

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ЛЕЧЕНИЯ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРЕДРАКА И РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

И.П. Аминодова, С.А. Аминодов

ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер», Иваново

ООО «Клиника современной медицины», Иваново

Резюме

Проведено комплексное исследование с целью оптимизации параметров фотодинамического воздействия с препаратом фотодитазин у пациенток с опухолевой и предопухолевой патологией шейки матки. В исследование включены 52 пациентки: у 34 диагностированы преинвазивные заболевания шейки матки (CIN I – у 9, CIN II – у 13, CIN III – у 12), у 11 – верифицирован рак шейки матки (у 8 – плоскоклеточный рак, у 3 – аденокарцинома цервикального канала), у 7 – хронический цервицит. Исследуемый препарат в виде 0,5% геля наносили на шейку матки в объеме 1 мл. С целью определения оптимального интервала времени от нанесения геля до проведения фотодинамического воздействия изучали динамику накопления и выведения фотосенсибилизатора по его флуоресценции. Показано, что фотодитазин хорошо накапливается в патологических тканях. Максимум накопления препарата был отмечен через 30 мин, сохранялся около 15 мин, а затем постепенно снижался. Максимальный уровень флуоресценции фотосенсибилизатора отмечен в очагах злокачественной опухоли и тяжелой интраэпителиальной неоплазии. Для определения оптимальной световой дозы при облучении проведено цитологическое исследование мазков отпечатков с биопсийного материала после светового воздействия в различных световых дозах. Показано, что минимальная световая доза, необходимая для активации каскада фотохимических реакций, составляет 100 Дж/см², а оптимальная – 250 Дж/см². Эта доза позволила уничтожить все атипические клетки, находящиеся в зоне светового воздействия после нанесения геля фотодитазина. Полученные данные позволили сделать вывод, что наиболее эффективным режимом фотодинамической терапии с местной аппликацией препарата фотодитазин-гель для лечения дисплазии и преинвазивного рака шейки матки является доза лазерного облучения 250 Дж/см² при продолжительности времени аппликации 30–45 мин.

Ключевые слова: рак шейки матки, флуоресцентная диагностика, фотодинамическая терапия, фотодитазин.

Введение

Рак шейки матки (РШМ) остается одной из самых актуальных проблем в онкогинекологии. В общей структуре онкологической заболеваемости женщин злокачественные опухоли шейки матки составляют около 20% и стабильно занимают 2-е место среди поражений органов репродуктивной системы после рака эндометрия. В России в течение последних десятилетий ежегодно выявляют до 15 тыс. больных РШМ, что составляет около 6–7% от общего числа онкологических больных [1–3].

Четко прослеживается рост заболеваемости РШМ среди женщин в возрастной группе до 40 лет. Увеличение числа заболевших женщин является тревожным фактом, так как данный контингент пациенток представляет собой не только репродуктивно значимую часть женского населения, но и активную в социальном отношении группу [4, 5].

Показатели заболеваемости в отдельных регионах России имеют некоторые различия. Так, заболеваемость РШМ в Ивановской области превышает среднестатистический показатель по стране и имеет устойчивую тенденцию к росту. Заболеваемость РШМ в Ивановской области в 2009 г. составила 24,8 случаев на 100 000 женского населения. В 2010 г. было

отмечено некоторое его снижение до 22,3 случаев на 100 000 женского населения, в 2011 г. – 22,2, однако у 38,7% женщин диагностированы распространенные (III–IV) стадии опухолевого процесса. Показатели запущенности РШМ по Российской Федерации за исследуемый период были достоверно ниже и составили 29,5% в 2008 г., и 29,0% в 2010 г. [6].

Считается, что иницирующим фактором развития цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) и РШМ является инфицирование онкогенными штаммами вируса папилломы человека (ВПЧ). ВПЧ – эпителиотропный вирус, способный поражать клетки эпителия эктодермального происхождения (кожа, слизистые оболочки половых органов, ротовой полости) [6]. По данным разных авторов [8], вирус обнаруживается в 97,8–100% образцов опухоли. На основании вероятности вызывать предраковые изменения и инвазивный рак, типы ВПЧ были сгруппированы следующим образом: высокого, умеренного и низкого онкологического риска [9].

Развитие опухолевого процесса происходит в течение довольно длительного промежутка времени с момента инфицирования женщины ВПЧ и занимает от 5 до 10 лет, однако, при воздействии дополнитель-

ных неблагоприятных факторов может значительно сокращаться вплоть до нескольких месяцев [10].

