

На правах рукописи

ЗЫКОВ Аркадий Евгеньевич

**ЛАЗЕРНАЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА И
ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ШЕЙКИ МАТКИ.**

14.01.17 – хирургия
14.01.12 - онкология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва -2011

Работа выполнена в ГОУ ВПО
«Московский государственный медико-стоматологический
университет» (ректор – Заслуженный врач РФ, д.м.н. профессор
О.О. Янушевич) Министерства здравоохранения и социального
развития РФ

Научные руководители:

член-корреспондент РАМН,
заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор

ЯРЕМА
Иван Васильевич

доктор медицинских наук,
профессор

ПОЛСАЧЕВ
Виктор Иосифович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

СТРАНАДКО
Евгений Филиппович

доктор медицинских наук,
профессор

СЕЛЬЧУК
Владимир Юрьевич

Ведущее учреждение – Первый Московский медицинский
университет им. И.М.Сеченова

Защита диссертации состоится «___»_____ 2011 года в
14-00 на заседании диссертационного совета Д208.041.02 при ГОУ
ВПО «Московский государственный медико-стоматологический
университет» Минздравсоцразвития РФ по адресу: 127473, г.
Москва, ул. Делегатская, д. 20/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета
по адресу: 125206, г. Москва, ул. Вучетича, д.10а.

Автореферат разослан «___»_____ 2011 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
старший научный сотрудник, к.м.н.

Данилевская О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность исследования. В последние годы пересматриваются взгляды на профилактику, диагностику и лечение гинекологического рака. Это обусловлено меняющимися представлениями об этиологии, патогенезе, биологических свойствах опухоли, клиническом течении заболевания. Постоянным объектом внимания онкогинекологии являются её «три кита», один из которых рак шейки матки (РШМ).

По данным Международного агентства по изучению рака ежегодно в мире регистрируется до 370000 новых заболеваний, а умирают от них до 190000 женщин. 78% РШМ приходится на развивающиеся страны, что составляет 15% всех злокачественных опухолей. В развитых странах РШМ составляет 4,4%. В общей структуре заболеваемости в России РШМ составляет 20% и занимает 6-е место, а среди репродуктивных органов – 3-е место после рака молочной железы и эндометрия. В России в последние 20 лет ежегодно регистрируют до 15000 впервые заболевших РШМ – 7% общего числа онкологических больных. При этом отмечается увеличение заболеваемости РШМ, особенно среди молодых женщин до 29 лет, что составляет около 7% в год. Это свидетельствует о недостаточном внимании, уделяемом лечению фоновых и предраковых заболеваний шейки матки указанной группы пациентов.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о различной потенциальной возможности трансформации предраковых заболеваний шейки матки в рак. Наибольшую роль в этом процессе играет осложнение папилломатоза – цервикальная интраэпителиальная неоплазия с переходом её в предрак – дисплазию III степени – (CIN-III). Несмотря на возможности современной медицины до половины больных поступают для лечения в стационар со значительным местно-регионарным распространением опухоли.

В настоящее время для диагностики фоновых процессов (дистрофии), предрака (дисплазии), преинвазивного и начальных форм инвазивного рака используются осмотр шейки матки невооруженным глазом, различные виды кольпоскопии, цитологическое и гистологическое исследования, рентгенологический метод, УЗИ – диагностика и радиоизотопное

исследование. Применение предложенных методов в комплексе позволяет повысить точность диагностики.

По всей видимости, имеющиеся методы исчерпали свои возможности. В связи с этим во многих странах, в том числе и в России, ведутся поиски новых методов диагностики фоновых, предраковых заболеваний и ранних форм рака шейки матки.

Одним из таких методов является флюоресцентная диагностика, позволяющая увеличить достоверность прицельной биопсии до такой степени, что сама стала называться «оптической биопсией». Феномен флюоресценции и фосфоресценции основывается на поглощении фотонов света маркером с последующим их переизлучением на большей длине волны. Найден альтернативный путь создания эффективных концентраций флюоресцирующих сложных веществ и фотосенсибилизаторов в опухоли, а именно, стимуляции организма к продукции эндогенных фотоактивных соединений путем экзогенного введения их предшественников (Fritsch С., 1999). Нами осуществлялась флюоресцентная диагностика с Флюоренатом (динатриевая соль Флюоресцеина) и Аласенсом (5-аминолевулиновая кислота). Использовалась достаточно чувствительная методика, позволяющая определить не только различия спектров опухолей, фоновых заболеваний, но и видеть люминесценцию опухоли.

Занимаясь вопросами диагностики фоновых заболеваний и рака шейки матки, мы не могли оставить без внимания лечение больных этой группы. Многообразие взглядов на проблему привело к возникновению различных методов. На сегодняшний день предложены различные модификации лечения предрака и раннего рака шейки матки, но полного удовлетворения от их применения нет. У 20% - 30% больных, получавших лечение теми или иными способами возникал рак (Бохман Я.В., 2002). Многообразие методов лечения раннего рака свидетельствует о том, что нет ни одного полностью радикального и щадящего метода. Все вышеперечисленное дает нам право думать о необходимости внедрения новых методов лечения предрака и раннего рака шейки матки. Одним из них является метод фотодинамической терапии (ФДТ). Хотя и не очень широко, он используется в онкогинекологии (Трушина О.И., Новикова Е.Г., Соколов В.В., 2008; Ishizuka M, Abe F, 2010; Ethirajan M.,2011). Проводимые ими

исследования указывают на эффективность данного метода лечения.

