

В.В. Куценко,  
І.В. Прокопенко,  
О.Ю. Артеменко,  
М.Ф. Гамалія

Інститут експериментальної  
патології, онкології  
і радіобіології  
ім. Р.Є. Кавецького НАНУ,  
м. Київ

## Флуоресцентний аналіз накопичення 5-АЛК-індукованого протопорфірину ІХ у пухлинній та нормальній тканинах мишей\*

Fluorescent analysis of 5-ALA-induced  
protoporphyrin IX accumulation in the tumor  
and normal tissue in mice

**Цель работы:** Изучить методом флуориметрии накопление протопорфирина ІХ (ПП ІХ) в органах и тканях мышей с опухолью при пероральном введении 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК).

**Материалы и методы:** Материалом для исследования служили органы и ткани, взятые у мышей линии С57В1/6 с перевитой метастазирующей опухолью — карциномой Льюис. Степень накопления ПП ІХ после перорального введения 5-АЛК в дозе 500 мг/кг веса мышей определяли с помощью флуориметра СДЛ-2 (ЛОМО, Россия).

**Результаты:** В разных тканях динамика накопления ПП ІХ была неодинаковой. Наиболее высокий уровень флуоресценции ПП ІХ в печени и крови наблюдался через 2 ч, в почках — через 4, в коже — через 6 ч. Максимальная интенсивность флуоресценции ПП ІХ в опухоли определялась через 4 ч, а оптимальный флуоресцентный контраст между опухолью и окружающей тканью — через 2 ч после введения 5-АЛК.

**Выводы:** Пероральное введение 5-АЛК приводило к накоплению в органах и тканях ПП ІХ в диагностически значимых концентрациях в интервале 2–6 ч после введения препарата с практически полной его элиминацией через 24–36 ч. Оптимальная разница свечения между опухолью и пограничной тканью достигалась через 2 ч с момента введения препарата.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, флуоресцентная диагностика, флуориметрия, фотосенсибилизатор, протопорфирин ІХ, 5-аминолевулиновая кислота.

**Objective:** Using fluorometry, to study 5-ALA-induced protoporphyrin IX accumulation (PP IX) in the organs and tissues of the mice with the tumor at oral administration of 5-aminolevulinic (5-ALA) acid.

**Material and Methods:** The study involved the organs and tissues taken from C57B1/6 mice with transplanted metastatic tumor – Lewis' carcinoma. The degree of PP IX accumulation after oral 5-ALA administration at a dose of 500 mg/kg of body weight was determined using СДЛ-2 fluorometer (LOMO, Russia).

**Results:** The dynamics of PP IX accumulation in different tissues was various. The highest level of PP IX fluorescence in the blood and the liver was observed 2 hours after the administration, in the kidneys – 4 hours, in the skin – 6 hours. Maximum PP IX fluorescence intensity in the tumor was observed in 4 hours and optimum fluorescent contact between the tumor and the adjacent tissue was observed in 2 hours after 5-ALA administration.

**Conclusion:** Peroral 5-ALA administration resulted in PP IX accumulation in the organs and tissues in the diagnostically significant amounts within 2-6 hours after the drug administration with complete elimination observed 24-36 hours after the administration. Optimum difference of fluorescence between the tumor and the adjacent tissue was observed 2 hours after the substance administration.

**Key words:** photodynamic therapy, fluorescent diagnosis, fluorometry, photosensitizer, protoporphyrin IX, 5-aminolevulinic acid.

Фотодинамічна терапія пухлин (ФДТ) — перспективний метод лікування злоякісних новоутворів, застосування якого поширилося останніми роками [1, 2]. В його основі лежить обробка уражених ділянок тканин оптичним випроміненням із попереднім введенням хворому фотосенсибілізатора, здатного селективно накопичуватися в пухлинах. Активованій під дією опромінювання, він продукує активний кисень, який руйнує уражені тканини. Крім власне терапії, метод дозволяє проводити флуоресцентну діагностику (ФД), основу на ви-

біркового накопиченні деяких фотосенсибілізаторів у тканинах злоякісних новоутворів і можливості їхнього виявлення за характерною флуоресценцією під дією світла.

