

ПРИМЕНЕНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В КОМБИНАЦИИ С МЕТОДИКОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПРИ ЦИСТОСКОПИИ

А.А. Теплов, Е.В. Филоненко, Б.Я. Алексеев, Р.В. Ульянов, Ю.Ю. Андреева
ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» МЗ РФ, г. Москва

Резюме

В работе описана разработанная в МНИОИ им. П.А. Герцена методика флуоресцентной визуализации опухолей мочевого пузыря в сочетании с флуоресцентной спектроскопией. Эффективность предложенной методики подтверждена результатами диагностики 198 больных поверхностным раком мочевого пузыря. В исследуемой группе 67 пациентов имели первичный опухолевой процесс, 131 больной – рецидив поверхностного рака мочевого пузыря после ранее проведенного лечения. У 3,5% пациентов опухолевой процесс был представлен *carcinoma in situ*, у 29,5% – неинвазивной папиллярной карциномой, рак мочевого пузыря с инвазией в подслизистый слой стенки мочевого пузыря был диагностирован в 67% случаев. Диагностика проводилась через 1,5–2 ч после инстилляций в мочевой пузырь 3%-го раствора препарата аласенс в объеме 50 мл. Анализ данных производился путем расчета диагностического параметра и флуоресцентной контрастности опухоль/норма. Всего в процессе исследования было измерено 528 спектров флуоресценции. Все обнаруженные очаги флуоресценции подвергались морфологическому исследованию. При проведении флуоресцентной спектроскопии выявлено 53 очага флуоресценции на визуально не измененной слизистой при осмотре в белом свете, характеризовавшихся большими значениями величины диагностического параметра. При морфологическом исследовании данных участков подтверждена тяжелая дисплазия (в 3% очагов), *carcinoma in situ* (в 95%) и рак мочевого пузыря (в 2%). Изучена корреляция данных локальной флуоресцентной спектроскопии и морфологического исследования биоптатов, проведена оценка значений диагностического параметра, характеризующих неизмененный уротелий, очаги воспаления, умеренной и тяжелой дисплазии и рака мочевого пузыря. Применение локальной флуоресцентной спектроскопии в комбинации с методикой визуального определения флуоресцентного изображения позволило повысить специфичность цистоскопии с 70% до 85%, общую точность – с 80% до 86%, при этом предсказательная ценность положительного результата возросла с 0,67 до 0,94.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, локальная флуоресцентная спектроскопия, рак мочевого пузыря, аласенс.

Введение

По частоте встречаемости рак мочевого пузыря занимает 4-е место в мире после рака предстательной железы, рака легкого и рака прямой кишки. С 1996 г. по 2006 г. прирост показателя заболеваемости данной патологией составил 22,6%. В России в 2009 г. заболеваемость раком мочевого пузыря составила 2,6%. При этом, 64,6% больных на момент установления диагноза имеют I-II ст. заболевания [1].

Одной из важных проблем в лечении рака мочевого пузыря является высокая частота развития ранних рецидивов (70-80%). Частота рецидивирования и прогрессирования рака мочевого пузыря

значительно зависит от мультицентричного роста опухоли, размера, наличия предшествующих рецидивов, категории T, степени злокачественности опухоли. Большинство рецидивов рака мочевого пузыря – это пропущенные или резидуальные опухоли, что делает актуальным поиск эффективных методов визуализации и диагностики рака мочевого пузыря [2,3].

До недавнего времени цистоскопию в белом свете считали стандартным методом визуализации и диагностики немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. Однако, низкие показатели чувствительности и специфичности этого метода (до

50%), сложность выявления плоских поверхностных образований, включая рак in situ, отсутствие возможности отличить их от доброкачественных новообразований слизистой оболочки мочевого пузыря способствовали разработке флуоресцентной диагностики (ФД) с применением различных фотосенсибилизаторов [4-6].

Много лет назад была выявлена связь между накоплением порфиринов, вызванным нарушениями в синтезе гема, и фоточувствительностью (порфириями). Ключевую роль в возникновении фоточув-

ствительности играет протопорфирин IX (ППИХ). В настоящее время фотосенсибилизирующие свойства ППИХ используют в виде предшественников, которые захватываются тканями и конвертируются в ППИХ.