В связи с актуальностью данной проблемы назрела первостепенная необходимость свести к минимуму заболеваемость и смертность от РШМ за счет усовершенствования методов лечения дисплазий и преинвазивного рака на ранних этапах развития, избегая тем самым возникновения инвазивного рака.

Приоритетным направлением развития науки в настоящее время является поиск новых методов лечения злокачественных опухолей, основанных на использовании последних достижений медицинских технологий в области химии, биологии и квантовой физики. Одним из перспективных направлений для решения данных задач является разработка метода фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных опухолей с применением природных и синтетических фотосенсибилизаторов. Принцип действия ФДТ состоит во взаимодействии фотосенсибилизатора (ФС), предварительно введенного в организм пациентки, со световым излучением определенной длины волны, в результате чего происходит образование синглетного кислорода и других цитотоксических продуктов. Процесс протекает следующим образом: ФС аккумулируется преимущественно в неопластических тканях или в сосудах в области неопластически измененных тканей и активируется под воздействием света. В результате поглощения фотонов ФС переходит из своего основного состояния в возбужденное, более высокое энергетическое состояние. При взаимодействии ФС, находящегося в возбужденном состоянии, с кислородом образуются высокоактивные формы кислорода, как, например, крайне цитотоксичный продукт – синглетный кислород. Наряду с ним могут образовываться такие активные формы кислорода, как супероксид и гидроксирадикалы, которые также вносят существенный цитотоксический эффект [11–12].

Возможности применения ФДТ при лечении опухолевых и предопухолевых заболеваний шейки матки активно исследуются как в России, так и за рубежом [13–15].

Таким образом, ФДТ является перспективным функционально-щадящим методом лечения, который требует тщательного всестороннего изучения возможностей применения в онкогинекологии.

Целью настоящего исследования явилось изучение накопления фотосенсибилизатора фотодитазина в патологических новообразованиях шейки матки при использовании локальной флуоресцентной спектроскопии, которая позволяет детектировать уровень накопления фотосенсибилизатора в тканях шейки матки.

Материал и методы

На первом этапе нами проведено исследование динамики накопления и выведения препарата фотодитазин при нанесении его в виде геля у 52 пациенток, которым в последующем выполняли эксцизионную

биопсию шейки матки с выскабливанием цервикального канала. Все больные давали информированное согласие на проведение исследования.

Фотодитазин наносили на шейку матки в объеме 1 мл 0,5% геля за 30, 45, 60 и 120 мин до проведения биопсии шейки матки. Производили биопсию, а затем проводили спектроскопию биопсийного материала.

Для проведения локальной флуоресцентной спектроскопии использовали спектрально-флуоресцентную установку «Спектр-Кластер» для диагностики злокачественных новообразований, которая позволяет регистрировать спектр экзогенной флуоресценции введенного препарата. В состав устройства входит: спектрометр, лазерный источник, гибкий волоконно-оптический катетер для доставки лазерного излучения и сбора флуоресценции, He-Ne лазер «Алок», персональный компьютер с программным обеспечением LightView-Med. Для возбуждения флуоресценции фотодитазина применяли лазерное излучение длиной волны 636,5 нм. Мощность лазерного излучения с конца волоконно-оптического катетера составляла 3 мВт, время экспозиции – 60 мс, пространственное разрешение при сканировании поверхности ткани с помощью волоконно-оптического катетера – 1 мм.

В процессе исследования измеряли нормированные спектры флуоресценции (FN) биологических тканей по методике для непигментированных мягких тканей при терапевтических концентрациях экзогенного флуоресцентного маркера. При этом уровень флуоресценции определялся отношением интегральной интенсивности излучения флуоресценции фотосенсибилизатора (для фотодитазина 655–780 нм) к интегральной интенсивности обратного диффузно-рассеянного сигнала возбуждающего лазерного излучения, который в нашей работе составил 636,5 нм.

При проведении измерений экзогенной флуоресценции удаленных тканей проводили сканирование возбуждающим флуоресценцию лазером по поверхности тканей, а также вдоль разрезов. При этом, измеряли до 40 спектров флуоресценции, на основании которых рассчитывали среднюю величину нормированной флуоресценции FN для каждого типа тканей.

Результаты и обсуждение

С учетом данных гистологического исследования нозологические формы распределились следующим образом: у 34 пациенток диагностированы преинвазивные заболевания шейки матки: CIN I – у 9, CIN II – у 13, CIN III – у 12 женщин. У 11 обследованных больных верифицирован РШМ: у 8 – плоскоклеточный рак, у 3 – аденокарцинома цервикального канала. У 7 пациенток выявлен хронический цервицит.