Для изучения возможностей ФДТ при патологии шейки матки нами был применен Фотосенс. В настоящее время именно в России фотосенсибилизаторы второго поколения прошли полные клинические испытания и разрешены к применению в фотодинамической терапии рака. Поэтому сведений по результатам лечения этими препаратами в мировой литературе нет.

Исследования выполнялись в лаборатории клинической и экспериментальной хирургии НИМСИ МГМСУ и на базе гинекологического и онкогинекологического отделений ГКБ №40.

Цель исследования

Определение возможности проведения флюоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ) у больных с предраком и ранним раком шейки матки.

Задачи клинических исследований.

1. На хорошо доступных длительному наблюдению моделях (рак кожи и вульвы) оценить и сравнить диагностические возможности Флюорената и Аласенса для ФД.

2. Изучить накопление выбранных препаратов при дисплазии-III и раке шейки матки.

3. Определить эффективность флюоресцентного метода в диагностике дисплазии-III и ранних форм рака шейки матки.

4. Оценить результаты фотодинамической терапии дисплазии-III и рака шейки матки с препаратом Фотосенс.

Научная новизна исследования.

Определены дозы и форма применения Аласенса для диагностики рака шейки матки.

Доказан высокий уровень накопления Фотосенса, достаточный для ФДТ ранних форм рака шейки матки.

Проведена оценка эффективности фотодинамической терапии с препаратом Фотосенс при лечении рака шейки матки на ранних стадиях заболевания.

Практическая значимость работы.

Разработана и внедрена в клиническую практику методика флюоресцентной спектрометрии грубой дисплазии (CIN-III) и раннего рака шейки матки с использованием отечественного препарата Аласенс.

Разработан метод фотодинамической терапии грубой дисплазии (CIN-III) и раннего рака шейки матки с применением отечественного фотосенсибилизатора второго поколения – Фотосенс.

Применен для диагностики доступный и простой в обращении отечественный диагностический флуориметр.

Положения, выносимые на защиту:

1. Вторичная флюоресценция на фоне хронических заболеваний шейки матки, подтвержденная спектрометрическими данными свидетельствует о наличии участков злокачественного перерождения.

2. Фотодинамическая терапия является альтернативным методом лечения предрака и раннего рака шейки матки.

Апробация

Материалы диссертации доложены на:

1. Научно-практической конференции кафедр гинекологии ММА им. И.М.Сеченова, госпитальной хирургии, оперативной хирургии и топографической анатомии МГМСУ, ГКБ №40, Москва.12.11.2004 г.

2. Научно-практической конференции кафедр госпитальной хирургии, оперативной хирургии и топографической анатомии МГМСУ, ГКБ №40, ГКБ №33 им. Профессора А.А.Остроумова. Москва.04.02.05г.

3. Научной конференции "Актуальные вопросы клинической медицины". МГМСУ. Москва. 26.05.2005г.

4. Научной конференции "Актуальные вопросы клинической медицины. От науки к практике" МГМСУ. Москва. 23.12.2010г.

5. Всероссийском конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика: проблемы и перспективы». Москва, 22-25 марта 2011г.

6. Научной конференции "Современные научные направления и актуальные клинические вопросы в акушерстве и гинекологии". Москва, 16-17 мая 2011г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано в печати 9 научных статей, из них 5 научных работ изданы в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты

диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук».

Личный вклад.

Автором была изучена первичная медицинская документация (251 история болезни), архивный материал (80 карт заболевания). В ходе сбора материала для диссертационной работы были освоены методики современного флюоресцентного метода диагностики и лечения РШМ. Проведено клинико-диагностическое обследование и лечение 251 пациентов раком кожи, вульвы и шейки матки, анализ результатов лечения. Подготовлена текстовая и иллюстративная часть работы.

Структура и объем диссертации

Работа оформлена на персональном компьютере в текстовом редакторе Microsoft Word. Параметры страницы: формат А4 (210x297); ориентация книжная; поля страницы: верхнее – 2,8; нижнее – 2,4; левое – 3; правое – 1,5; колонтитулы: верхний - 2; нижний – 1,25; нумерация страниц - по центру, вверху, нумерация начинается по порядку с титульного листа (цифру номера на нем не поставлена), на следующем листе ставилась цифра – 2 и т.д. шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, обычный. Выравнивание по ширине страницы. Абзацный отступ 1,27 (5 знаков). Интервал полуторный (ГОСТ 7.1-2003 и ГОСТ 2.105-05)

Текст размещен на одной стороне листа. Объем диссертации изложен на 149 страницах и состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, трех глав клинико – экспериментальных и клинических исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

Текст диссертации иллюстрирован 17 таблицами, 1 рисунком, 20 фотографиями, 4-я выписками из историй болезни.

Список литературы включает 96 отечественных и 183 иностранных источников.

Работа выполнена в лаборатории клинической и экспериментальной хирургии ОКМ НИМСИ (заведующий лабораторией доктор медицинских наук, профессор В.И. Полсачев), на кафедре госпитальной хирургии лечебного факультета (заведующий кафедрой член-корреспондент РАМН,

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор И.В. Ярема) Московского государственного медико-

стоматологического университета на базе ГКБ № 40 (главный врач доктор медицинских наук, профессор А.Я. Самохин).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

В работу включены 251 больная раком кожи, вульвы и шейки матки, которым проведены флюоресцентные исследования с целью оценки возможности диагностики предрака и раннего РШМ.