На ранних этапах синтеза гема синтезируется 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК), которая служит фактором, ограничивающим скорость образования гема (рис. 1). Таким образом, введение экзогенной 5-АЛК позволяет обойти этапы, ограничивающие скорость реакции. 5-АЛК, введенная

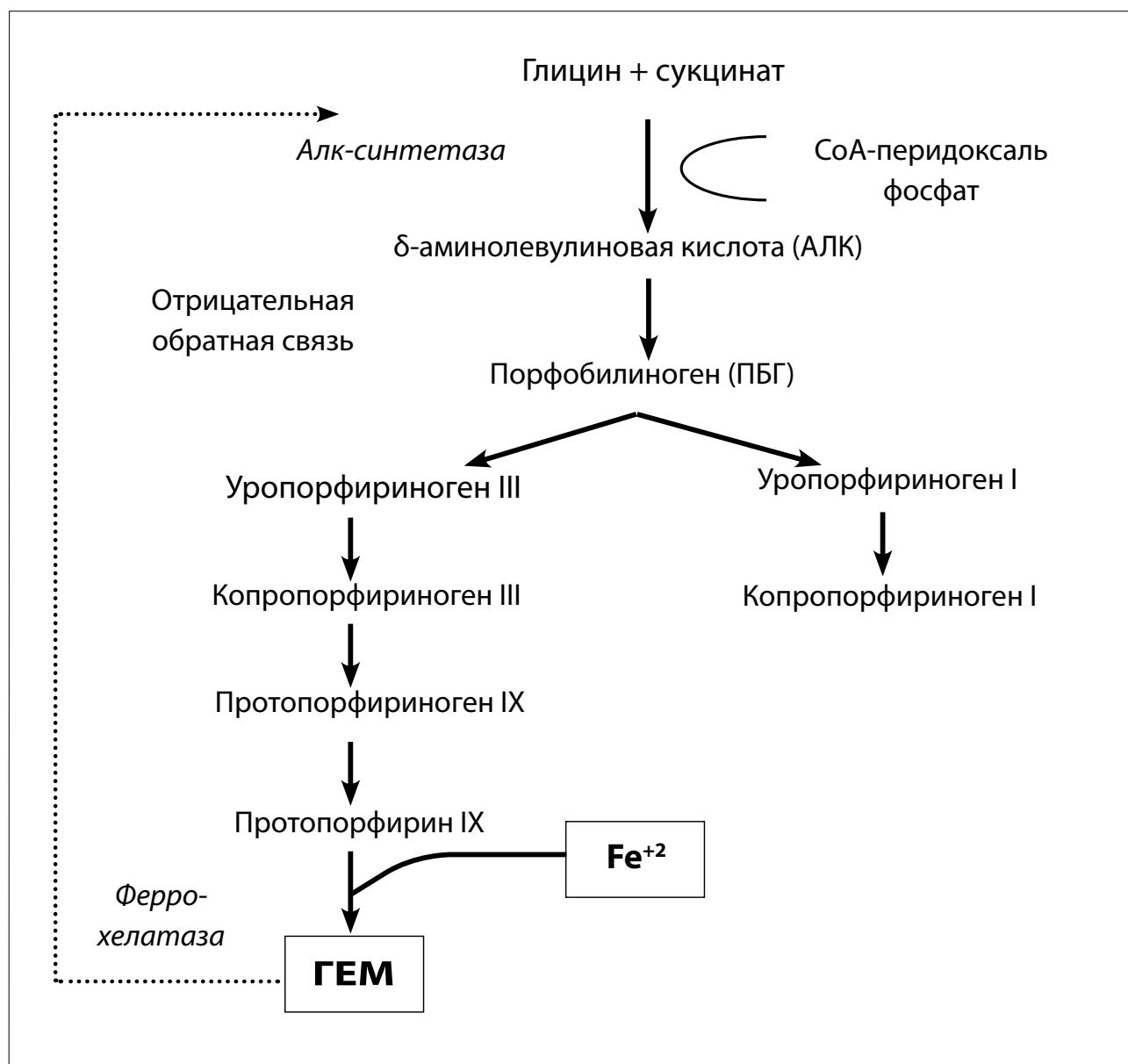


Рис. 1. Схема синтеза гема

местно или системно, неселективно захватывается клетками и метаболизируется в фоточувствительный ППХ ферментной системой.