При анализе флуоресценции препарата выявлено, что при местном нанесении в виде геля фотосенсибилизатор накапливается в тканях, достигая максимума накопления через 30 мин независимо от гистологической формы заболевания. В участках воспаления

отмечается незначительное колебание показателей нормированной флуоресценции в зависимости от времени измерения. Максимальный уровень флуоресценции фотосенсибилизатора отмечается в очагах злокачественной опухоли и тяжелой интраэпителиальной неоплазии. Участки CIN II–III и рака максимально накапливают фотодитазин через 30 мин и наиболее высокие показатели концентрации сохраняются через 45 мин. Затем величина нормированной флуоресценции начинает снижаться (см. таблицу).

Динамика накопления и выведения препарата при плоскоклеточном раке и аденокарциноме достоверно не различалась.

На втором этапе работы мы провели цитологическое исследование мазков отпечатков с биопсийного материала пациенток с тяжелой дисплазией (CIN II–III) и РШМ после светового воздействия в различных дозах.

Минимальная световая доза, необходимая для активации каскада фотохимических реакций при CIN II–III отмечена при плотности энергии 100 Дж/см². При этом в цитограмме регистрировались изменения, сходные с проявлениями лучевого патоморфоза. Наиболее отчетливые изменения отмечались в ядрах клеток. Они характеризовались увеличением размера

ядер, неравномерном уплотнении ядерного края, побледнении и вакуолизации ядер. При увеличении времени воздействия и повышении плотности энергии эффективность фотодинамического воздействия возрастала. Наряду с появлением пикноза и фрагментации ядер регистрировалась лейкоцитарная инфильтрация цитоплазмы, возрастание ядерно-плазматического отношения, многоядерность клеток. При плотности энергии 150 Дж/см² отмечена деструкция более чем половины атипических клеток, при увеличении параметров воздействия до 200 Дж/см² – разрушение большинства атипических клеточных элементов. При цитологическом исследовании обнаруживались дисконтактация клеток, появление большого числа клеток-гигантов с вакуолизированной цитоплазмой и резко выраженным полиморфизмом ядер. Оптимальной световой дозой при дисплазии являлась плотность энергии 250 Дж/см². Эта доза позволяла уничтожить все атипические клетки, находящиеся в зоне светового воздействия на фоне введенного фотодитазина (рис. 1).

Морфологические изменения в структуре ткани CIN II при подведении световой дозы 250 Дж/см² характеризовались резким нарушением структуры атипических клеток за счет некроза и резких дис-

Таблица

Динамика накопления фотосенсибилизатора при внутривенном введении

Время, мин	Нозологическая форма				
	Воспаление (n=7)	CIN I (n=9)	CIN II (n=13)	CIN III (n=12)	РШМ (n=11)
До введения	0,6±0,1	0,7±0,1	0,8±0,2	0,8±0,1	1,1±0,1
30	1,7±0,2	2,1±0,3	14,5±3,7	22,8±6,3	23,6±2,2
45	1,7±0,1	2,0±0,5	14,1±4,1	23,1±4,7	23,3±1,4
60	1,3±0,3	1,7±0,4	11,9±1,7	21,4±2,9	22,5±0,8
120	0,9±0,1	1,2±0,2	7,4±2,4	15,4±3,1	19,4±0,8