Все пациентки соответствовали критериям включения в протокол: возраст – старше 18 лет; верифицированный диагноз; объективно оцениваемые и измеряемые опухолевые очаги; артериальное давление не выше 170/110мм.рт.ст., уровень креатинина в плазме крови не выше 180 мкмоль/л, АЛТ, АСТ не выше 70 ед/л, общий билирубин не выше 30 мкмоль/л, гематологические показатели: количество лейкоцитов $> 3000/\text{мм}^3$, тромбоцитов $> 120000/\text{мм}^3$, гемоглобин 8 г/дл; отсутствие неподдающихся лечебному контролю сопутствующих заболеваний; способность пациента выполнять процедуру исследования и предоставить письменное информированное согласие в соответствии с местным законодательством.

Для оценки возможности влияния собственной флюоресценции на результаты вторичной были обследованы пациенты, поступавшие в стационар для фотодинамической терапии или хирургического лечения опухолей кожи, вульвы и заболеваний шейки матки (Табл.1).

Таблица 1.

Количество исследований собственной флюоресценции на длинах волн 420-480 нм и 630 нм (n=72).

Область спектрометрии n = 72/216	Рак кожи	рак вульвы	фоновые заб. ШМ	рак шейки матки
К-во больных	8	10	10	8
К-во спектрометрий 420-480 нм.	24	30	30	24
К-во больных	8	10	10	8
К-во спектрометрий 630 нм.	24	30	30	24

Суммарная площадь опухолевых образований в среднем составляла $3,5 \pm 1,4 \text{ см}^2$ в каждой подгруппе.

На втором этапе проводилась флюоресцентная лазерная спектрометрия с использованием в качестве флюоресцирующих соединений Флюорената и Аласенса. Указанные препараты пригодны для флюоресцентной диагностики в связи с высоким

уровнем переизлучения поглощенной световой энергии, что позволяет видеть флюоресценцию опухоли.

Так как для выбора оптимальных параметров для обследования, когда определяется максимальный контраст накопления препаратов в неизменной и пораженной ткани требуется многочасовое наблюдение при разработке методики, мы выбрали больных с доступными для этого локализациями опухолей. Рак шейки матки наиболее часто имеет структуру плоскоклеточного. Поэтому выбраны больные со схожими раками доступной поверхностной локализацией – рак кожи и рак вульвы (Табл. 2).

Таблица 2.

Количество исследований вторичной флюоресценции с Флюоренатом на длине волны 420-480 нм и Аласенсом на длине волны 630 нм.

Область спектрометрии n= 55 / 165	базальноклеточный рак кожи	плоскоклеточный рак кожи	плоскоклеточный рак вульвы
К-во больных	10	14	12
К-во спектрометров 420-480 нм.	30	42	36
К-во больных	5	6	8
К-во спектрометров 630 нм	15	18	24

Для выбора оптимальной дозы и способа введения Аласенса (АЛА) применялись растворы с концентрацией 10мг/кг; 20мг/кг и маевой 20% формой (Табл. 3).

Таблица 3.

Количество исследований вторичной флюоресценции с Аласенсом рака шейки матки

Область спектрометрии	РШМ АЛА 10 мг/кг	РШМ АЛА 20 мг/кг	РШМ АЛА мазь 20%
К-во больных	20	44	20
К-во спектрометров	100	220	100

на длине волны 630 нм. (n = 84 / 420).

Занимаясь диагностикой, мы не могли оставить без внимания лечение больных этой группы так, как ранее были получены хорошие результаты в лечении базальноклеточных и плоскоклеточных раков кожи. С этой целью использовался хорошо зарекомендовавший при лечении кожных раков фотосенсибилизатор второго поколения – Фотосенс (Табл. 4).

Средняя площадь патологического очага $2,0 \pm 1,2 \text{ см}^2$ (от 0,3 до 6,0 см^2).

Таблица 4.

Количество больных леченных методом ФДТ с различными поражениям шейки матки.

Область спектрометрии n = 40 / 400	CIN -III	РШМ (in situ)	CIN -III + РШМ
К-во больных	27	10	3
К-во спектрометрий (слизистая/опухоль)	135 /135	50/50	15/15

Исследуемые препараты, дозировка.

Флюоренат: водный раствор динатриевой соли флюоресцеина (10% - 5,0 мл), разведенный 50 мл негазированной питьевой водой принимался внутрь за 6 -12 часов до исследования.

Аласенс: препарат для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных опухолей производства ФГУП "ГНЦ "НИОПИК" (Россия). Не зависимо от дозы Аласенс растворяли непосредственно перед применением в 50 мл негазированной питьевой воды. Пациентка принимала внутрь раствор Аласенса за 3-5 часа до проведения исследования. Местно Аласенс использовался в виде свежеприготовленной 20% мази через 1 – 3 часа после окончания 2-х часовой экспозиции.

