

Az OTKA pályázat támogatása lehetővé tette az SZTE, Fül-orr-gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinikán már 2000-ben elkezdett photodynamiás diagnosztikai (PDD), endoszkópos vizsgálatok, kutatási tervünk folytatását és új módszerek bevezetését az általunk vizsgált garat- és gégedaganatos betegcsoportban.

Klinikánkon elsőként alkalmaztuk és publikáltuk hazánkban a PDD diagnosztikai vizsgálatokat gége- és garattumoros betegeken. Nemzetközi viszonylatban is elsőként adtuk elő és publikáltuk szakterületünkön a gégetumорок fluoreszcens diagnosztikáját.

A photodynamiás vizsgálatoknak többféle módozata létezik, klinikánkon az indukált fluoreszcencia (melyet 2003-ban folytattunk) és az autofluoreszcencia módszerét (2004-től kezdődtek vizsgálataink) alkalmaztuk, melyek alkalmasak a garat- és gégedaganatok fluoreszcens képalkotó vizsgálatára. Mindkét módszerrel vizsgáltunk egészséges kontroll felnőtteket az egészséges nyálkahártya fluoreszcenciájának meghatározására.

(Korábban erre az SZTE, Orvosbiológiai és Etikai Bizottságtól engedélyt kaptunk).

Célunk az 5-aminolevulinsav (ALA) által indukált protoporphyrin IX és autofluoreszcenciás endoszkópos, photodynamiás rendszerek beállítása, kiegészítő endoszkópos vizsgálatként való alkalmazása, valamint az indukált ALA technikánál a vizsgálatonként felhasznált 5-aminolevulinsav mennyiségének meghatározása, standardizálása volt. Megvizsgáltuk gége- és garattumorokban a PDD módszerek jelentőségét a daganatok korai felismerése, a daganatok határainak pontosabb megítélése és így a sebészi eltávolítás (hangszalagos endoszkópos eltávolítása - laser chordectomia) és/vagy a betegek követése szempontjaiból. További kérdésként merült fel, hogy a módszerek mennyiben alkalmasak a tumor/egészséges - szövettani - határok kimutatására és mennyire idő és technika igényes a rendszerek beállítása és az egyes vizsgálatok végrehajtása.

Betegcsoportok kiválasztása során rosszindulatú garat- és gégetumорок mellett jóindulatú és daganatmegelőző állapotú (praecancerosis) elváltozásokat válogattunk be a kísérletbe. Minden beteg több vizsgálatot is végeztünk.

Eredményeinket folyamatosan rögzítettük (videó- és komputerdokumentáció), magyar (5 előadás) és nemzetközi (7 előadás) kongresszusokon adtuk elő. A korábbi e témában megjelent közleményeinket (Fül-orr-gégegyógyászat) követően minden évben publikáltuk munkánkat hazai és külföldi szaklapokban (European Archives of Otorhinolaryngology 2004, LAM 2005, Fül-orr-gégegyógyászat 2006.).

**Photodynamiás módszerekről:** A photodynamiás módszerek a fehér fényű endoszkópos vizsgálatokon mellett lehetőséget nyújtanak a daganatok kiterjedésének (és felismerésének) pontosabb meghatározásához a daganat és az egészséges szövet (nyálkahártya) színbeli elkülönítése révén. A daganatokban lévő fluorophor molekulák, illetve az indukációs módszer révén indukált protoporphyrin IX indukációs fény hatására fluoreszkálnak (pl. vörös színben) és így élesen elkülönülnek az ép szövetektől.

Az indukált fluoreszcencia egyik módszere az 5-aminolevulinsav (ALA) indukálta protoporphyrin IX fluoreszcencia, az eljárás előnye praecancerosis és malignus tumorok diagnosztikájában mutatott magas szenzitivitása, ezért került használata előtérbe (Kennedy 1990). Az ALA oldatot a nyálkahártya felületén alkalmazva a daganatos szövetekben szelektív protoporphyrin akkumuláció (10-12-szeres) jön létre. A protoporphyrin IX azután megfelelő hullámhosszúságú fényvel megvilágítva fluoreszcenciát hoz létre, melyet megfelelő endoszkóppal és videorendszerrel jól lehet detektálni.

