

История развития флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии и их возможности в онкологии

Е.В. Филоненко

Контакты: Филоненко Е.В., 8(495) 945-86-60, elena.filonenko@list.ru
ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена» МЗ РФ

Елена Вячеславовна Филоненко – доктор медицинских наук, профессор. Руководитель отделения реабилитации и физических методов диагностики и лечения. Научные интересы: онкология, эндоскопия, фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика.

Борьба со злокачественными новообразованиями продолжает оставаться одной из приоритетных задач в медицине. По прогнозам ВОЗ за 1999-2020 гг. заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний во всем мире возрастет в 2 раза, поэтому разработка и внедрение новых, высокотехнологичных методов ранней диагностики и лечения рака является актуальной проблемой современной медицины. Одними из таких методов являются флуоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ). Несмотря на то, что применение данных методов стало возможно лишь в последние несколько десятилетий, после изобретения и освоения лазерной техники, история развития самих методик, основанных на фотохимических свойствах различных видов лекарственных препаратов, насчитывает не одно столетие.

В фотохимиотерапии экзогенные или эндогенные фотосенсибилизаторы применяются как инициаторы химической реакции в биологической ткани. Концепция фотохимиотерапии не нова, ее использовали много веков назад при лечении витилиго в Индии, Египте и Китае. Первое детальное описание эффекта "химической фотосенсибилизации" биоткани относится к началу XX века. За точку отсчета современного научного и экспериментального подхода к изучению фотосенсибилизации принято считать работу O.Raab, опубликованную в 1900 г. Будучи студентом-медиком, проводя исследования в Мюнхенском университете

под руководством профессора Н. Tareiner, O. Raab установил, что низкие концентрации красителей акридинового и других рядов, химически инертных в темноте, приводят к быстрой гибели парамеции при облучении их солнечным светом. Н. Tareiner высоко оценил это открытие, высказав предположение, что данный эффект найдет применение в медицине. Он инициировал развитие данного направления медицины и впервые ввел термин "фотодинамическое действие" с тем, чтобы избежать путаницы с аналогичными фотохимическими процессами, реализуемыми в фотографии. Этот термин широко используется до настоящего времени [1, 2].

В 1903 г. Н. Tareiner совместно с А. Jesionek из Мюнхенской дерматологической клиники опубликовали результаты клинического применения эозина и света при лечении герпеса, псориаза и рака кожи [3]. Позже, в 1905 г. эти же исследователи, наряду с эозином, использовали в качестве фотосенсибилизатора флюоресцеин.

Последующее изучение фотодинамического эффекта привело к развитию нового направления в медицине – фотодинамической терапии злокачественных опухолей.

В 1920-е годы среди многих свойств злокачественных опухолей была отмечена их способность накапливать порфирины, проявляющие флюоресцирующие свойства под воздействием ультрафиолетового излучения. Важным шагом на пути к созданию методов ФД и ФДТ рака явилось наблюдение, сделанное в 1924 г. А. Polikard, о том, что в опухолях животных могут накапливаться эндогенные порфирины, обладающие способностью флюоресцировать при облучении светом видимой части спектра [18]. В 1942 г. Н. Auler и G. Banzer из Берлина зафиксировали красную флюоресценцию в первичной опухоли и в метастазах у крыс после подкожного и внутримышечного введения гематопорфирина [5].

Современный этап развития ФД и ФДТ начался в 1960-е годы с исследований R. Lipson и соавт. в США, которые показали, что введение онкологическим больным производного гематопорфирина, полученного путем ацетилирования и восстановления порфириновой смеси, обогащенной гидрофобными олигомерами, приводит к возможности регистрировать флюоресценцию опухолей [6, 7]. Началом широкого клинического применения ФДТ в онкологии считается 1978 г., когда Т. Dougherty и соавт. сообщили о

результатах ФДТ у 25 больных с 113 первичными, рецидивными и метастатическими опухолями кожи [8].

