

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРАЛЬНОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЖЕЛУДКА С ПРЕПАРАТОМ АЛАСЕНС (5-АМИНОЛЕВУЛИНОВАЯ КИСЛОТА)

Левкин В.В., Харнас С.С., Заводнов В.Я., Охотникова Н.Л., Лощенов В.Б.,
 Волкова А.И., Агафонов В.В., Патока Е.Ю., Мелентьев А.А.

Клиника Факультетской Хирургии им. Н.Н. Бурденко,
 ПМГМУ им. И.М. Сеченова, ЦЕНИ ИОФ РАН

УДК: 616.33-006.6-073.584.001.6

Резюме

Проанализированы результаты лазерной спектральной флюоресцентной диагностики (ФД) у 144 пациентов с различными заболеваниями желудка при помощи препарата Аласенс.

Ключевые слова: рак желудка, 5-аминолевулиновая кислота (Аласенс), лазерная флюоресценция, лазерная видеофлюоресценция.

IMPROVING THE METHODS OF LASER-INDUCED FLUORESCENCE DIAGNOSIS OF GASTRIC CANCER WITH THE ALASENS PREPARATION (5-AMINOLEVULINIC ACID)

Levkin V.V., Harnas S.S., Zavodnov V.Ja., Okhotnikova N.L., Loschenov V.B., Volkova A.I., Agafonov V.V., Potoka E.Yu., Melentiev A.A.

The results of laser-induced spectral fluorescence diagnosis (FD) have been analyzed by the Alasens preparation in 144 patients with various diseases of the stomach.

Keywords: gastric cancer, 5-aminolevulinic acid (Alasens), laser-induced fluorescence, laser-induced video fluorescence.

Введение

В последние десятилетия во многих странах мира, включая Россию, наметилась отчетливая тенденция к снижению частоты рака желудка (РЖ). Однако данная нозология продолжает занимать лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний и является одной из наиболее частых причин смерти от злокачественных новообразований [1, 2].

Хорошо известно, что результаты лечения РЖ зависят, прежде всего, от его своевременной диагностики. Общепринятым в первичной диагностике рака желудка является применение рентгенологического и эндоскопического исследований верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Достоинства методов общеизвестны и неоспоримы. В то же время хорошо известны и их недостатки – сложности в выявлении ранних форма рака, а также опухолей с эндофитным подслизистым характером роста. Относительно высока частота как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов при биопсии диктует необходимость повторных эндоскопических исследований и биопсий [3].

В настоящее время одним из перспективных методов ранней диагностики злокачественных опухолей, в том числе и рака желудка, является метод флюоресцентной лазерной спектроскопии [4, 5]. Этот метод позволяет повысить эффективность стандартного эндоскопического исследования при раке, и оказался настолько информативным, что получил название «оптической биопсии».

Различают аутофлюоресценцию, т.е. флюоресценцию эндогенных порфиринов, концентрация которых в опухолевых клетках выше, чем в нормальных, и вторичную флюоресценцию, т.е. флюоресценцию специальных

экзогенных фотосенсибилизаторов, тропных к опухолевым клеткам. Из фотосенсибилизаторов, применяемых для этой цели, следует отметить флюоресцин, флюоренат, а также производные гематопорфирина (фотофрин-2, фотосан, фотогем). Флюоресцентная диагностика злокачественных опухолей с этими препаратами высокоэффективна. Однако такая методика имеет ряд недостатков. Во-первых, применяемое в большинстве случаев излучение с длиной волны от 300 до 550 нм не проникает в ткани на достаточную глубину, что в ряде наблюдений не позволяет диагностировать эндофитный рак. Оптимальной же является длина волны 600–1200 нм (глубина проникновения до 3 мм). Во-вторых, фотосенсибилизаторы накапливаются не только в опухоли, но и в коже и видимых слизистых, где задерживаются длительное время. Это требует соблюдения так называемого «светового режима», при нарушении которого возникают фотодерматиты. К недостаткам регистрации аутофлюоресценции относится прежде всего невысокий коэффициент контрастности, необходимость высокоточного дорогостоящего оборудования.

Новые возможности метод лазерной флюоресцентной спектроскопии получил с разработкой 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). Это соединение не является фотосенсибилизатором, но индуцирует в клетках опухоли синтез и накопление фотоактивного протопорфирина IX. Результатом этого является более интенсивная флюоресценция злокачественной опухоли относительно окружающих тканей, что обеспечивает более высокую, по сравнению с аутофлюоресценцией, диагностическую эффективность метода. Более того, интенсивность АЛК-индуцированной флюоресценции столь высока, что ее

можно регистрировать в опухоли не только с помощью спектроанализаторов, но и с помощью специальных высокочувствительных флюоресцентных эндоскопов, что открывает большие перспективы для клинической практики.