Фотосенс: синтетический фотосенсибилизатор II поколения для фотодинамической терапии злокачественных опухолей производства ФГУП "ГНЦ "НИОПИК" (Россия). Препарат вводили пациенткам однократно внутривенно посредством 30-минутной инфузии в дозе 0,3 мг/кг. Перед введением разбавляли 0,9% раствором натрия хлорида в отношении 1:4

Во время каждого сеанса ФД на первом этапе проводили кольпоскопию в белом свете. Далее в режиме флюоресценции с длиной волны возбуждения в диапазоне от 420 до 490 нм регистрировали очаги желто-зеленой (Флюоренат) и красной флюоресценции (Аласенс) на шейке матки с получением двумерного флюоресцентного изображения. Затем проводили биопсию флюоресцирующих очагов шейки матки для последующего гистологического исследования.

Облучение влагиалищной порции шейки матки осуществляли с использованием микролинзы, применяя полипозиционную методику лазерного воздействия с диаметром светового пятна от 1,0 до 1,5 см, начиная с области маточного зева с последовательным перемещением светового пятна вдоль всей

поверхности шейки матки с обязательным перекрыванием края каждого предыдущего светового пятна последующим. При этом использовали 6 позиций облучения. Плотность энергии лазерного излучения во всех случаях составляла 150 Дж/см^2 , плотность мощности лазерного излучения – 150 мВт/см^2 .

Аппаратура и инструментарий для проведения флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Для проведения ФД использовали: Цифровой видеокольпоскоп SENSITEC SLG – 2000, позволяющий получать не только качественное изображение, но и заносить его в память компьютера для последующего сравнения с результатами ФДТ. Видимая флюоресценция как Флюорената, так и Аласенса возбуждалась светом с длиной волны 420 – 490 нм или

Спектральные характеристики регистрировались лазерными электронно-спектральными установками для ФД опухолей и контроля ФДТ ЛЭСА-01 и ЛЭСА-7 «Биоспек» для регистрации спектров интенсивности флюоресценции.

В качестве источника оптического излучения для проведения ФДТ использовали сертифицированные терапевтические источники света ЛД680-2000 с длиной волны 675 нм, соответствующей максимумам спектрального поглощения Фотосенса.

При математической обработке материала использовали методы вариационной статистики; расчет показателей, построение графиков и схематические рисунки осуществлялись на компьютере с помощью пакета прикладных программ Statgraph, Supercalk, MS Excel, Origin 6.1, Macromedia Flash MX PRO 2004 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Спектрометрические исследования собственной флюоресценции опухолей кожи, вульвы, поражений шейки матки. Для проверки наличия или отсутствия собственного свечения в области пика люминесценции применяемых препаратов источники света имели длины волн 420- 490 нм для Флюорената и 630 нм для Аласенса. (Табл. 5).

Результаты спектрометрии собственной флюоресценции(ед. флюоресценции)

Длины волн 420-490 нм.			
рак кожи	рак вульвы	фоновые заб. ШМ	рак шейки матки
$M \pm m = 1,9 \pm 0,3$	$M \pm m = 1,8 \pm 0,4$	$M \pm m = 1,9 \pm 0,9$	$M \pm m = 2,1 \pm 0,5$
Длина волны 630 нм.			
рак кожи	рак вульвы	фоновые заб. шейки матки	рак шейки матки
$M \pm m = 4,9 \pm 0,9$	$M \pm m = 5,2 \pm 0,4$	$M \pm m = 4,8 \pm 0,3$	$M \pm m = 5,4 \pm 0,8$

Проведенные исследования дали возможность однозначно сделать определенные выводы. Прежде всего, следует отметить, что ни у одного обследованного на указанных длинах волн не обнаружено пиков собственной флюоресценции в области применяемых препаратов. Собственная флюоресценция всех изученных объектов крайне низка и одинакова. Следовательно, собственная флюоресценция при облучении светом указанных длин волн не может быть методом диагностики и дифференциальной диагностики заболеваний шейки матки и не влияет на результаты вторичной флюоресценции.

Спектрометрические исследования накопления Флюорената и Аласенса в раке кожи и вульвы.

При визуальном контроле наблюдалась более или менее выраженная флюоресценция в 63% всех случаев с Флюоренатом и в 78% при работе с Аласенсом. С уменьшением размеров опухоли вероятность её видимой флюоресценции возрастает. При раке размером меньше 2см. наблюдалась равномерная флюоресценция всей опухоли. Таким образом, можно говорить о наличии наблюдаемой флюоресценции, но, как оказалось, все результаты субъективны и зависят от остроты зрения, длительности адаптации глаза в темноте.

По всей вероятности при визуальном наблюдении даже при применении светофильтров флюоресценция опухоли различима, когда она превышает фоновое свечение не менее чем в 2-3 раза. Поэтому при оценке флюоресценции опухоли можно доверять только спектральному анализу.

При проведении спектрометрий определялось отношение флюоресценции опухоли к флюоресценции отдаленных от неё контрольных участков (Табл.6). Различной интенсивности флюоресценция регистрировалась во всех наблюдениях, но неравномерно распределялась по опухоли. Нами замечено, что

интенсивность и равномерность её более выражена при опухолях размером менее 2см. Границы флюоресценции были ровными и, как правило, совпадали с видимыми очертаниями опухоли. При размерах опухоли более 2-х см флюоресценция носила неравномерный характер и ее интенсивность была менее выражена, а в некоторых случаях наблюдалась в виде очагов на фоне темных участков, которые совпадали с участками некроза. Спектральный анализ таких опухолей показал, что люминесценция их менее интенсивна.

Таблица 6.