В России, несмотря на многолетние экспериментальные исследования, ФДТ опухолей получила развитие в клинике только с 1992 г., когда была создана лекарственная форма первого отечественного фотосенсибилизатора - препарата Фотогем, относящегося к группе производных гематопорфирина (МИТХТ им. М. В. Ломоносова, проф. А. Ф. Миронов). Проведены успешные клинические испытания на базе МНИОИ им. П.А.Герцена и ГНЦ Лазерной медицины. Через два года (в 1994 г.) были начаты клинические испытания фотосенсибилизатора второго поколения - Фотосенса (сульфированный фталоцианин алюминия), разработанного в ГНЦ РФ «НИОПИК» (чл.-кор. РАН, проф. Г. Н. Ворожцов, проф. Е. А. Лукьянец). В 1999 г. начато применение в клинике препарата на основе 5-аминолевулиновой кислоты – Аласенса (ГНЦ РФ «НИОПИК», чл.-корр. РАН, проф. Г. Н. Ворожцов, проф. Е. А. Лукьянец), а в 2002 и 2004 г.г. – препаратов, синтезированных на основе хлорина Е6 – Радахлорина (ООО «Радафарма», к. х. н. А. В. Решетников) и Фотодитазина (ООО «ВЕТА-ГРАНД», проф. Г. В. Пономарев) соответственно.

В МНИОИ им. П. А. Герцена экспериментальные исследования в области ФД и ФДТ были начаты около 30 лет назад, в 1984 г были доложены первые результаты данных работ [9]. Клинические исследования ведутся с 1992 г. К настоящему времени для ФД и ФДТ на основе указанных препаратов разработаны методики, подготовлены методические рекомендации, пособия для врачей и программа обучения специалистов.

Внедрению методов в России способствовало создание отечественной диагностической и терапевтической аппаратуры. Последний фактор наряду с наличием отечественных фотосенсибилизаторов делает метод ФДТ не только высокоэффективным по ряду показаний, но также и экономически целесообразным.

ФДТ можно применять для лечения опухолей практически всех основных локализаций как самостоятельный метод, так и в сочетании с традиционными видами лечения (хирургическое, лучевая и химиотерапия). Указанные варианты сочетанной и комбинированной терапии направлены на улучшение результатов радикального и паллиативного лечения наиболее тяжелых групп онкологических больных. В зависимости от стадии, характера и формы роста опухоли для повышения эффективности ФДТ разработаны различные варианты лазерного

облучения: одно- и многопозиционное, инвазивное и неинвазивное внутритканевое и др.

В настоящее время в МНИОИ им. П.А.Герцена методики ФД и ФДТ применены для диагностики и лечения нескольких тысяч больных с различной стадией и локализацией опухолевого процесса.

Методы ФД и ФДТ основаны на введении в организм пациента фотосенсибилизаторов, избирательно накапливающихся в опухолевой ткани, которые при световом, в частности, лазерном воздействии (в зависимости от длины волны и режима облучения) могут приводить либо к излучению кванта света, вследствие чего можно регистрировать их флуоресценцию, либо продуцировать образование цитотоксических веществ, прежде всего синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ и активных радикалов, накопление которых приводит к разрушению жизненно важных структур опухолевых клеток и их гибели. Кроме прямого фототоксического воздействия на опухолевые клетки при ФДТ важную роль в механизме деструкции играют: нарушение кровоснабжения опухолевой ткани вследствие повреждения эндотелия и тромбоза кровеносных сосудов; цитокиновые реакции, обусловленные стимуляцией продукции фактора некроза опухоли, интерлейкинов, активацией макрофагов и лейкоцитов.

Изучению иммуномодифицирующего и стимулирующего механизмов ФДТ в последние годы уделяется повышенное внимание. Опыт, накопленный в МНИОИ им. П. А. Герцена, показывает, что фотодинамическое воздействие стимулирует нейтрофильное звено и ряд других показателей иммунитета.

Таким образом, проведение сеансов диагностики и лечения, - это многоэтапная процедура с многокомпонентными ответами при реализации терапевтического воздействия, в связи с чем необходимы новые подходы к изучению фотосенсибилизаторов в клинике при разработке медицинских технологий.