Цель: сравнить эффективность флюоресцентной диагностики заболеваний желудка при пероральном и сублингвальном приеме препарата Аласенс.

Материал и методы

Исследования проводили в Клинике факультетской хирургии им Н.Н. Бурденко на базе хирургических отделений, межклинического эндоскопического отделения ГОУ ВПО «ПМГМУ им И.М. Сеченова» в период с 2003 по 2008 гг. Исследование проводили с использованием препарата Аласенс, созданного на основе 5-аминолевулиновой кислоты (производство ГНЦ НИОПИК). Основную группу составили 82 пациентов с различными заболеваниями желудка, которые принимали Аласенс сублингвально в виде сиропа в дозе 150–250 мг (2–3 мг/кг веса) за 1–2 часа до исследования. У 42 больных основной группы диагностирован рак желудка I–IV стадии, у 32 – язвенная болезнь желудка, полип желудка у 4, анатомозит, лейомиома желудка по 2. Группу сравнения составили 68 больных с различными заболеваниями желудка, которые принимали Аласенс перорально, предварительно растворив в 200 мл воды (10–20 мг/кг веса) за 1,5–2 часа до исследования. Однако у 6 пациентов отмечено нарушение всасывания препарата Аласенс (тотальное поражение желудка, прием де-нола). В связи с чем, фактический расчет показателей произведен у 62 пациентов. Кроме того, не менее чем за 2 суток отменяли антацидные и антисекреторные препараты. По нозологическим формам больные в этой группе распределились следующим образом: рак желудка – 37 пациента (59,7%), язвенная болезнь желудка – 19 (30,6%), хронический гастрит – 6 человек (9,7%). Женщин было – 62 (43%), мужчин – 84 (57%), возраст больных от 26 до 81 лет, в среднем $55,8 \pm 8,2$ года. Система для исследования спектральной флюоресценции ЛЭСА 01 состояла из гелий-неонового лазера (длина волны – 632,8 нм), портативного многоканального лазерного спектроанализатора (совместное производство Биоспек Россия и ЦЕНИ ИОФ РАН), и специального многоволоконного оптического катетера (рис. 1). Предварительно перед ЭГДС со спектроскопией измеряли спектры флюоресценции кожи руки и слизистой губы пациента. Затем проводили обычное эндоскопическое исследование, в результате которого определяли подозрительные на опухоль участки слизистой. Далее диагностический катетер проводили через биопсийный канал эндоскопа к исследуемой поверхности до легкого контакта с ней. Измерение проводили в центре патологически измененного участка, в области его края и на расстоянии 1–2 см от края в реальном масштабе времени. Если интенсивность флюоресценции АЛА-индуцированного протопорфирина IX (PPIX) в какой-либо точке превышала аналогичное значение в визуально не-

измененной слизистой (норма) в два и более раза, из этой точки брали биопсию. Токсических или аллергических реакций на введение препарата Аласенс не было, однако у одного пациента с пероральным приемом препарата (доза 20 мг/кг) были отмечены явления фотодерматоза и аллергического конъюнктивита, которые через два дня купировались на фоне приема антигистаминных средств без последствий.

Результаты

Диагноз «рак желудка» был установлен до проведения флюоресцентной диагностики (ФД) только 21 (50%) основной группы и 18 (48,9%) пациентам группы сравнения. Впоследствии диагноз был подтвержден как данными исследования интенсивности флюоресценции- PPIX (коэффициент контрастности составил соответственно 2,0–14,8 и 2,1–18,6), так данными гистологического исследования.

Из 32 пациентов основной группы и 31 пациентов группы сравнения с предварительным диагнозом «язвенная болезнь желудка», у соответственно 14 (23%) и 12 (19,5%), из них на основании ФД был заподозрен рак желудка. В 1–2 точках края изъязвления определена высокая интенсивность флюоресценции (коэффициент контрастности 2,1–9,6). Проведена прицельная биопсия слизистой в этих точках. При гистологическом исследовании взятого материала подтвержден диагноз «рак желудка», причем у четырех пациентов выявлен «ранний» рак *in situ*. У 18 пациентов основной и 15 пациентов группы сравнения, данные ФД (коэффициент контрастности 0,3–1,7) совпали с данными гистологического исследования, диагноз «язвенная болезнь желудка» был подтвержден. У двух пациентов с пероральным приемом препарата выявлена низкая интенсивность флюоресценции протопорфирина IX (0,7 и 0,9), по результатам гистологического исследования диагностирован хронический гастрит.

