. — P. 416–421.
7. Kennedy J. C., Pottier R. H. Endogenous Protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy // J. Photochem. Photobiol. — 1992. — Vol. 14. — P. 275.
8. Malik Z. ALA-PDT dependence on up and down regulation of the PBGD gene in cancer cells // 10th Congress of the European Society for Photobiology. — Vienna, Austria, 2003. Abstract book. — P. 64.
9. Rick K., Sroka R., Stepp H., Kriegmair M. et al. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood // J. Photochem. Photobiol. — 1997. — Vol. 40(3). — P. 313–319.
10. Rud E., Berg K. Characterization of the cellular uptake of 5-aminolevulinic acid // Proc. SPIE. — 1998. — Vol. 3563. — P. 28–37.
11. Steinbach P., Weingandt H., Baumgarthner R. et al. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid // J. Photochem. Photobiol. — 1995. — Vol. 62(5). — P. 887–895.
12. Stepp H. Is fluorescence diagnosis with 5-ALA a breakthrough in intra-operative cancer detection? // 10th Congress of the European Society for Photobiology. — Vienna, Austria, 2003. Abstract book. — P. 56.