Несмотря на то, что процесс захвата 5-АЛК неселективный, накопление ППХ в опухолевых клетках происходит селективно из-за изменений в активности ферментов каскада синтеза гема. Предполагают, что в опухолевой ткани повышена активность порфобилиногендезаминазы. Порфобилиногендезаминаза синтезирует предшественник ППХ, что повышает образование ППХ. Далее накопление ППХ в опухолевой ткани усиливается за счет сниженной активности феррохелатазы, конвертирующей ППХ в гем. Другой возможный механизм селективного поглощения 5-АЛК при ее местном применении связывают с поврежденным роговым слоем эпидермиса при опухолях кожи.

Многообещающие результаты показали исследования с использованием 5-АЛК и ее производных, которые метаболизируются в фотоактивный ППХ, интенсивно флуоресцирующий в красной области спектра [7].

ФД с 5-АЛК и ее производными в синем свете позволяет провести осмотр большой площади слизистой оболочки мочевого пузыря, как и рутинная цистоскопия в белом свете, но, в отличие от последней, она позволяет выделить подозрительные очаги и отличить их от окружающей интактной слизистой оболочки. По данным различных авторов чувствительность ФД рака мочевого пузыря достигает 90%, при этом специфичность метода не превышает 65% [8]. Кроме того, одним из ограничений метода служит субъективность оценки интенсивности окрашивания. Все это стало причиной дальнейшего развития ФД с изучением различных подходов повышения специфичности ФД с 5-АЛК и ее производными [9].

Одним из методологических подходов повышения эффективности ФД рака мочевого пузыря стало сочетание флуоресцентной визуализации с локальной флуоресцентной спектроскопией.

Материалы и методы

В МНИОИ им. П.А. Герцена разработана методика ФД рака мочевого пузыря с препаратом на основе 5-АЛК – аласенсом, сочетающая флуоресцентную визуализацию с локальной флуоресцентной спектроскопией. В исследование включено 198

больных поверхностным раком мочевого пузыря, из них 67 пациентов были с первичной опухолью, 131 — с рецидивом заболевания после предшествующего лечения.

Всем пациентам за 1,5-2 ч до цистоскопии в мочевой пузырь вводили 50 мл 3%-го раствора препарата аласенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия). По истечении времени экспозиции проводили цистоскопию в белом свете, затем проводили визуальную оценку флуоресценции в синем свете с использованием эндоскопической аппаратуры производства «Karl Storz GmbH» (Германия). Завершающим этапом с помощью спектрально-флуоресцентной диагностической установки «Спектр-Кластер» (ООО «Кластер», Россия) выполняли измерения спектров во всех очагах красной флуоресценции и на поверхности интактной слизистой оболочки мочевого пузыря. Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 460-900 нм при возбуждении с длиной волны 442 нм. Во время локальной спектроскопии у каждого пациента записывали в среднем 25-30 спектров с расчетом диагностического параметра. Всего было измерено и записано 528 спектров флуоресценции. Исследование заканчивали взятием биоптатов из всех очагов флуоресценции и интактной слизистой оболочки мочевого пузыря для планового гистологического исследования.

Результаты

При выполнении флуоресцентной цистоскопии и локальной флуоресцентной спектроскопии осложнений не было. Кожной фоточувствительности, связанной с применением препарата на основе 5-АЛК, ни у одного пациента зарегистрировано не было.

При флуоресцентной цистоскопии очаги воспаления, папиллом, дисплазии и рака визуализировались по характерной флуоресценции 5-АЛК-индуцированного ППХ. По сравнению с рутинной цистоскопией ФД позволила выявить дополнительно 53 очага со слабой флуоресценцией, но большими значениями величины диагностического параметра. При морфологическом исследовании данных участков в 3% очагов подтверждена тяжелая дисплазия, в 95% – carcinoma in situ и в 2% – рак мочевого пузыря.

Изучена корреляция данных локальной флуоресцентной спектроскопии и результатов морфологического исследования биоптатов. Чувствитель-

ность метода составила 94%, специфичность – 85%, общая точность – 86%, предсказательная ценность положительного результата – 0,94; данные показатели при проведении цистоскопии в белом свете составили: 67%, 70%, 80% и 0,67 соответственно.