На сьогодні синтезовано велику кількість фотосенсибілізаторів, що належать до різних класів сполук, які завдяки структурним особливостям, фізико-хімічним і спектральним властивостям, потенційно можуть бути використані в діагностиці та/або терапії онкологічних захворювань [3–5]. Особливий інтерес для ФДТ становлять фотосенсибілізатори

\* Дослідження виконано з підтримкою гранту Президента України для обдарованої молоді

ри ендogenous походження, природні клітинні метаболіти.

Однією з таких сполук є 5-амінолевулінова кислота (5-АЛК), попередник у біологічному синтезі гем у та протопорфірину ІХ (ПП ІХ). Численні дослідження *in vitro* та експерименти на тваринах продемонстрували, що після системного введення 5-АЛК у патологічно швидко проліферуючих клітинах відбувається підвищене накопичення ПП ІХ, порівняно з клітинами нормальної тканини.

Власне 5-АЛК не є фотосенсибілізатором, але беручи участь в біосинтезі гем у, вона індукуює синтез ПП ІХ, який має флуоресцентні та фототоксичні особливості [6, 7]. Біосинтез гем у — життєво необхідний процес, що відбувається в усіх аеробних клітинах, крім еритроцитів (рис.1).

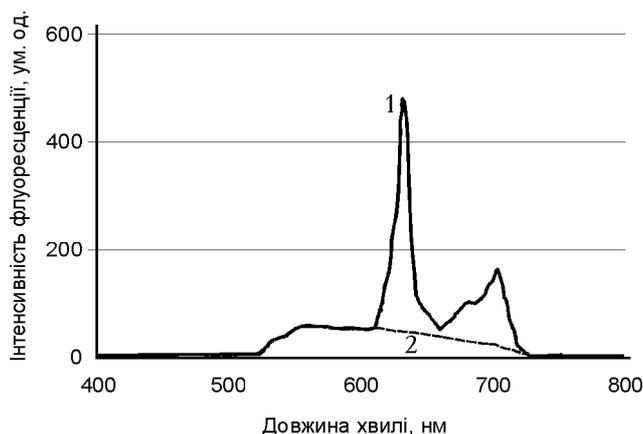


Рис. 1. Спектр флуоресценції карциноми Льюїс мишей: 1 — при введенні 5-АЛК; 2 — без введення препарату

Fig. 1. Fluorescence spectrum of Lewis carcinoma in mice at administration of 5-ALA (1); (2) — without the drug administration

У нормальних клітинах на першій стадії біосинтезу гем у з гліцину і сукциніл-коА під дією ферменту амінолевулінатсинтетази утворюється 5-АЛК. На останній стадії утворення гем у в мітохондріях під дією ферменту ферохелатази у молекулу ПП ІХ вбудовується іон двохвалентного заліза ( $Fe^{2+}$ ). Це відносно повільний процес, і тому введення екзогенної 5-АЛК веде до продукування і накопичення ПП ІХ [8]. Тривалість фотодинамічного ефекту ПП ІХ корелює з часом його перетворення у фотонеактивний гем. На відміну від гем у, вільний ПП ІХ не має біологічної активності, проте він є природним нетоксичним фотосенсибілізатором, і опромінювання світлом певної

довжини хвилі в ультрафіолетовому діапазоні або діапазоні видимого світла зумовлює значні фотодинамічні ефекти [9]. Присутність гем у в нормі інгібує синтез 5-АЛК, однак механізм цього негативного зворотного зв'язку тимчасово порушується при екзогенному введенні надмірної кількості 5-АЛК. Оскільки етап перетворення ПП ІХ у гем лімітує швидкість біосинтезу гем у, зазначені механізми зумовлюють акумуляцію саме фотоактивного ПП ІХ у клітині.

Спектроскопічні дослідження роблять внесок у більш повне розуміння біологічних і фізіологічних процесів, що відбуваються при ФД і ФДТ — утворення ендogenous фотосенсибілізаторів, їх розподілу у різних органах і тканинах організму, фотоіндукованих процесів [10–12]. Оптична спектроскопія відіграє ключову роль у наукових дослідженнях, спрямованих на розвиток неінвазивних технологій для діагностики.

Метою даної праці стало вивчення флуоресцентних характеристик нормальних та пухлинних тканин мишей лінії C57Bl/6 і визначення накопичення ПП ІХ залежно від часу після введення 5-АЛК.