Для определения оптимальных режимов диагностики и терапии с отечественными фотосенсибилизаторами различных классов в МНИОИ им. П.А.Герцена была разработана «Программа клинического изучения новых фотосенсибилизаторов» [10]. В соответствии с этапами разработанной программы были проведены исследования фотосенсибилизаторов различных групп, в частности была изучена кинетика тканевого распределения данных препаратов у онкологических больных, позволившая оптимизировать методики флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Кроме этого, была

изучена кинетика внутритканевого распределения фотосенсибилизаторов для определения биомишеней, так как реализация лечебных эффектов напрямую зависит от того, в каких структурах опухолевого узла фотосенсибилизатор накопился во время проведения сеанса фотодинамической терапии. Наличие фотосенсибилизатора в клетках опухоли будет вызывать прямое повреждение опухолевых клеток, а накопление его в богатой сосудами строме опухоли – ишемический некроз, вследствие тромбоза и разрушения сосудов. Следовательно, для правильного планирования методик фотодинамической терапии с целью достижения эффективного лечения нужны данные о накоплении и распределении фотосенсибилизатора в опухолевых и здоровых клетках и тканях. Соответствующие исследования были проведены в нашей работе.

Установлено, что препарат Фотогем преимущественно накапливается в опухолевой ткани с получением максимальной флюоресцентной контрастности опухоль/норма через **24-48 ч** после внутривенного введения. При этом при использовании данного препарата преобладает ишемический некроз вследствие того, что Фотогем накапливается в богатой сосудами строме опухоли в большем количестве, чем в опухолевых клетках. Невысокое содержание препарата в стенке неизменных сосудов могут свидетельствовать о невысоком риске развития ишемических изменений неизменных тканей в границах зоны светового воздействия при стандартных режимах лазерного облучения.

Показано, что в результате фотодинамической терапии с препаратом Фотосенс преобладает ишемический некроз опухоли. Максимальные уровни флюоресценции препарата в структурах опухоли зарегистрированы через **2-8 ч** после его внутривенного введения, что обуславливает максимальное повреждение опухоли при проведении ФДТ в этот период времени. **Наличие значительного количества Фотосенса в структурах опухоли в течение недели после внутривенного введения свидетельствует о возможности проведения сеансов ФДТ в эти сроки после однократного введения препарата.** Одинаковое содержание Фотосенса в структурах опухоли и стенке неизменных сосудов рядом с зоной опухолевого роста через 1-2 ч после введения препарата может привести к повреждению сосудов и ишемическим изменениям тканей в границах поля лазерного облучения.

При проведении фотодинамической терапии с препаратами на основе хлорина Е6 будет преобладать ишемический некроз опухоли. При этом оптимальное время проведения терапии составляет 3-8 ч после внутривенного

введения препарата, так как в этот период времени содержание его в структурах опухоли максимальное. Практически одинаковое содержание фотосенсибилизатора в структурах опухоли и стенке неизмененных сосудов через 3-4 ч после внутривенного введения может приводить к повреждению нормальных сосудов в границах всего поля лазерного облучения и ишемическим изменениям здоровых тканей в этот период в случае высоких доз лазерного облучения.

Аласенс-индуцированный протопорфирин IX (ППИХ) - единственный фотосенсибилизатор, который преимущественно накапливается в клетках опухоли, следствием этого является прямое цитотоксическое воздействие при проведении ФДТ. Результаты изучения кинетики тканевого распределения Аласенс-индуцированного ППИХ в опухолях различной локализации и неизмененных тканях показали, что оптимальный интервал времени между введением препарата и проведением сеанса диагностики и терапии зависит от способа введения Аласенса. При местном способе введения этот интервал времени составляет 1-3 ч, при системном введении – 3-6 ч.

Таким образом, были определены методические подходы к разработке медицинских технологий: определены оптимальные сроки проведения флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии с каждым из фотосенсибилизаторов; показано, что ряд фотосенсибилизаторов (Фотогем, препараты на основе хлорина Е6, Аласенс-индуцированный ППИХ) быстро выводятся из опухолевой ткани, эти препараты можно использовать для проведения однокурсовой или многокурсовой терапии. Другие препараты **(Фотосенс) длительно задерживаются в опухоли, что позволяет проводить повторные сеансы терапии после однократного введения препарата (пролонгированная фотодинамическая терапия).** Определено, какие эффекты реализуются при проведении терапии с различными фотосенсибилизаторами – непосредственное разрушение опухолевых клеток, или ишемический некроз вследствие разрушения богатой сосудами стромы опухоли. С учетом полученных данных были разработаны методики флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии, которые легли в основу медицинских технологий (рис. 1).