Показатели флюоресценции (патология/норма) рака кожи и вульвы

базальноклеточный рак кожи	плоскоклеточный рак кожи	плоскоклеточный рак вульвы
при использовании Флюорената n=36		
$M \pm m = 2,7 \pm 0,4$	$M \pm m = 2,7 \pm 0,2$	$M \pm m = 2,9 \pm 0,4$
при использовании Аласенса n=19		
$M \pm m = 3,5 \pm 1,4$	$M \pm m = 3,4 \pm 1,6$	$M \pm m = 3,6 \pm 1,4$

Зависимости уровней флюоресценции от гистологического строения опухоли при спектрометрии не отмечено. В ряде случаев базалиомы светились значительно ярче, чем плоскоклеточный рак.

Средний показатель величины спектров флюоресценции при раке вульвы был несколько выше, чем при раках кожи, но статистическая разница не достоверна. Уровень флюоресценции так же может колебаться в значительных пределах, от чего зависит и возможность наблюдения флюоресценции. Как и при кожных раках, вероятность наблюдения флюоресценции низка, что не дает оснований к рекомендации оценки наличия или отсутствия рака по видимой флюоресценции.

Основываясь на проведенных исследованиях, можно считать, что только спектроскопическая флюоресцентная диагностика может с большой вероятностью являться методом диагностики злокачественных новообразований. Использование спектрометрии значительно уменьшает степень визуальных диагностических ошибок и тем самым повышается эффективность метода. Определение достоверности различия результатов (разность результатов не случайна при $t > 2,6$) показало, что, используя Флюоренат ($t=12,1$) возможно проведение дифференциальной диагностики между доброкачественными поражениями и злокачественными опухолями. Определение достоверности

различия результатов при использовании Аласенса показатели разницы значений флюоресценции были выше ($t=15,6$).

Следовательно, флюоресцентная диагностика с препаратом Аласенс является более эффективным методом, позволяющим определить не только принадлежность опухоли к раку, но и уточнить границы распространенности опухоли. В данном случае, важным положительным свойством Аласенса является большая селективность накопления в злокачественных опухолях и высокая контрастность. То есть, Аласенс может быть более эффективно использован в дифференциальной диагностике. Поэтому все дальнейшие исследования уровней люминесценции при раке шейки матки мы проводили с применением аласенсной диагностики, как наиболее перспективного метода.

Изучение накопления Аласенса при дисплазии III и раке шейки матки.

Изучалось диагностическое значение 3-х разных доз препарата: растворы для перорального применения в дозах 10 мг/кг; 20 мг/кг и мазевая форма Аласенса в виде 20% мази.

Результаты ФД с Аласенсом после приема внутрь в дозе 10 мг/кг. Диагностировано 20 очагов опухолевой и предопухолевой патологии шейки матки. При каждом исследовании снималось до 5-и спектров. У всех больных проводили визуальную оценку флюоресценции и регистрацию спектров флюоресценции для определения флюоресцентной контрастности на границе “патология/норма”. У всех больных имелась первичная патология шейки матки, в том числе: плоскоклеточный рак – у 5 больных; рак in situ – у 7 больных; дисплазия III степени – у 8 больных. Средний размер контрольных очагов составлял $2,3 \pm 2,9 \text{ см}^2$.

При визуальном наблюдении на сине-фиолетовом фоне тканей, окружающих опухоль у многих больных наблюдалось темно-розовое свечение опухоли. При оценке флюоресценции получены результаты. Плоскоклеточный ороговевающий рак шейки матки люминесцировал у 72% больных:

Ф+О+	Ф--О+	Ф--О--	Ф+О--
72 %	12%	0 %	16 %

Отсутствие флюоресценции связано с участками повышенной кровоточивости опухоли или её частичным некрозом и наличием налета фибрина. С уменьшением размеров флюоресценция становилась четкой и однородной. Контрастность флюоресценции

колебалась в широких пределах – от 1,5 до 5-и кратной величины в сравнении с окружающей тканью (Табл.7). При этом средние значения относительной флюоресценции у плоскоклеточного рака, рака *in situ* и дисплазии-III недостоверно отличны друг от друга. Флюоресценция плоскоклеточного рака несколько выше флюоресценции остальной патологии. Большой разброс средних показателей флюоресценции объясняется большой разницей уровня флюоресценции в различных отделах опухоли и в связи с этим значительным разбросом самих обобщенных по каждой опухоли показателей. Подтверждено достоверное ($t=12,4$) повышенное накопление препарата в тканях с опухолевой и предопухоловой патологией шейки матки по сравнению с неизмененными тканями. **То есть можно с уверенностью говорить о том, что накопление Аласенса при дисплазии-III и РШМ практически всегда значительно выше, чем в нормальной ткани. Это может подтверждать то, что при дисплазиях происходят близкие к раку процессы клеточной пролиферации и на них необходимо воздействовать методами ФДТ, не дожидаясь развития рака.**

Таблица 7.

Показатели флюоресценции (патология/норма) при использовании Аласенса в дозе 10 мг/кг. ($n = \text{кол-во опухолей} / \text{кол-во спектров}$). $p < 0,05$.

дисплазия- III 8/40	рак <i>in situ</i> 7 / 35	Плоскоклеточный рак 5 / 25
$M \pm m = 2,6 \pm 1,1$	$M \pm m = 2,5 \pm 0,9$	$M \pm m = 3,1 \pm 2,0$

Уточнены границы 1 опухолевого очага (плоскоклеточный рак). У 2 больных дополнительно выявлено 3 очага рака *in situ*. Получено 2 ложноположительных (Ф + О –) и 2 ложноотрицательных (Ф – О +) (1 – дисплазия III степени, 1 – рак *in situ*) результата, которые могут быть обусловлены наличием воспалительного компонента в зоне локализации патологического процесса. Среднее значение диагностического коэффициента составило $2,7 \pm 1,3$. Чувствительность метода составила 92%.