Клинические примеры

Клинический пример №1

Больному Р., 69 лет, по поводу рака мочевого пузыря I ст. $T_1N_0M_0$ 11.03.2015 была выполнена ТУР мочевого пузыря. Через 6 мес пациент обратился в МНИОИ им. П.А. Герцена для контрольного осмотра и обследования. В течение нескольких месяцев отмечает периодическое появление крови в моче. По данным УЗИ мочевого пузыря от 10.09.2015: при исследовании мочевого пузыря на передней стенке визуализируется опухолевое образование размером до 10x7 мм, толщиной до 3 мм, расположенное в пределах слизисто-подслизистого слоя. В остальных отделах – без признаков дополнительных образований. Пациенту выполнена цистоскопия в белом свете с последующей флуоресцентной визуализацией и локальной флуоресцентной спектроскопией с препаратом аласенс по разработанной методике. При цистоскопии в белом свете получены следующие данные: емкость мочевого пузыря 250 мл. При осмотре: на передней и левой боковой стенках визуализируются опухолевые образования. В остальных отделах мочевого пузыря без очаговой патологии. При осмотре в синем свете яркая красная флуоресценция зарегистрирована в очаге, подозрительном на наличие опухолевого роста по передней стенке, границы флуоресценции совпадают с границами очага, выявленного в белом свете. Дополнительно визуализируется очаг флуоресценции на левой боковой стенке, с различной степенью интенсивности (рис. 2). При флуоресцентной спектроскопии выполнена запись 30 спектров (23 спектра с очага, выявляемого в белом и синем свете, 2 спектра с участка флуоресценции в синем свете, 2 спектра с интактной слизистой оболочки). Во всех очагах флуоресценции рассчитанный диагностический параметр имел высокие значения (12,7-14,3 усл. ед.) Из 2 патологических очагов взята биопсия. По данным планового гистологического исследования № Ц 1123/Б: в очаге на передней стенке мочевого пузыря уротелиальная карцинома G_2 , в очаге на

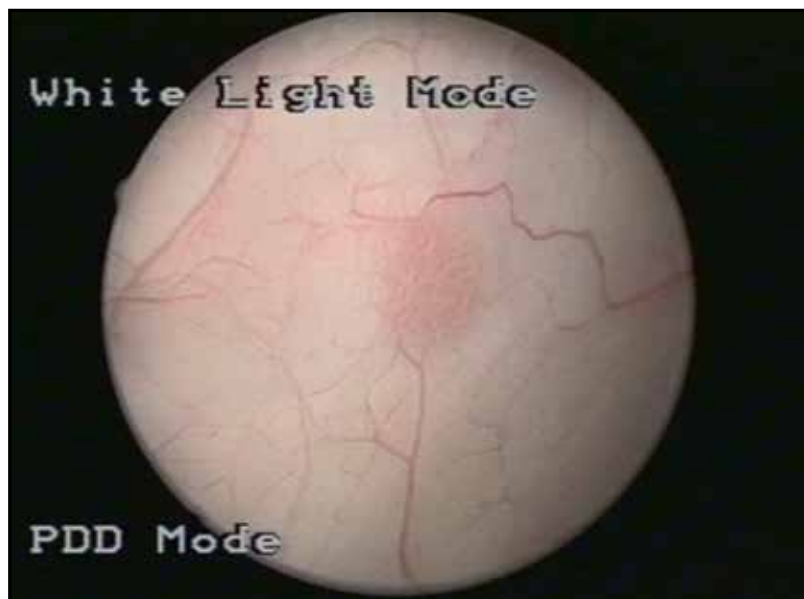
левой боковой стенке обнаружен рост карциномы in situ.