Klinikánkon indukált fluoreszcencia emellett alkalmaztuk az autofluoreszcencia módszerét szintén gége- és garattumorokban. Az eljárás előnye, hogy nincs szükség fluoreszcenciát indukáló anyag felszíni bevitelére, így egyszerűbb és gyorsabb az alkalmazása.

## **5 aminolevulinsav (ALA) által indukált protoporphyrin IX fluoreszcencia**

2003 és 2004-ben 31 betegen végeztünk 5-aminolevulinsav (ALA) felületi (nyálkahártya) alkalmazása után végzett protoporphyrin IX fluoreszcenciás photodynamias vizsgálatot a garat- és gégedaganatok pre- intra- és posztoperatív diagnosztikájában.

5-aminolevulinsav hydrochlorid-ot (ALA) alkalmaztunk helyileg juttattuk a nyálkahártyára az ALA oldatot (0.6-1%-os - fiziológias só – oldat). Az endoszkópia helyi érzéstelenítésben és/vagy altatásban történt a betegeken műtét előtt, közben és után. Az ALA által indukált fluoreszcencia kiváltására módosított xenon fényforrást (D-Light, Storz,) alkalmaztunk, mely 375-400 nm-es indukációs fényt bocsát ki. A fluoreszcencia detektálása 0 és 30 fokos fényszűrős endoszkóppal (mely kiszűri az indukációs fényt 500 nm alatt) (Storz) és speciálisan fényérzékeny kamerával (Telecam SL, PAL, Storz) történt 1.5-2 óra múlva.

A vizsgált 31 betegből 12 garattumor (meso- és hypopharynx), 13 gégetumor (álhangszalag és hangszalag), 4 praecancerosis és 2 jóindulatú gégeelváltozás volt. A terápia előtt (preoperatív), majd intra és posztoperatív ALA-fluoreszcenciás vizsgálat, majd szövettani mintavétel történt. A műtét/sugárterápia után a kórlefolyást az ALA fluoreszcenciás módszerrel is követtük. Az ALA diagnosztika az altatás és műtét idejét csak 4-5 perccel nyújtotta meg.

**Eredmények:** A garatív-tonsillatumorok vizsgálatokor jól megítélhető a tumorosan infiltrált terület felszíni kiterjedése, alakja, nyelvgyökre terjedése ALA fluoreszcenciás módszerrel a vörös színben fluoreszkáló daganat az egészséges szövetből jól elkülönül, de szabad szemmel vagy fehér fényel végzett endoszkópos vizsgálattal ugyanez kevésbé látható. Egy beteg sugárterápia utáni recidív tonsillatumora szintén csak az ALA vizsgálattal volt diagnosztizálható. A garatív-tonsillatumoroknál valamennyi közepes és erős vörös fluoreszcenciát mutató tumor a patológiai vizsgálattal karcinómának bizonyult. A klinikailag 2 vallecula-tumor közül azonban csak az egyik bizonyult szövettanilag malignus elváltozásnak, bár ez mérsékelt fluoreszcenciát mutatott. A hypopharynx-tumorsek (2 beteg) valamivel gyengébben fluoreszkáltak.

A hangszalag-tumoroknál éles határvonallal elkülönülő erős vörös fluoreszcenciát észleltünk, ezek szövettanilag karcinómának bizonyultak. A két álhangszalag-tumor csak mérsékelt fluoreszcenciát produkált, de az egyik szövettanilag nem bizonyult malignusnak.

A hangszalag-tumorok laserrel történő eltávolítása előtt és után ellenőriztük a sebágy széleit és az eltávolított daganat széleit. A 4 praecancerosis (leukoplakia) szintén mérsékelt fluoreszcenciát adott a krónikus laryngitissel együtt, így ezek nem voltak biztonságosan elkülöníthetők a tumortól. A jóindulatú hangszalag elváltozások (hangszalag-polyp) nem mutattak fluoreszcenciát, így nem volt különbség az ép és a jóindulatú elváltozás fluoreszcenciás képe között. A módszer szenzitivitása 95 %- felettinek bizonyult, de specificitása alacsonyabb 60-70% körüli. Az ALA photodynamias diagnosztika során a betegeken mellékhatást nem tapasztaltunk.