Рисунок 1. Сеанс интраоперационной ФДТ.

Результаты применения медицинских технологий показали их высокую эффективность. При лечении предрака и рака стадии T1N0M0 полная регрессия с длительным сроком безрецидивного наблюдения получена у больных раком слизистой оболочки полости рта и языка – в 64,4% наблюдений, раком желудка – в 72,6%, раком пищевода – в 77,1%, центральным раком легкого – в 86,5%, раком кожи – в 99,6-100%, раком шейки матки – в 84-100%, у больных с патологией вульвы – в 92,5%

Медицинские технологии фотодинамической терапии при использовании в качестве адъювантной терапии или интраоперационного воздействия показали эффективность лечения больных при высоком риске местного рецидивирования опухоли после хирургического лечения. Так, в группе больных поверхностным раком мочевого пузыря, прошедших адъювантную фотодинамическую терапию в сочетании с митомицином С после трансуретральной резекции, безрецидивная выживаемость при сроке наблюдения до 24 мес составила 100% (в контрольной группе рецидив выявлен у 50% больных); в группе больных с метастатическими опухолями головного мозга после хирургического лечения с интраоперационной флуоресцентной диагностикой и фотодинамической терапией продолженный рост опухоли в срок от 1 до 6 мес диагностирован в 4,2% наблюдений (в контрольной группе – в 30,3%); в группе больных с неорганными забрюшинными

опухолями частота рецидивов после хирургического лечения с интраоперационной фотодинамической терапией составила 12% (частота рецидивов после хирургического лечения 50-80%).

Разработанные технологии паллиативной фотодинамической терапии позволили улучшить качество и увеличить продолжительность жизни наиболее сложной категории онкологических больных (рис. 2).

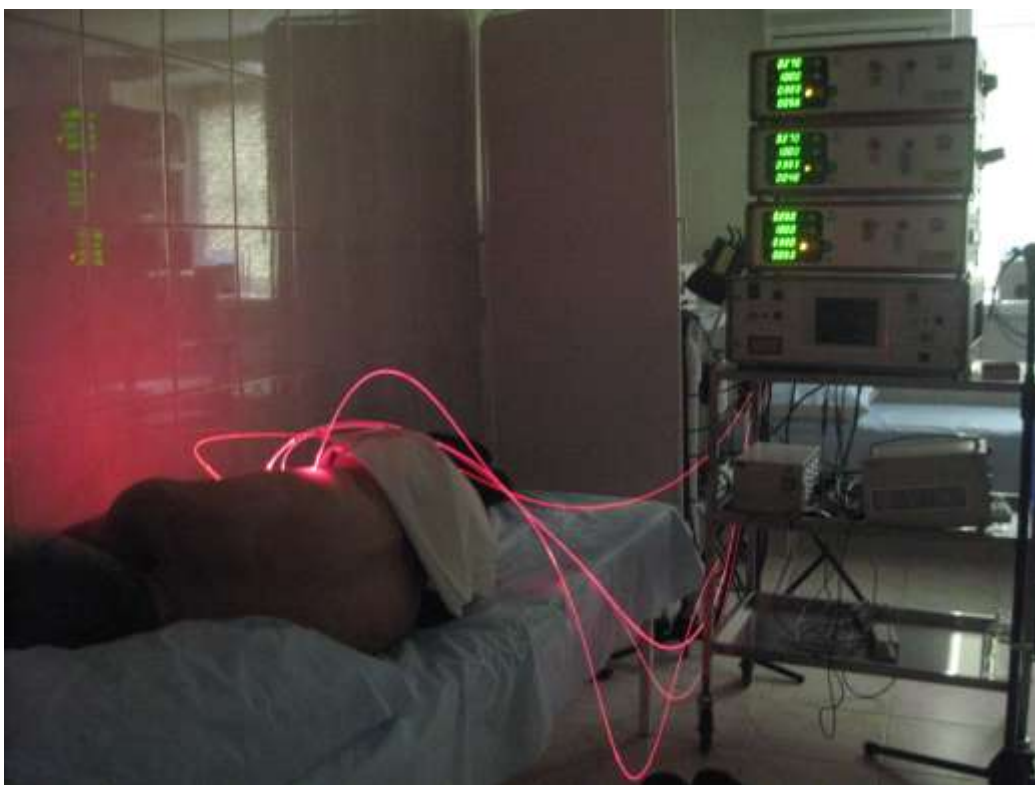


Рисунок 2. Сеанс внутриплевральной ФДТ.