Результаты ФД с Аласенсом после приема внутрь в дозе 20 мг/кг. До проведения ФД в группе было диагностировано 44 очагов опухолевой и предопухоловой патологии шейки матки. Имелась первичная патология шейки матки, в том числе: плоскоклеточный рак – у 15 больных; рак *in situ* – у 14 больных; дисплазия III степени – у 15 больных. Средний размер контрольных очагов составлял $2,7 \pm 2,4 \text{ см}^2$.

При визуальном наблюдении на сине-фиолетовом фоне тканей, окружающих опухоль наблюдалось темно-розовое свечение

опухоли. Плоскоклеточный ороговевающий и неороговевающий РШМ люминесцировал в виде розового свечения у 77% больных:

Ф+О+	Ф--О+	Ф--О--	Ф+О--
77%	12%	0%	11%

С уменьшением размеров флюоресценция становилась четкой и однородной, а контрастность колебалась в широких пределах – от 2-х до 5-и кратной величины в сравнении с окружающей тканью и в среднем достигало 3,3. (Табл. 8). Оценивая возможности дифференциальной диагностики по критерию достоверности спектральных различий нормальной ткани с дисплазией-III и плоскоклеточным раком ($t=14,9$) можно считать раствор Аласенса в дозе 20 мг/кг более надежным, чем раствор в дозе 10 мг/кг для диагностики ранних форм рака.

Таблица 8.

Показатели флюоресценции (патология/норма) при использовании Аласенса в дозе 20 мг/кг. (n = кол-во опухолей / кол-во спектров).

дисплазия –III 15 / 75	рак in situ 14 / 70	плоскоклеточный рак 15/75
$M \pm m = 3,2 \pm 0,5$	$M \pm m = 2,7 \pm 0,7$	$M \pm m = 4,0 \pm 1,1$

Спектрометрически зарегистрирована повышенная флюоресценция всех клинически определяемых очагов опухолевого и предопухолевого поражения шейки матки. Уточнены границы 5 опухолевых очагов (плоскоклеточный рак). У 1 больного дополнительно выявлен очаг дисплазии шейки матки. Получено 2 ложноположительных результата (Ф+О–). Среднее значение диагностического коэффициента (флюоресцентная контрастность «патология / норма») $3,3 \pm 0,8$. Чувствительность метода 100%.

Результаты ФД с Аласенсом после экспозиции 20% мази Аласенса.

Для проведения исследований в данной группе отобрано 20 больных с очаговой опухолевой и предопухолевой патологией шейки матки. Средний возраст больных в группе составил 37 ± 12 лет. У всех больных имелась первичная патология шейки матки, в том числе: плоскоклеточный рак – у 6 больных; рак in situ – у 5 больных; дисплазия III степени – у 9 больных.

Средний размер контрольных очагов составлял $0,9 \pm 1,3 \text{ см}^2$. При оценке флюоресценции разными исследователями и сравнении её с гистологическими заключениями грубая дисплазия и РШМ люминесцировали в виде розового свечения у 73 % больных:

Ф+О+	Ф--О+	Ф--О--	Ф+О—
73 %	27 %	0 %	0 %

Отмечалась флюоресценция всей поверхности опухоли небольших размеров без некрозов. Отсутствие флюоресценции связано с участками повышенной кровоточивости опухоли или её частичным некрозом и наличием налета фибрина.

Контрастность флюоресценции колебалась в широких пределах – от 2 до 4-х кратной величины в сравнении с окружающей тканью (Табл. 9). При этом средние значения относительной флюоресценции у плоскоклеточного рака, рака *in situ* и дисплазии-III почти не отличны друг от друга.

Таблица 9.

Показатели флюоресценции при использовании 20 % мази Аласенса.
(n = кол-во опухолей / кол-во спектров)

дисплазия- III 9 / 45	рак <i>in situ</i> 5 / 25	плоскоклеточный рак 6 / 30
$M \pm m = 3,1 \pm 0,5$	$M \pm m = 2,9 \pm 0,5$	$M \pm m = 3,3 \pm 0,8$

В результате проведения ФД после аппликации 20% мази с Аласенсом зарегистрирована четкая флюоресценция всех клинически определяемых очагов опухолевого и предопухолевого поражения шейки матки. Уточнены границы очагов опухолевого и предопухолевого поражения шейки матки. У 15 больных дополнительно выявлено 14 очагов дисплазии II и III степени и 7 очагов рака *in situ*, Получено 2 ложноположительных результата. Среднее значение диагностического коэффициента $3,1 \pm 0,6$. Чувствительность метода составила 100%.

Клинические испытания препарата Аласенс показали высокую эффективность всех режимов ФД. В случае проведения ФД после приема раствора Аласенса внутрь в дозе 20 мг/кг селективность накопления в патологически измененных тканях шейки матки в среднем выше ($DK=3,3 \pm 0,8$), чем в случае использования раствора Аласенса для приема внутрь в дозе 10 мг/кг ($DK=2,7 \pm 1,3$). Не выявлено статистически значимых различий между селективностью накопления в случае использования растворов Аласенса для приема внутрь в дозе 20 мг/кг ($DK=3,3 \pm 0,8$) и в случае применения Аласенса в виде 20% мази для аппликации ($DK=3,1 \pm 0,6$).