У 7 пациентов основной группы и 6 пациентов группы сравнения при ЭГДС обнаружены, так называемые атипичные, подозрительные на рак, участки слизистой. При проведении ФД у всех 7 пациентов с сублингвальным приемом препарата Аласенс, и у четырех из 6 пациентов группы сравнения выявлена высокая интенсивность флюоресценции АЛА-индуцированного PPIX (коэффициент контрастности 2,1–8,0) и так же проведена прицельная биопсия слизистой желудка, установлен диагноз «рак желудка». Аналогично у 2 больных полипом желудка с пероральным приемом препарата Аласенс (коэффициент контрастности 3,3) обнаружен по результатам гистологического исследования рак *in situ*.

У пяти пациентов основной группы и у четырех пациентов группы сравнения с предварительным диагнозом «рак желудка» (по данным рентгенологического исследования и ЭГДС – изменение рельефа слизистой) после проведения спектроскопии, диагноз был отвергнут, что подтверждено данными последующего морфологиче-

ского исследования. Установлены диагнозы анастомозит (2 пациента), полип желудка (2), лейомиома (1) – основная группа; хронический гастрит (4 пациента) группа сравнения.

В то же время у 6 пациентов основной группы и у 5 группы сравнения в 1–2 точках исследуемого участка слизистой желудка определялась высокая интенсивность флюоресценции АЛА-индуцированного РР'IX, хотя визуально эти участки не вызывали подозрений в отношении опухолевого поражения. По результатам гистологического исследования опухоль в этих участках не выявлена, однако, у большинства (9) из этих 11 пациентов обнаружена выраженная воспалительная реакция.

О повышенной генерации АЛА-индуцированного РР'IX в зоне воспаления сообщают ряд зарубежных авторов [6, 7]. Однако расхождение между результатами флюоресценции и данными морфологического исследования могут быть связаны с несовершенством методики взятия биопсии. Дело в том, что для флюоресцентного исследования использовали одноканальный эндоскоп, и биопсию, возможно, брали не точно из точек с высокой флюоресценцией, а из прилежащих областей.

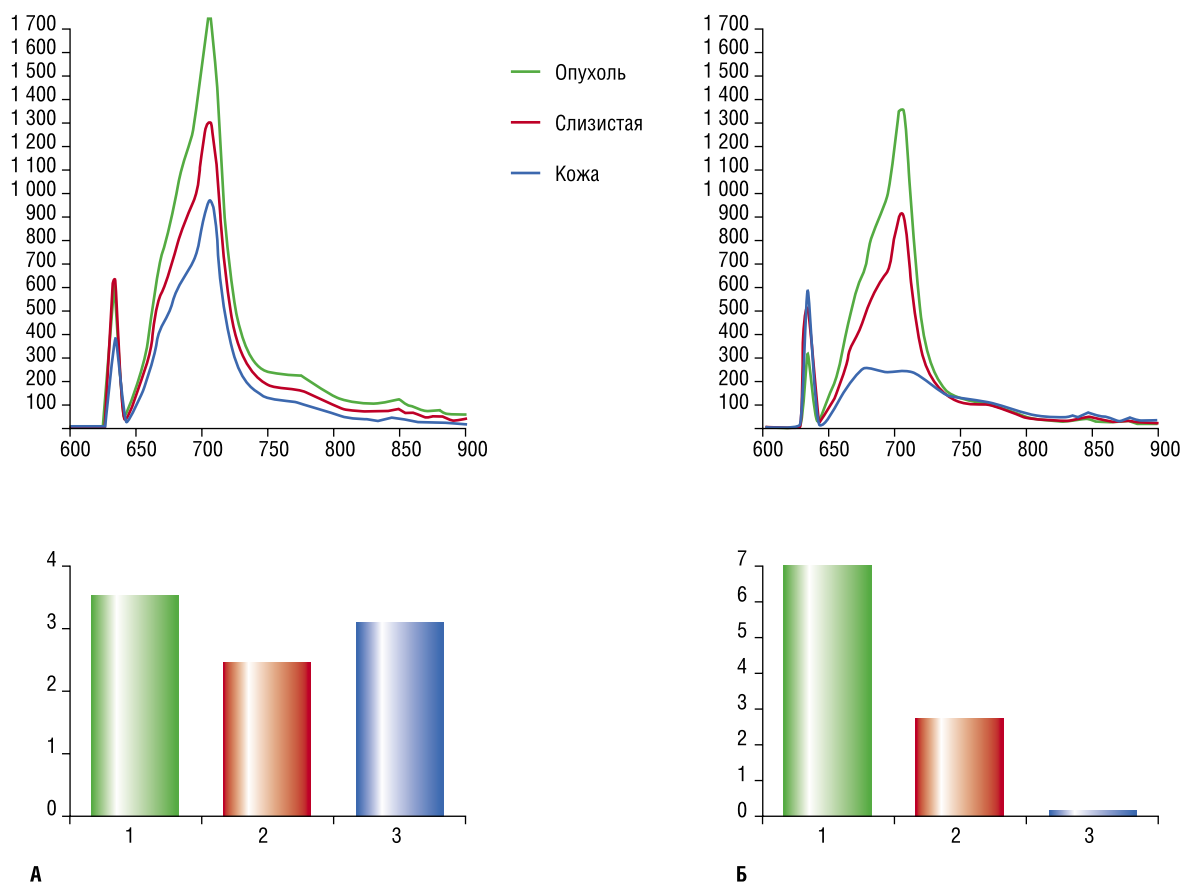
Учитывая сказанное, эти пациенты могут быть отнесены не к ложноположительным результатам, а к