В случае внутрикожных метастаз рака молочной железы и меланомы после пролонгированной фотодинамической терапии полная регрессия опухолей была достигнута у 39,3% и 38% больных соответственно, частичная – в 46% и 52,4%. У больных стенозирующим раком пищевода проведение многокурсовой фотодинамической терапии позволило восстановить естественный режим питания у 100% больных, а проведение пролонгированной внутриплевральной фотодинамической терапии в случае мезотелиомы и метастатических поражений плевры позволило добиться стойкого прекращения внутриплевральной экссудации у 92% больных при сроке наблюдения до 3,5 лет.

В связи с тем, что в последние годы для ряда локализаций доказана связь развития онкологического заболевания с вирусной инфекцией, вопрос о влиянии фотодинамической терапии на вирус-ассоциированные опухоли различной локализации стал весьма актуальным. В МНИОИ им. П.А. Герцена было

проведено исследование, показавшее, что наряду с получением высоких онкологических результатов фотодинамическая терапия предрака и раннего рака шейки матки, ассоциированного с вирусом папилломы человека (ВПЧ) позволила достичь полной эрадикации (уничтожения) ВПЧ у 92,3% больных, снижения активности ВПЧ - у 4,7%, отсутствие эффекта в отношении ВПЧ зарегистрировано у 3% больных. В случае предрака и раннего рака на фоне вирус-ассоциированного папилломатоза гортани удалось добиться полной регрессии опухоли у 82,9% больных, частичной регрессии – у 17,1%, при этом полная эрадикация ВПЧ достигнута у 70% пациентов, снижение активности ВПЧ зафиксировано у 11%, отсутствие эффекта в отношении ВПЧ – у 19%, увеличение продолжительности межрецидивного периода в три раза (с 4 до 12 мес).

Разработанные медицинские технологии флуоресцентной диагностики с препаратом Аласенс позволяют уточнять границы опухолевого поражения при планировании хирургического лечения и фотодинамической терапии, а также эффективно выявлять скрытые очаги раннего первичного и поверхностного рецидивного рака кожи и слизистой оболочки полых органов (рис. 3).

По результатам наших исследований чувствительность и специфичность флуоресцентной диагностики с Аласенсом составила в группе больных с опухолями верхних дыхательных путей – 100% и 88% соответственно, с опухолями верхних отделов пищеварительного тракта – 96% и 98%, с опухолями толстой кишки – 87,5% и 95,7%, с опухолями мочевого пузыря – 98,4% и 76,6%, с опухолями эндометрия – 100% и 97,9%, с опухолями плевры – 89,1% и 88,4%, с опухолями брюшины – 87,5% и 76%. При этом были диагностированы скрытые очаги предрака, раннего рака и поверхностные рецидивы рака кожи - у 25,5% больных, верхних дыхательных путей - у 19,4%, скрытые очаги метастатического поражения плевры – у 57,2%, брюшины – у 15,5%.