Проведение ФД с препаратом Аласенс не вызывало развития аллергических реакций, как при пероральном введении, так и при местном использовании 20% мази с Аласенсом. Не было отмечено

фототоксических реакций открытых участков кожи после приема внутрь раствора препарата.

При использовании лекарственной формы 20% мазь с препаратом Аласенс нет необходимости в соблюдении ограниченного светового режима, так как по данным спектрометрии не отмечается накопления препарата в коже и видимых слизистых оболочках при этом пути введения. Применение Аласенса в изученных режимах не приводило к изменению показателей клинических и биохимических анализов крови, что свидетельствует об отсутствии гематотоксичности.

Изучение накопления Фотосенса в очаге патологии шейки матки и слизистой оболочке влагалища.

С учетом рекомендаций создателя и изготовителя препарата Фотосенс мы оценили эффективность ФДТ РШМ при применении рекомендуемых доз и плотностей мощности и энергии лазерного излучения, результативность которых была доказана при лечении рака других локализаций. Использовались дозы Фотосенса 0,3 мг/кг. Такая дозировка выбрана в связи с тем, что накопление Фотосенса при ней не уступало качеству фотохимических реакций и эффективности ФДТ в эксперименте результатам при ранее применявшихся дозировках 0,5 и 0,8 мг/кг. В то же время значительно уменьшается фототоксическая реакция в виде светового воздействия на незащищенные от солнечного света участки кожи. У всех 40 больных с РШМ проведены спектрометрические исследования слизистой влагалища и опухоли шейки матки. Получали показатели отношения уровня люминесценции ткани к уровню люминесценции контрольного образца с концентрацией Фотосенса $4,0 \times 10^{-4}$ мг/мл, оптимальной для проведения ФДТ. Оказалось, что в слизистой влагалища накопление Фотосенса превышало его содержание в образце в $1,8 \pm 0,3$ раза, а при дисплазии -III, раке *in situ* – в $4,2 \pm 0,5$ раза.

Эффективность ФДТ с препаратом Фотосенс у больных, включенных в исследование, оценивали по степени регрессии патологического очага на основании данных о динамике изменения ее размеров через 1 и 2 месяца после ФДТ (визуально и по данным гистологического или цитологического исследования).

У всех пациенток, включенных в исследование через несколько минут после начала ФДТ отмечалось появление отека и гиперемии в зоне светового воздействия с нарастанием к концу сеанса

лечения. За счет набухания участков пораженного эпителия происходило визуально определяемое четкое отграничение этих тканей от окружающих нормальных, которые также претерпевали изменения в виде незначительной гиперемии и отека. Через сутки после лечения некротические изменения и количество очаговых внутрислизистых кровоизлияний в зоне фотодинамического воздействия значительно нарастали, также наблюдалось формирование фибриновых пленок, частично закрывающих просвет шеечного канала. Реализация полного эффекта в виде нарастающего некроза обычно наступала к концу 4-5-го дней после лечения, постепенное очищение зоны светового воздействия от некроза с завершением процессов эпителизации – к 4-5 неделям после лечения. Через 1 и 2 месяца после окончания ФДТ всем пациенткам было произведено контрольное морфологическое исследование шейки матки. Эффективность лечения оценивали по степени регрессии патологического очага.

Полная резорбция опухоли, подтвержденная морфологически через 2 месяца после лечения, отмечена у 33 (82,5%) пациенток, включенных в исследование; частичная – у 3 (7,5%) пациенток; стабилизация процесса – также у 3 (7,5%) пациенток; результат ФДТ у 1 пациентки (2,5%) оценен, как прогрессирование процесса (прогрессирование очага рака *in situ* до микроинвазивного рака).

Как видно из данных, представленных в таблице 10, различия в эффективности ФДТ у пациентов с дисплазией шейки матки III степени и раком шейки матки *in situ* были статистически не достоверны.

Вместе с тем, отмечена тенденция к некоторому снижению эффективности лечения при увеличении площади патологического очага. Так, у пациентов с площадью опухолевого образования $\leq 2,0$ см² полная регрессия опухолевых образований получена в 90,5% случаев, а у пациентов с площадью $>2,0$ см² – только в 73,7%.

У пациентов с площадью опухолевого образования $\leq 2,0$ см² не отмечено случаев стабилизации или прогрессирования заболевания, а у пациентов с площадью очага $> 2,0$ см² – в 3 случаях была достигнута только стабилизация процесса, а у 1 пациентки – прогрессирование заболевания.

Эффективность ФДТ с Фотосенсом у пациентов с CIN-III и РШМ

Группа пациентов	Кол-во пациентов	Эффективность лечения			
		ПЭ	ЧЭ	СТ	ПР
➤ дисплазия III степени шейки матки	27	22 (81,5%)	2 (7,4%)	3 (11,1%)	-
➤ рак in situ шейки матки	10	9 (90%)	-	-	1 (10%)
➤ дисплазия III степени + рак in situ	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	-	-
Пациенты с S опухоли:					
➤ ≤ 2,0 см ²	21	19 (90,5%)	2 (9,5%)	-	-
➤ > 2,0 см ²	19	14 (73,7%)	1 (5,3%)	3 (15,7%)	1 (5,3%)
ВСЕГО:	40	33 (82,5%)	3 (7,5%)	3 (7,5%)	1 (2,5%)

Оценивая полученные результаты лечения 40 больных можно считать, что оно позволило добиться полной регрессии заболевания у 33 (82,5%) пациенток, включенных в исследование, частичной – у 3 (7,5%) пациенток, стабилизации процесса – также у 3 (7,5%) пациенток. Результат ФДТ у 1 пациентки (2,5%) оценен, как прогрессирование процесса (прогрессирование очага рака in situ до микроинвазивного рака).