Клинический пример №2

Больной А., 69 лет, в апреле 2012 г. обратился к урологу по месту жительства с жалобами на учащенное мочеиспускание. В связи с подозрением на онкопатологию для обследования и выработки тактики лечения пациент направлен в МНИОИ им. П.А. Герцена. При выполнении УЗИ мочевого пузыря от 14.05.2012: контуры ровные, четкие. УЗ-признаков конкрементов не выявлено. Мочеточниковые выбросы зафиксированы с обеих сторон. В области левой стенки мочевого пузыря визуализируется эхопозитивное объемное образование, с четкими ровными контурами размерами 14x18x21 мм с низкорезистивным кровотоком. Пациенту выполнена цистоскопия в белом свете с флуоресцентной визуализацией и локальной флуоресцентной спектроскопией с препаратом аласенс по разработанной методике. При цистоскопии в белом свете получены следующие данные: емкость мочевого пузыря 250 мл. Слизистая мочевого пузыря розовая, гладкая, расправляется при наполнении. По левой стенке, выше устья левого мочеточника визуализируется папиллярное опухолевое образование на широком основании, размерами до 2 см. В остальных отделах мочевого пузыря без видимой патологии. При осмотре в синем свете яркая красная флуоресценция зарегистрирована в очаге, подозрительном на наличие опухолевого роста, границы флуоресценции шире границ очага, определяемых в белом свете, на 0,5 см. Дополнительных очагов флуоресценции не выявлено (рис. 3). При флуоресцентной спектроскопии выполнена запись 25 спектров (23 спектра с очага, подозрительного на наличие опухолевого роста, 2 спектра с интактной слизистой оболочки). Рассчитанный диагностический параметр для патологического очага был высоким (17,5 усл. ед.). Выполнена биопсия новообразования. По данным планового гистологического исследования № А 674/Б: сосочковая уротелиальная карцинома G_1 .

Клинический пример №3

Больной М., 40 лет, по поводу рака мочевого пузыря I ст. $T_1N_0M_0$ 26.06.2009 г. была выполнена ТУР мочевого пузыря. Через 38 мес. в



а

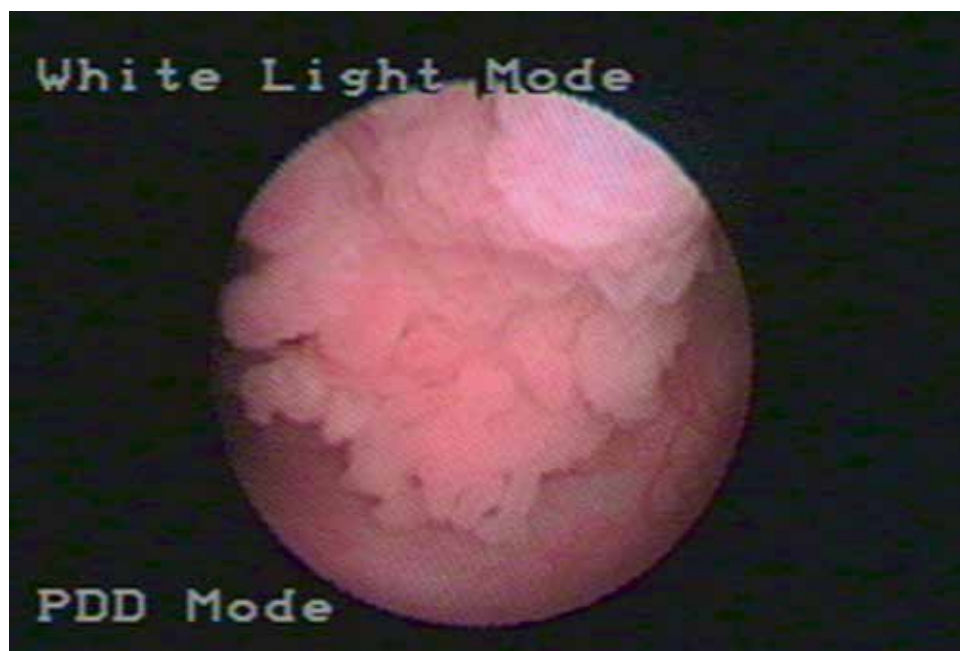


б

Рис. 2. Флуоресцентная диагностика при раке мочевого пузыря in situ:
 а – осмотр в белом свете;
 б – красная флуоресценция опухоли при осмотре в синем свете

связи с появлением жалоб на учащенное мочеиспускание повторно обратился в МНИОИ им. П.А. Герцена. По данным УЗИ мочевого пузыря от

10.08.2013: мочевой пузырь наполнен до 250 мл. Контуры ровные, четкие. УЗ-признаков конкрементов не выявлено. На передне-боковой стенке моче-