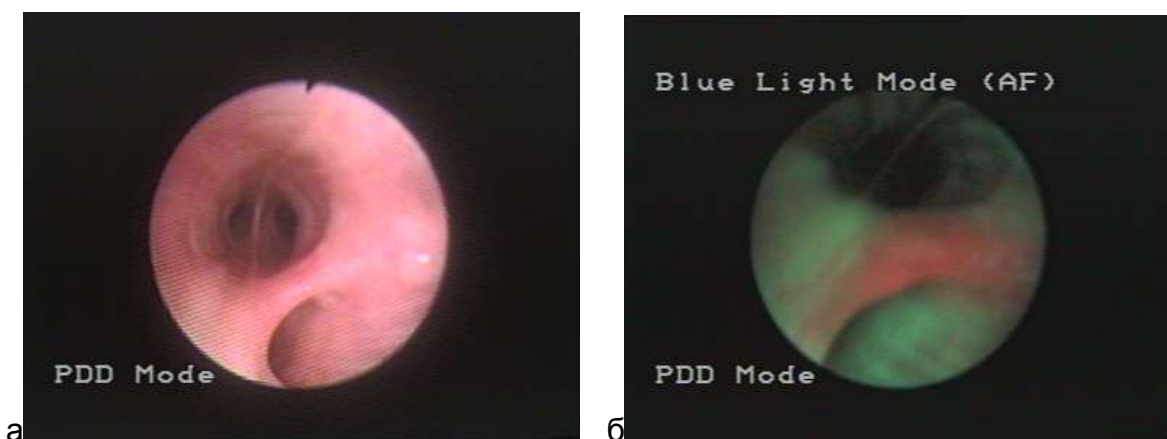


Рисунок 3. Сеанс флюоресцентной бронхоскопии: а – осмотр в белом свете; б – осмотр в режиме флюоресценции (красная флюоресценция скрытого очага дисплазии III ст. на шпоре сегментарного бронха).

Разработанная методика интраоперационной флуоресцентной диагностики позволяет проводить экспресс-определение метастатического поражения лимфатических узлов первого уровня с чувствительностью 87,2% и специфичностью – 94,8%.

В последние годы разработаны методики интраоперационной «флюоресцентной навигации» с препаратом Аласенс. В зависимости от поставленных задач метод используется либо для повышения радикализма хирургического вмешательства с целью полного удаления опухоли под флюоресцентным контролем, либо для определения границ резекции для предотвращения случайной травматизации или удаления здоровых тканей. Примером первого направления могут служить получившие широкое распространение хирургические вмешательства, когда производится удаление опухолей, например, головного мозга или мочевого пузыря под контролем флюоресценции. При этом имеется возможность визуализировать и удалить флюоресцирующие очаги остаточной опухолевой ткани в ложе резецированного опухолевого очага (при хирургическом лечении опухолей головного мозга) и/или диагностировать и удалить скрытые очаги рака на визуально не измененной в белом свете слизистой оболочке мочевого пузыря при проведении трансуретральной резекции во флуоресцентном режиме. Примером второго направления «флюоресцентной навигации» является определение во флуоресцентном режиме парашитовидных желез с целью их сохранения при хирургическом вмешательстве по поводу опухолей щитовидной железы.

Разработанные в МНИОИ им. П.А.Герцена медицинские технологии

флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии оказались востребованными в медицинских учреждениях. Подготовлена программа обучения специалистов. С 1995 по 2011 г.г. на базе МНИОИ им. П.А.Герцена прошли обучение 192 врача из медицинских учреждений разных городов России, 20 врачей из стран ближнего (3) и дальнего (17) зарубежья.

Для дальнейшего совершенствования метода фотодинамической терапии требуется поиск новых фотосенсибилизаторов, обладающих более высокой фотоактивностью, опухолетропностью, способностью к возбуждению в ближнем инфракрасном диапазоне спектра; создание высокочувствительной и надежной диагностической и терапевтической аппаратуры. Опыт клинического применения фотодинамической терапии показывает, что данный метод относится к одному из перспективных направлений в современной клинической онкологии.

Список литературы:

1. Raab O. Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. Z Biol. 1900; 39: 524
2. Tappeiner H v. Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von Raab. Muench Med Wochenschr 1900; 1: 5-7.
3. Tappeiner H v, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Muench Med Wochenschr 1903; 50: 2042-4.
4. Policard A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. C R Soc Biol 1924; 91: 1423-4.
5. Auler H, Banzer G. Untersuchungen ueber die Rolle der Porphyrine bei geschwulskranken Menschen und Tieren. Z Krebsforsch 1942; 53: 65-8.
6. Lipson R.L., Baldes E.J., Olsen A.M. A further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. Dis Chest 1964; 46: 676-9.
7. Lipson R.L., Pratt J.H., Baldes E.J. Dockerty M.B. Hematoporphyrin derivative for detection of cervical cancer. Obstet Gynecol 1964; 24: 78-84.
8. Dougherty T.J, Kaufmann J.E, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res. 1978; 38: 2628-35
9. Сухин Г.М., Черненко О.В., Ярцев Е.И. Фармакокинетика некоторых синтетических порфиринов, сборник IV Всесоюзной конференции по химии и применению порфиринов. Ереван, 1984г., стр. 230-231.

10. Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии. // Дисс. д-р мед. наук. - М., - 2006.

Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева), ТОМ LVII, №2, 2013г.