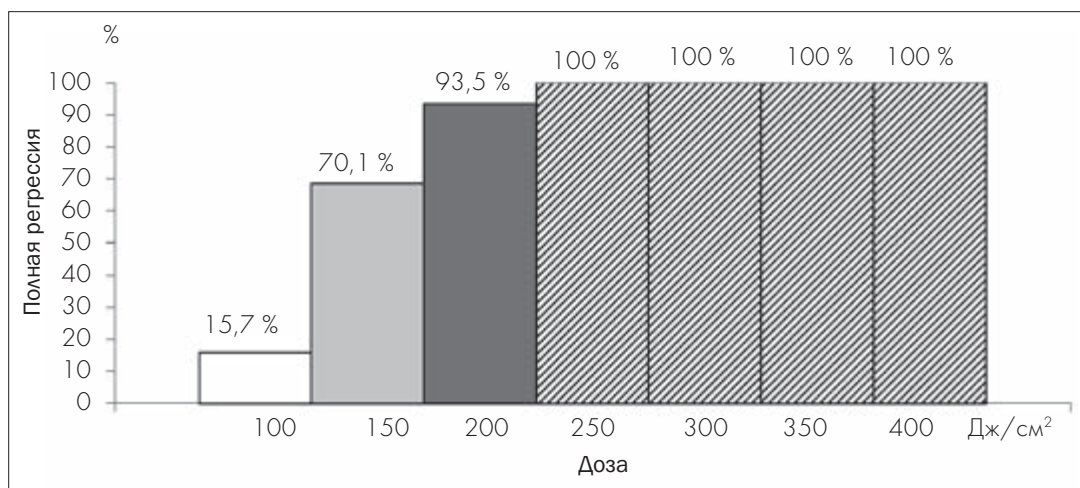


Рис. 1. Эффективность ФДТ больных с умеренной интраэпителиальной неоплазией (CIN II) в зависимости от дозы света

трофических изменений опухолевых клеток. В большинстве клеток отмечалось появление клеточного детрита, тотальной вакуолизации ядер, их фрагментации и разрывов ядерной мембраны; большинство клеток становились многоядерными. Большие дозы света оказались эффективными, но приводили к повреждению нормальных клеток. При повышении дозы световой энергии до 300 Дж/см² и выше отмечена полная гибель атипических клеток, однако при этом выраженные дистрофические и некротические процессы развивались и в окружающих клетках.

Проведение эксперимента по оценке дозы световой энергии, необходимой для полноценной активации фотосенсибилизатора в опухолевых клетках, выявило необходимую минимальную плотность энергии в дозе 100 Дж/см² (рис. 2). При этом, явления пикноза ядер, возрастание ядерно-плазматического отношения, побледнение цитоплазмы и дисконтактация клеточных структур отмечались в 47,4% клеток. При плотности световой энергии 150 Дж/см²

отмечались изменения в 76,3% клеток по типу лучевого патоморфоза. При увеличении плотности энергии до 200 Дж/см² в 82,7% облученных клеток отмечены выраженный полиморфизм ядер, их вакуолизация, изменения в структуре ядрышек и цитоплазмы, резкие дистрофические изменения. Морфологические изменения опухолевых клеток при дозе световой энергии 250 Дж/см² характеризовались тотальным некрозом. Последующее повышение дозы световой энергии не увеличивало эффективность ФДТ, но приводило к увеличению времени воздействия и повреждению здоровых клеток.

Результаты

Полученные данные позволяют сделать вывод, что наиболее эффективным режимом ФДТ с местной аппликацией препарата фотодитазин-гель для лечения дисплазии и преинвазивного РШМ является доза лазерного облучения 250 Дж/см² при продолжительности времени аппликации 30–45 мин.