а

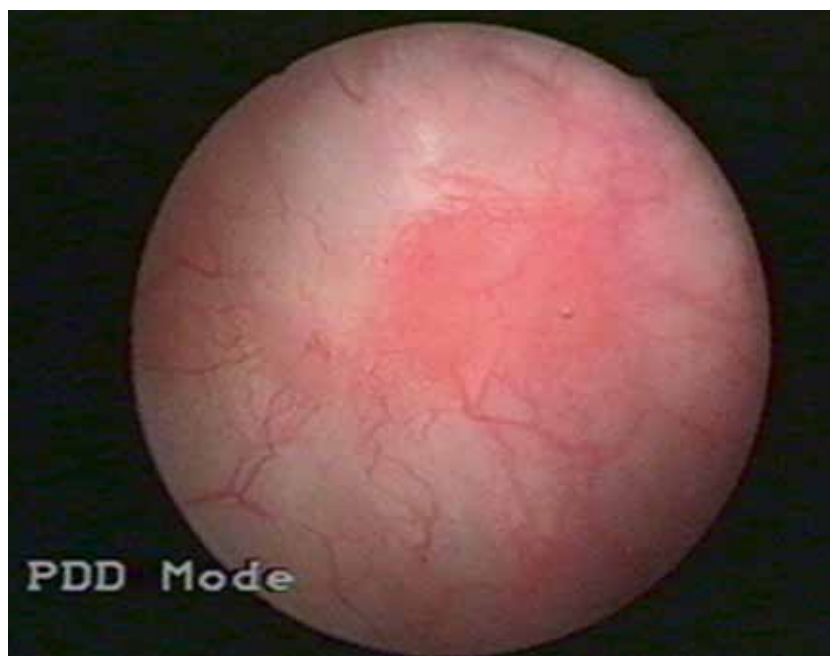


б

Рис. 3. Флуоресцентная диагностика при раке мочевого пузыря $T_{1a}N_0M_0$:
 а – осмотр в белом свете;
 б – красная флуоресценция опухоли при осмотре в синем свете

вого пузыря визуализируется эхопозитивное объемное образование, с четкими неровными контурами, по типу «цветной капусты», диаметром 16х18х21 мм.

Пациенту выполнена цистоскопия в белом свете с флуоресцентной визуализацией и локальной флуоресцентной спектроскопией с препаратом аласенс по



а



б

Рис. 4. Флюоресцентная диагностика при раке мочевого пузыря in situ:
а – осмотр в белом свете;
б – красная флюоресценция опухоли при осмотре в синем свете

разработанной методике. При цистоскопии в белом свете получены следующие данные: емкость мочевого пузыря 250 мл. При осмотре: в области верхушки

с переходом на левую боковую стенку визуализируется участок опухолевых изменений слизистой диаметром до 2 см. Устья обоих мочеточников визуализиру-

ются, функционирует адекватно. В остальных отделах мочевого пузыря без очаговой патологии. При осмотре в синем свете яркая красная флуоресценция зарегистрирована в очаге, подозрительном на наличие опухолевого роста, границы флуоресценции совпадают с границами очага, выявленного в белом свете. Дополнительно визуализируется очаг флуоресценции на правой боковой стенке (рис. 4). При флуоресцентной спектроскопии выполнена запись 30 спектров (23 спектра с очага, выявляемого в белом и синем свете, 2 спектра с участка флуоресценции в синем свете, 2 спектра с интактной слизистой оболочки). Во всех флуоресцирующих очагах рассчитанный диагностический параметр превышал пороговое значение (11,2-18,4 усл. ед.). Из 2 патологических очагов взята биопсия. По данным планового гистологического исследования № Ц 1123/Б: карцинома in situ.

Приведенные клинические примеры показали, что ФД с препаратом аласенс позволила выявить очаги рака мочевого пузыря, не определяемые при

осмотре в белом свете, а также определить границы опухолевого поражения слизистой оболочки мочевого пузыря. Флуоресцентная спектроскопия позволила определить участки опухолевого поражения в зонах с визуальной «слабой» флуоресценцией.