**Megbeszélés:** Új diagnosztikus eljárással indukált fluoreszcenciás módszerrel egészítettük ki a daganatok vizsgálatát, így a vörös fluoreszcenciát mutató tumorok az ép szövetektől markánsan elkülönültek, melyek zöld színben fluoreszkáltak. A tonsilla-garatív-tumorsek esetében a daganatszövet kiterjedési viszonyainak megítélését segítette az eljárás, mivel igen intenzív vörös fluoreszcenciát nyertünk. A hangszalag karcinóma szintén jól látható határral különült el a már ép szövetektől és a transoralis laser rezekció (chordectomy) elvégzése után vizsgálni tudtuk mind a sebágy, mind a szövetminta rezekciós felszíni vonalait. Az ALA fluoreszcencia a vizsgált betegek többségében pontosan mutatta a daganatok határait és néhány esetben fehér fényű endoszkóppal nem észlelt elváltozásokat is megfigyeltünk. Az ALA-fluoreszcenciás módszer hátránya, hogy csak a felszínes tumor terjedést lehet vizsgálni kb. 1mm szövetmélységig, valamint az ALA-oldat hosszú abszorpciós ideje (1.5-2h).

## **Autofluoreszcencia**

Az endoszkópos autofluoreszcenciás vizsgálat helyi érzéstelenítésben és/vagy altatásban (laryngomikroszkópia) történt 2004-től. Az autofluoreszcencia kiváltásához DAFE Combilight 137 (Richard Wolf, Németország) xenon fényforrást használtunk, mely 375-400 nm-es indukciós fényt bocsát ki. A detektálásához szükséges 3 CCD Endocam 5506 (Wolf) kamerát és az ehhez közvetlenül kapcsolódó DAFE fényszűrőt (Wolf) alkalmaztuk flexibilis bronchoszkóppal vagy 0 fokos merev optikával. A szövetek 375-400 nm-es indukciós xenon fénnel történő megvilágítása esetén az ép szövetek zöld színű autofluoreszcenciát adnak az 500 nm-es spektrumban, míg a 635-700 nm-es spektrumba eső vörös autofluoreszcenciát mutatnak a természetes fényérzékeny molekulákat nagyobb mennyiségben tartalmazó neoplasiák.

69 beteget vizsgáltunk, ebből 40 gégetumor (hangszalag), 14 garattumor (meso- és hypopharynx), 7 praecancerosis és 8 jóindulatú gégeelváltozás (hangszalagpolyp és -csomó) volt. Egészséges nyálkahártyát is vizsgáltunk kontroll autofluoreszcencia megítélése céljából. Az autofluoreszcenciás eljárás a műtét idejét csak 4-5 perccel nyújtotta meg. A vizsgálatainknál az ALA indukált fluoreszcenciás vizsgálatoknál alkalmazott protokollt követtük.

**Eredmények:** A 40 hangszalag-tumornál éles határvonallal elkülönülő, erős vörös autofluoreszcenciát észleltünk és ezek szövettanilag karcinómának bizonyultak.

A 14 garattumor esetében is vörös fluoreszcenciát kaptunk. A garattumorok vizsgálatakor jól megítélhető a tumorosan infiltrált terület kiterjedése, alakja. Egy garatív tumornál a daganat kiterjedése az autofluoreszcencia felhívta a figyelmet a korábban elektroexcisio során eltávolított tonsillatumor recidívájára. A hypopharynxtumorok szintén gyengébben fluoreszkáltak. A vizsgált 7 praecancerosis szintén mérsékelt autofluoreszcenciát adott a krónikus laryngitissel együtt, így ezek nem voltak biztonsággal elkülöníthetők a tumortól. A 8 jóindulatú elváltozás nem mutatott értékelhető fluoreszcenciát. Autofluoreszcenciás vizsgálatainkban a módszer szenzitivitása 90 % felettinek bizonyult, de specificitása alacsonyabb (60-70% körüli), mivel a praecancerosis (dysplasia) itt is nehezen különíthető el a vizsgálattal a malignus elváltozástól. A diagnosztika során a betegeken mellékhatást nem tapasztaltunk.

**Megbeszélés:** Szakmánkban új autofluoreszcenciás eljárást alkalmaztuk gége- és garattumorokban a DAFE vizsgáló rendszerét alkalmazva, kiegészítve a rutin endoszkópos technikát. Fényérzékenyítő anyagot nem használtunk. A merev endoszkóp alkalmasnak bizonyult a mesopharynxtumorok ambuláns és a gége-hypopharynxtumorok altatásban történő autofluoreszcenciás vizsgálatára, de a fiberoszkóppal helyi érzéstelenítésben a géget is jól lehetett vizsgálni. A DAFE módszer előnye továbbá, hogy a fényszűrő külön egység és nem az optikába épített, ezért bármilyen optikát lehet használni a vizsgálatokhoz.