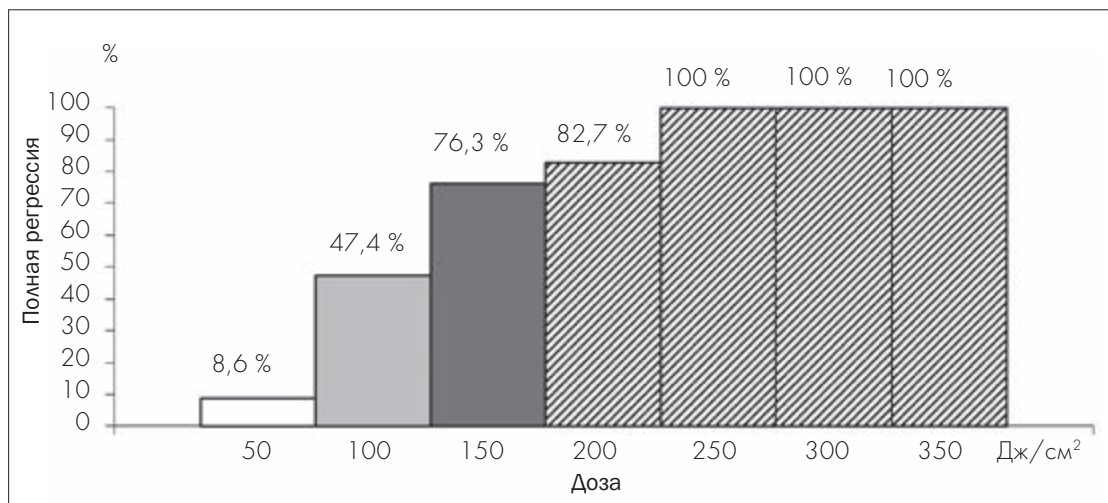


Рис. 2. Эффективность ФДТ больных с CIN III и CIS в зависимости от дозы света

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаков В.И., Прилепская В.И., Минкина Г.Н., Роговская С.И. Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей. – М.: Медицина, 2007. – 48 с.
2. Михайлов И.Г., Максимов С.Я., Новик В.И. и др. Сравнительная оценка некоторых способов лечения генитальной ВПЧ-инфекции у женщин с различными генотипами вируса // Вопр. Онколог. – 2000. – Т. 46 (3). – С. 340–343.
3. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Современные представления о канцерогенезе рака шейки матки // Практическая онкология. – 2002. – Т.3, №3 (11). – С. 145–155.
4. Bosch F.X., Lorincz A., Munoz N. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer // J. Clin. Pathol. – 2002. – Vol. 55. – P. 244–265.
5. Dougherty T.J. Photodynamic therapy // Photohem. Photobiol. – 1993. – Vol. 58. – P. 895–900.
6. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 году // Под редакцией Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. – 240 с.

REFERENCES

1. Kulakov V.I., Prilepskaya V.I., Minkina G.N., Rogovskaya S.I. Profilaktika raka sheiki matki: rukovodstvo dlya vrachei (Prevention of cervical cancer: guidelines for physicians), M.: Meditsina, 2007, pp. 48.
2. Mikhailov I.G., Maksimov S.Ya., Novik V.I. i dr. Sravnitel'naya otsenka nekotorykh sposobov lecheniya genital'noi VPCh-infektsii u zhenshchin s razlichnymi genotipami virusa (Comparative analysis of certain methods of treating of genital HPV-infection in women with different virus genotypes), *Vopr. Onkol.*, 2000, T.46 (3), pp. 340–343.
3. Khanson K.P., Imyanitov E.N. Sovremennye predstavleniya o kantserogeneze raka sheiki matki (Contemporary conceptions of cancerogenesis of cervical cancer), *Prakticheskaya onkologiya*, 2002, T.3, No. 3 (11), pp. 145–155.
4. Bosch F.X., Lorincz A., Munoz N. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer, *J. Clin. Pathol.*, 2002, Vol. 55, pp. 244–265.
5. Dougherty T.J. Photodynamic therapy, *Photohem. Photobiol.*, 1993, Vol. 58, pp. 895–900.
6. Sostoyanie onkologicheskoi pomoshchi naseleniyu Rossii v 2011 godu Pod redaktsiei Chissova V.I., Starinskogo V.V., Petrovoi G.V.