Заключение

Методика ФД рака мочевого пузыря с препаратом на основе 5-АЛК, сочетающая флуоресцентную визуализацию с локальной флуоресцентной спектроскопией, безопасна и хорошо переносится больными. Высокие показатели чувствительности и специфичности разработанной методики позволяют выявлять очаги роста злокачественной опухоли, не определяемые в белом свете. Сочетание флуоресцентной визуализации с локальной флуоресцентной спектроскопией позволяет выполнять прицельные биопсии, а также осуществлять динамический контроль у пациентов группы высокого риска рецидива рака мочевого пузыря.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петров Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2009 году. – М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2010. – С. 19–31.
2. Кудашев Б.В., Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Романов В.А., Рубанов Ю.В. Роль флуоресцентного контроля в повышении радикализма оперативного лечения поверхностного рака мочевого пузыря // Урология. – 2000. – № 3. – С. 22.
3. Dindyal S., Nitkunan T., Bunce C.J. The economic benefit of photodynamic diagnosis in non-muscle invasive bladder cancer // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2008. – 5 (2). – P. 153–158.
4. Nseyo U., Dehaven J., Dougherty T. Photodynamic therapy (PDT) in the management of patients with resistant superficial bladder cancer: a long term experience // J. Clin. Laser. Med. Surg. – 1998. – Vol. 16. – P. 61–8.
5. Baert L., Berg R., Van Damme B. et al. Clinical fluorescence diagnosis of human bladder carcinoma following low-dose Photofrin injection // Urology. – 1993. – Vol. 41. – P. 322–330.
6. Чиссов В.И., Соколов В.В., Булгакова Н.Н., Филоненко Е.В. Флуоресцентная эндоскопия, дермаскопия и спектрофотометрия в диагностике злокачественных опухолей основных локализаций // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, №4. – С. 45–56.
7. Datta S.N., Loh C.S., MacRobert A.J. et al. Quantitative studies of the kinetics of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in bladder transitional cell carcinoma // Br. J. Cancer. – 1998. – Vol. 78. – P. 1113–1118.
8. Zaak D., Frimberger D., Stepp H. et al. Quantification of 5-aminolaevulinic acid induced fluorescence improves the specificity of bladder cancer detection // J. Urol. – 2001. – Vol. 166. – P. 1665–1669.
9. Frimberger D., Zaak D., Stepp H. et al. Autofluorescence imaging to optimize 5-ALA-induced fluorescence endoscopy of bladder carcinoma // Urology. – 2001. – Vol. 58. – P. 372–375.

THE USE OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN COMBINATION WITH FLUORESCENCE VIZUALIZATION FOR CYSTOSCOPY

A.A. Teplov, E.V. Filonenko, B.Ya. Alekseev, R.V. Ulianov, Yu.Yu. Andreeva
P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Moscow

The method of fluorescence visualization of bladder tumors combined with fluorescence spectroscopy developed in P.A. Herzen MCRI is described. The efficacy of the method was proved by results of diagnostics in 198 patients with superficial bladder cancer. In the study group 67 patients had primary tumor, 131 patients had recurrence of superficial bladder cancer after previous treatment. In 3.5% patients the lesion was determined as carcinoma in situ, in 29.5% – non-invasive papillary carcinoma, bladder cancer with invasion into submucosal layer of bladder wall occurred in 67% of cases. Diagnostics was performed 1.5–2 h after instillation of 50 ml 3% solution of alasens into bladder. The data analysis was made with calculation of the diagnostic parameter and value of tumor/normal mucosa fluorescence contrast. The total number of fluorescence spectra accounted for 528. All determined areas of fluorescence were studied morphologically. During fluorescence spectroscopy 53 areas of fluorescence were determined on visually intact mucosa under white light, showed high values of diagnostic parameter. Morphological study proved severe dysplasia (3%), carcinoma in situ (95%) and bladder cancer (2%). Correlation between data of local fluorescence spectroscopy and morphological study of biopsy specimen was assessed, values of diagnostic parameter, характеризующих intact urothelium, areas of inflammation and moderate dysplasia, severe dysplasia and bladder cancer were estimated. Local fluorescence spectroscopy combined with visual assessment of fluorescence image allowed to increase specificity of cystoscopy from 70% to 85%, total accuracy – from 80% to 86%, with improvement of predictive value for positive result from 0,67 to 0,94.

Keywords: fluorescence diagnosis, local fluorescence spectroscopy, bladder cancer, alasens.

Контакты: Теплов А.А. E-mail: ateplov@yandex.ru