Как показали проведенные исследования, ФДТ предопухоловой и опухолевой патологии шейки матки позволяет избежать возникновения рубцовых изменений тканей, что дает в последующем возможность деторождения через естественные родовые пути.

Введение Фотосенса и проведение ФДТ не сопровождалось обострением сопутствующих заболеваний, изменением артериального давления, частоты сердечных сокращений, частоты дыхательных движений, температуры тела, развитием аллергических реакций, местных и общих токсических реакций. Динамическое наблюдение за показателями крови и мочи показало отсутствие гемато-, нефро- и гепатотоксичности препарата Фотосенс.

ВЫВОДЫ

1. На моделях базальноклеточного и плоскоклеточного раков доказана наибольшая эффективность использования 5 – аминолевулиновой кислоты (Аласенс) в диагностике грубых дисплазий и рака шейки матки.

2. Уровень диагностического контраста накопления Аласенса при дисплазии-III и раке шейки матки высок (ДК=3,3±0,8 у 20% раствора и ДК=3,1±0,6 у 20% мази для аппликации), что позволяет проводить дифференциальную диагностику с доброкачественными поражениями.

3. Во всех случаях наличия дисплазии – III и раннего рака шейки матки они могут быть обнаружены с помощью флюоресцентного лазерного спектрального анализа.

4. На основании результатов проведенных клинических исследований препарат Фотосенс в дозе 0,3 мг/кг может быть рекомендован в качестве фотосенсибилизирующего средства для ФДТ дисплазии-III и раннего рака шейки матки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для диагностики и лечения предопухоловой и опухолевой патологии шейки матки рекомендовано использование следующих режимов.

1. Проведение ФД через 4-6 часов после приема внутрь 50 мл раствора препарата Аласенс в однократной дозе 20 мг/кг при подозрении на поражение влагалищного отдела шейки матки и цервикального канала.

2. Проведение ФД через 1-3 часа после окончания 2-часовой экспозиции 20% мази с препаратом Аласенс при отсутствии подозрения на поражение цервикального канала.

3. При фотодинамической терапии рака достаточно введение Фотосенса в дозе 0,3 мг/кг за 24 часа до облучения. Плотность мощности облучения 150 мВт/см², плотность энергии – 150 Дж/см² за один сеанс.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. К.С. Романов, **А.Е. Зыков**, М.А. Карлова, А.И. Марченко. Флуоресцентная диагностика заболеваний шейки матки. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины. М. 2004, с.34-36

2. К.С. Романов, Ф.А.Зангиева, **А.Е. Зыков**, А.Ш. Хасан. Возможности флюоресцентной диагностики предрака, раннего рака эндометрия. // Актуальные вопросы клинической медицины. М. 2005. - С.116-118.

3. И.С. Сидорова, А.Л. Унанян, Е.А. Коган, **А.Е. Зыков**. Клинико-патогенетические варианты развития аденомиоза – перспективы таргетной терапии. // Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии. – 2007.- №3 – С.38-41.

4. И.С. Сидорова, Е.А. Коган, А.Л. Унанян, Т.Д.Гуриев, **А.Е. Зыков**. Молекулярно-биологические особенности инвазии и пути ее фармакологической коррекции при аденомиозе. // XIVоссийский национальный конгресс «Человек и лекарство». Сборник материалов конгресса. М., - 2007. – С.208.

5. И.С. Сидорова, А.Л. Унанян, Е.А. Коган, **А.Е. Зыков**, М.А. Карлова, С.А. Леваков Т.Д. Гуриев. Морфологические особенности аденомиоза различной клинической активности. // **Морфология. – 2008. - №4. – С.92.**

6. А.Л. Унанян, И.С. Сидорова, С.Э. Швецов, **А.Е. Зыков**, Е.А. Коган. Состояние эндометрия у больных с клинически активным и неактивным аденомиозом. // **Морфология. – 2008. - №4. – С.97.**

7. **А.Е. Зыков**, В.И. Полсачев, Е.К. Словоходов, Р.В. Басанов. В.И. Иванова-Радкевич. Флуоресцентная диагностика у гинекологических больных предопухолевой и опухолевой патологии шейки матки. // **Хирург – 2011.- №6.- С.47 – 50**

8. В.И.Полсачев, Е.К.Словоходов, **А.Е.Зыков**, Р.В.Басанов. Флуоресцентная диагностика предрака и раннего рака эндометрия и шейки матки с применением 5 – аминолевулиновой кислоты. // **Хирург – 2011- №7.**

9. В.И.Полсачев, **А.Е.Зыков**, Е.К.Словоходов, Р.В.Басанов, А.Б. Смиронов, В.И.Иванова-Радкевич. Фотодинамическая терапия у гинекологических больных с предопухолевой и опухолевой патологией шейки матки. **Хирург, 2011, №8.**