группе риска. Пациентам этой группы требуется профилактическое эндоскопическое исследование не реже одного раза в год.

По одному наблюдению в каждой группе при ФД коэффициент контрастности составил 1,1, однако морфологическое исследование выявило высококодифференцированную аденокарциному. Эти результаты можно отнести к ложноотрицательным.

В целом коэффициент контрастности составил в основной группе больных раком желудка $3,9 \pm 0,4$. При 1 стадии – $3,94 \pm 0,02$, II – $3,75 \pm 0,03$, III – $4,42 \pm 0,03$, IV – $3,4 \pm 0,02$. В группе сравнения в целом $4,55 \pm 0,2$. При 1 стадии – $3,94 \pm 0,04$, II – $5,19 \pm 0,02$, III – $3,79 \pm 0,09$, IV – $6,13 \pm 0,2$. Разница между показателями КД контрастности внутри групп по стадиям заболевания, также как и между группами в целом статистически не достоверны.

У больных язвенной болезнью коэффициент контрастности составил в основной группе – $1,41 \pm 0,76$, группе сравнения – $1,08 \pm 0,7$, при хроническом гастрите соответственно – $0,98 \pm 0,9$. Разница между значениями коэффициентов контрастности при злокачественных и доброкачественных заболеваниях в обеих группах статистически достоверна ($p \leq 0,05$). Уровень КД более 1,8 принят в качестве критерия злокачественности в первой группе, более 1,7 во второй. Корреляции между



Сравнительные результаты флюоресценции (спектрограмма и гистограмма) при пероральном (А) и сублингвальном (Б) приеме препарата Аласенс.

уровнем КД и гистологической структурой опухоли не выявлено. Чувствительность метода диагностики с исследованием Аласенс-индуцированной флюоресценции при сублингвальном и пероральном приеме составила соответственно 96% и 96%, специфичность соответственно – 80% и 78%.

Обсуждение

Несмотря на бурное развитие медицинских технологий в целом ряде случаев провести дифференциальный диагноз между доброкачественными и злокачественными изменениями в желудке бывает не просто. Разработанный метод флюоресцентной диагностики заболеваний желудка на основе лазерно-спектрального определения содержания Аласенс-индуцированного протопорфирина IX позволяет проводить дифференциальный экспресс-диагноз заболеваний желудка («оптическая биопсия»). Осуществлять раннюю диагностику рака и определять наличие предраковых состояний, в перспективе – выделить групп риска. Первый опыт полученный нами доказал свою эффективность на практике. Из 11 пациентов группы риска (в которую входят пациенты с высоким коэффициентом контрастности и отсутствием гистологического подтверждения злокачественности процесса) у 3 через 1–1,5 года было получено морфологическое подтверждение рака желудка. К несомненным достоинствам метода следует отнести то, что процедура эндоскопической флюоресцентной диагностики лишь незначительно удлиняет время ЭГДС (в отличие от хромоэндоскопии), а заключение о характере патологического процесса может быть сформулировано сразу в процессе проведения гастроскопии. Комплекс аппаратуры, применяемой в настоящее время для проведения ФД – достаточно компактный (портативный) и мобильный, что позволяет осуществлять его доставку в эндоскопический кабинет. Дополнительных затрат времени для специального монтажа комплекса и подготовки его к работе в условиях кабинета не требуется. Высокая избирательность накопления Аласенс-индуцированного РР1Х злокачественными новообразованиями, делает контрастность накопления в патологически измененной ткани выше, что облегчает интерпретацию результатов, регистрируемых спектроанализатором, не требует специальных дорогостоящих усилителей оптического сигнала, необходимых для регистрации аутофлюоресценции. Кроме того, низкоинтенсивное лазерное излучение малой мощности не несет лучевой и любой другой повреждающей нагрузки, в связи с чем, при работе со спектроскопической системой не требуется дополнительных средств специальной защиты пациента и персонала. Поэтому флюоресцентная эндоскопия как метод является минимально инвазивным и безопасным. Быстрое выведение из организма Аласенса уменьшает вероятность развития токсических и световых реакций, и делает его препаратом выбора для флюоресцентной диагностики.