7. Сопко Н.И., Максимов В.В. Современные представления о папилломавирусной инфекции // Медицинские аспекты женского здоровья. – 2006. – № 3. – С. 23–25.
8. Трушина О.И., Новикова Е.Г. Роль папилломавирусной инфекции в генезе РШМ // Российский онкологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 45–52.
9. Левин М. Скрытые инфекции: будьте бдительны. – СПб.: Невский проспект, 2000. – 160 с.
10. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application // *Nat. Rev. Cancer*. – 2002. – Vol. 2. – P. 342–350.
11. Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия – обоснование применения и возможности в онкологии // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2014. – № 1. – С. 3–7.
12. Красновский А.А. Первичные механизмы фотоактивации молекулярного кислорода. История развития и современное состояние исследований // Биохимия. – 2007. – Т. 72, вып. 10. – С. 1311–1331.
13. Гребёнкина Е.В., Гамаюнов С.В., Кузнецов С.С., Оноприенко О.В., Илларионова Н.А., Шахова Н.М. Фотодинамическая терапия заболеваний шейки матки // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2014. – № 2. – С. 12–14.
14. Полсачев В.И., Зыков А.Е., Словоходов Е.К., Басанов Р.В., Смирнов А.Б., Иванова-Радкевич В.И. Фотодинамическая терапия у гинекологических больных с предопухоловой и опухолевой патологией шейки матки // Хирург. – 2011. – № 7. – С. 19.
15. Зыков А.Е., Полсачев В.И., Словоходов Е.К., Басанов Р.В., Иванова-Радкевич В.И. Флюоресцентная диагностика у гинекологических больных предопухоловой и опухолевой патологией шейки матки // Хирург. – 2011. – № 6. – С. 47–50.
- (Status of cancer care for Russian population in 2011/ edited by Chissov V.I., Starinskii V.V., Petrova G.V), M.: FGBU «MNIОI im. P.A. Gertsena» Minzdravsotsrazvitiya Rossii, 2012, p. 240.
7. Sopko N.I., Maksimov V.V. Sovremennye predstavleniya o papillomavirusnoi infektsii (Contemporary conceptions of papillomavirus infection), *Meditssinskie aspekty zhenskogo zdorov'ya*, 2006, No. 3, pp. 23–25.
8. Trushina O.I., Novikova E.G. Rol' papillomavirusnoi infektsii v geneze RshM (Role of papillomavirus infection in cervical cancer origin), *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*, 2005, No. 1, pp. 45–52.
9. Levin M. Skrytye infektsii: bud'te bditel'ny (Occult infections: stay alert), SPb.: Nevskii prospekt, 2000, p.160.
10. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, Vol. 2, pp. 342–350.
11. Filonenko E.V. Flyuoresstentnaya diagnostika i fotodinamicheskaya terapiya – obosnovanie primeneniya i vozmozhnosti v onkologii (Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy: justification of application and opportunities in oncology), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2014, No. 1, pp. 3–7.
12. Krasnovskii A.A. Pervichnye mekhanizmy fotoaktivatsii molekulyarnogo kisloroda. Istoriya razvitiya i sovremennoe sostoyanie issledovaniy (Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen. The History of the Development of Research and the Modern state of the Art), *Biokhimiya*, 2007, T. 72, vyp. 10, pp. 1311–1331.
13. Grebenkina E.V., Gamayunov S.V., Kuznetsov S.S., Onoprienko O.V., Illarionova N.A., Shakhova N.M. Fotodinamicheskaya terapiya zabol-evanii sheiki matki (Photodynamic therapy for cervical lesions), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2014, No. 2, pp. 12–14.
14. Polsachev V.I., Zikov A.E., Slovokhodov E.K., Basanov R.V., Smirnov A.B., Ivanova-Radkevich V.I. Fotodinamicheskaya terapiya u gineko-logicheskikh bol'nykh s predopukholevoi i opukholevoi patologiei sheiki matki (Photodynamic therapy in gynecologic patients with precancerous and malignant cervical pathology), *Khirurg*, 2011, No. 7, p. 19.
15. Zikov A.E., Polsachev V.I., Slovokhodov E.K., Basanov R.V., Ivanova-Radkevich V.I. Flyuorestsennaya diagnostika u ginekologicheskikh bol'nykh predopukholevoi i opukholevoi patologiei sheiki matki (Fluorescent diagnostics at gynecologic patients with pretumoral and tumoral pathology of cervix uteri), *Khirurg*, 2011, No. 6, pp. 47–50.

ADJUSTMENT OF TREATMENT PARAMETERS FOR PHOTODYNAMIC THERAPY OF CERVICAL PRE-CANCER AND CANCER

Aminodova IP, Aminodov SA

Ivanovskiy regional oncological dispensary, LLC «Klinika sovremennoy meditsiny», Ivanovo

Comprehensive study for optimization of parameters of photodynamic action with fotoditazin in patients with tumor and pre-tumor cervical diseases was conducted. The study included 52 female patients: pre-invasive cervical diseases were diagnosed in 34 (CIN I – in 9, CIN II – in 13, CIN III – in 12), cervical cancer – in 11 (8 had squamous cell cancer, 3 – adenocarcinoma of cervical canal), chronic cervicitis – in 7. The study agent in the form of 0,5% gel was applied on cervix in dose of 1 ml. To detect optimal interval between gel application and conduction of photodynamic therapy dynamics of accumulation and elimination of photosensitizer by means of its fluorescence was studied. Fotoditazin was shown to have good accumulation in pathological tissues. The maximal agent accumulation was noticed in 30 min, continued about 15 min, and then gradually decreased. Maximal fluorescence of photosensitizer was observed in foci of malignant tumor and severe intraepithelial neoplasia. To detect optimal light dose for irradiation cytological study of cell smear from specimen after light exposure with different light doses was performed. The minimal light dose necessary for activation of photochemical reaction pathway was 100 J/cm², and optimal – 250 J/cm². This dose allowed to destroy all atypical cells in the area of light exposure after application of gel fotoditazin. According to obtain data we suppose that the most efficient regimen of photodynamic therapy with local application of fotoditazin-gel for treating dysplasia and pre-invasive cervical cancer was a dose of laser irradiation of 250 J/cm² with duration of application of 30–45 min.

Keywords: cervical cancer, fluorescence diagnosis, photodynamic therapy, fotoditazin.

Контакты: Аминодова И.П., e-mail: aminodovsi@mail.ru