Tapasztalataink szerint az autofluoreszcenciás vizsgálat eredményei, alkalmazhatósága a daganatok kimutatásában hasonló az indukált ALA fluoreszcenciás eljáráshoz.

## **Várható szakmai, gyakorlati haszon:**

A photodynamiás, endoszkópos garat- és gégevizsgálatokkal új diagnosztikus eljárásokat vezettünk be a hazai klinikai gyakorlatba, melyek a daganatok korai felismerését, a pontosabb műtéti tervezést és daganat-eltávolítást segítik. Mind az indukált (ALA), mind az autofluoreszcencia módszerét klinikánkon beállítottuk, az indukált fluoreszcenciánál a nyálkahártyára bevitt ALA mennyiségét meghatároztuk. A módszerekkel az endoszkópos fehér fényű diagnosztikát egészítettük ki. Fotó és videó (digitális) dokumentációt készítettünk. Elsősorban a hangszalagok és mesopharynx daganatainál tudtuk megbízhatóan alkalmazni az eljárásokat. A tonsilla-, garatívumorok esetében a daganatszövet kiterjedési viszonyainak megítélését és korai felismerését szintén jelentősen javította mindkét módszer, így javíthatja a

daganatos betegek túlélését. A gége daganatai szintén jól látható határral különülnek el a már ép szövetektől. A hangszalag-tumor endoszkópos, laseres eltávolítása után vizsgálni lehet mind a sebágy, mind a szövetminta rezekciós vonalait, mely segítséget jelenthet az ében történő daganat-eltávolításhoz.

Az autofluoreszcencia előnye, hogy nem szükséges indukáló anyag a kivitelezéséhez, valamint az, hogy a fiberoszkópos vizsgálattal egyszerűbben lehet követni a betegeket: így alkalmas ambuláns gégevizsgálatra is. Az ALA indukálta módszernél csak merev endoszkóp alkalmazható, mellyel ambuláns vizsgálatkor csak a mesopharynx vizsgálható. Altatásos vizsgálatokra inkább a módszer jól használható.

A módszerek szenzitivitása magas 90% feletti, specificitása az irodalmi adatok szerint 60% körüli, mivel a dysplasias szövetek is enyhébb vörös fluoreszcenciát adnak.

Ezen módszereknél megoldandó problémaként merült fel a daganatok elkülönítése a daganatmegelőző állapotoktól, ez sokszor igen nehéz a kapott fluoreszcencia intenzitása alapján. A szövettani diagnózis rosszindulatú daganatot igazolt azon daganatoknál, ahol intenzív vörös fluoreszcenciát észleltünk, de a daganatmegelőző állapotok, az idült gyulladás is mutatott enyhe fluoreszcenciát és bakteriális fertőzések is befolyásolhatják a kapott eredményt. A PDD módszerek segítik a hangszalag-daganatok endoszkópos, pontosabb eltávolítását, így a növelik a gyógyulási arányt. Az endoszkópos technika alkalmazása kisebb megterhelést jelent a beteg számára, csökkenti a kórházi ápolási költségeket, de a technikai szempontból költséges eljárás, valamint az indukált fluoreszcencia (ALA) kissé időigényesebb, mint az autofluoreszcencia.

A sugárkezelésben részesült betegek esetében is segítséget jelent a preoperatív statusának megítélésében és a betegek követéséhez.

A daganatok (korai stádiumban történő) felismerése a beteg végleges gyógyulásához vezethet, így itt az alapos, speciális információt jelentő módszerek bizonyos esetekben a beteg életéről döntenek, ezért minden plusz diagnosztikai információ segíti a beteg megfelelő kezelését és javíthatja a daganatos betegek hosszú távú túlélését. Mindkét módszer alkalmazható kiegészítő endoszkópos vizsgálatként a klinikai gyakorlatban, de az autofluoreszcencia módszere gyorsabban kivitelezhető, mivel nem kell fényérzékenyítő anyagot juttatni a tumor (nyálkahártya) felszínére. A jövőben további vizsgálatokat és technikát tartunk szükségesnek a daganatos és daganatmegelőző állapotok pontosabb elkülönítésére.