В то же время стандартный метод введения препарата Аласенс при раке желудка имеет некоторые недостатки. В частности, несмотря на быстрое выведение препарата из организма, в отдельных случаях все же возможно развитие фототоксических реакций, что и было отмечено у одного из наших пациентов (доза 20 мг/кг).

Как продемонстрировало наше исследование, контрастность накопления Аласенс-индуцированного протопорфирина IX в слизистой при сублингвальном приеме была достаточной для дифференциальной диагностики рака желудка и не отличалась от результатов при пероральном приеме. Это позволило нам в целом сохранить критерии диагностики и при сублингвальном приеме, лишь слегка скорректировав их. Кроме того, сублингвальный прием препарата Аласенса имеет ряд преимуществ перед пероральным приемом. Доза препарата уменьшается в 7–10 раз, что почти полностью снижает вероятность развития фототоксических реакций (в нашем исследовании подобных случаев отмечено не было). При проведении лазерной эндоскопической спектроскопии не отмечается разности в интенсивности флюоресценции в различных отделах желудка. В то время как при пероральном приеме максимальные результаты зафиксированы в антральном отделе, что в ряде случаев затрудняло интерпретацию полученных от неизменной ткани результатов. Кроме того, пероральный прием препарата Аласенс у больных с тотальным поражением рака желудка и приемом антацидов может сопровождаться нарушением всасывания последнего.

Таким образом, метод ФД показан в сложных диагностических ситуациях при подозрении на рак желудка и в силу своей простоты и безопасности должен стать стандартным этапом эндоскопического исследования. Противопоказаниями являются выраженная аллергическая настроенность организма и общепринятые противопоказания к проведению эндоскопических исследований.

Все вышеизложенное, позволяет рекомендовать метод лазерной спектральной ФД с сублингвальным приемом препарата Аласенс, наряду с традиционным пероральным использованием, как экспресс-метод диагностики, в том числе ранней диагностики, злокачественных заболеваний желудка.

Выводы

1. Исследование флюоресценции Ала-индуцированного РР1Х является простой, эффективной и безопасной диагностической процедурой при раке желудка: чувствительность – 96% (вне зависимости от способа введения), специфичность 80% и 78% при сублингвальном и пероральном введении соответственно.
2. Сублингвальный прием препарата Аласенс предпочтительней, чем пероральный – распределение РР1Х в слизистой оболочке желудка более однородное, риск развития фотодерматита минимален.

Левкин В.В., Харнас С.С., Заводнов В.Я., Охотникова Н.Л., Лощенов В.Б., Волкова А.И., Агафонов В.В., Патока Е.Ю., Мелентьев А.А.
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ ЛАЗЕРНОЙ СПЕКТРАЛЬНОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ
РАКА ЖЕЛУДКА С ПРЕПАРАТОМ АЛАСЕНС (5-АМИНОЛЕВУЛИНОВАЯ КИСЛОТА)

Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2004 // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2006, Т. 17, № 3, С. 45–46.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2004 // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2006, Т. 17, № 3, 78 с.
3. Портной Л.М. Современная лучевая диагностика в гастроэнтерологии и гастроэнтероонкологии // М. Видар-М 218 с.
4. Полсачев В.И. Дооперационная флюоресцентная диагностика распространенности рака желудка. // Вестник хирургии, – 1989, – № 12, – С. 17–19.
5. Полсачев В.И. Флюоресцентный метод в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных заболеваний желудка // Вестник хирургии, – 1992, – № 1, – С. 95–97.
6. Hartmann A., Fuechsl K., Kriegmair M. et al. Frequent genetic alteration in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma // Am J Pathol, – 1999, – 154: 721–727.
7. Kennedy J.C., Marcus S.L., Potter R.H. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolaevulinic acid (ALA): mechanism and clinical results // J. Clin.Med.Surg. 1996 – 4.

Контактная информация

Кафедра факультетской хирургии № 1
лечебного факультета ГУВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова
Владимир Вениаминович Левкин
Тел.: +7 (903) 292-79-85
e-mail: doctor-levkin@mail.ru