## Методика дослідження

Експерименти проводили на самицях мишей лінії c57Bl/6 розведення віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до міжнародно прийнятих правил проведення робіт з експериментальними тваринами. Експериментальною моделлю слугувала карцинома легень Льюїс, яку перещеплювали внутрим'язово в ділянку стегна. Досліджувалися 8 груп по 3 миші в кожній: одна група — контрольна (без введення 5-АЛК) та сім груп — після введення 5-АЛК з інтервалом 1, 2, 4, 6, 12, 24 і 36 годин відповідно.

У досліджах використовували гідрохлорид 5-амінолевулінової кислоти, синтезований в Інституті органічної хімії НАН України (м. Київ), який вводили перорально дозою 500 мг/кг живої ваги в 0,3 мл фізіологічного розчину.

Вміст 5-АЛК-індукованого ПП ІХ визначали, використовуючи флуоресцентне дослідження клітинних екстрактів.

Через певні інтервали часу після введення 5-АЛК тварин забивали шляхом цервікальної дислокації і видаляли пухлину, печінку, нирки, шкіру, а також брали на аналіз кров. Видалені органи двічі промивали у розчині фосфатного буферу, висушували на фільтрувальному папері та зважували. Потім їх заморожували, механічно гомогенізували і переносили в метанольно-водний розчин (3:1), продовжуючи подрібнення тканин. Ступінь гомогенізації контролювали під мікроскопом. Суспензії центрифугували 10 хв при 1500 об/хв. З крові мишей отримували сироватку, додавали розчин метанол/вода (3:1) і центрифугували при аналогічних умовах.

Екстракцію ПП ІХ з клітин тканин здійснювали згідно з описаним методом [13].

Для визначення накопичення у тканинах 5-АЛК-індукованого ПП ІХ отримані супернатанти переносили до кювети флуориметра СДЛ-2 (ЛОМО, Росія). Вміст фотосенсибілізуючого агента ПП ІХ виявляли за його специфічною флуоресценцією. Хвиля збудження становила 402 нм. Для аналізу використовували пік флуоресценції ПП ІХ, який спостерігався при довжині хвилі 632 нм.

Величину 5-АЛК-індукованого ПП ІХ визначали за допомогою калібрувального графіка, побудованого із використанням препарату метанольно-водних розчинів ПП ІХ (Sigma).

У процесі дослідження оцінювали інтенсивність флуоресценції (ІФ) 5-АЛК-індукованого ПП ІХ і розраховували відношення між ІФ у пухлині та ІФ шкіри в ділянці спини, визначаючи таким чином флуоресцентний контраст (Фк) між пухлиною та навколишньою тканиною.

## Результати та їх обговорення

Як зазначалося вище, екзогенна 5-АЛК при введенні в організм індукуює синтез ПП ІХ, здатний до флуоресценції. На рис. 1 наведені характерні спектри флуоресценції тканин мишей з карциномою Льюїс, які отримували або не отримували 5-АЛК. З рис. 1 можна побачити, що спектр 5-АЛК-індукованої флуоресценції в тканинах має два максимуми: при 632 нм і 703 нм, що характерно для флуоресценції ПП ІХ у тканинах тварин і людини, які отримували 5-АЛК.

Результати вимірювання інтенсивності флуоресценції ПП ІХ в тканинах внутрішніх органів мишей з карциномою Льюїс, які отримували 5-АЛК, наведені в табл. 1.

Наведені дані свідчать, що флуоресценція, індукована введенням 5-АЛК, реєструється в органах мишей упродовж перших годин спостереження. Так, рівень нормованої флу-

оресценції ПП ІХ у пухлині досягав максимуму через 4 год після введення 5-АЛК. При вивченні накопичення ПП ІХ в нормальних тканинах показано, що найбільш високий рівень флуоресценції спостерігався в печінці, шкірі та крові, низький рівень — у нирках. При цьому в печінці і крові максимальний рівень флуоресценції досягався вже через 2 год, в нирках — через 4, а в шкірі — через 6 год.

Через 36 год флуоресценція тканин у мишей, які отримували 5-АЛК, не відрізнялася від такої у контрольних тварин, що узгоджується з даними літератури про швидке виведення з організму 5-АЛК-індукованого ПП ІХ [4,14,15].

На рис. 2 наведено графічне зіставлення кінетика накопичення ПП ІХ у карциномі Льюїс з формуванням флуоресцентного контрасту між пухлиною та тканиною шкіри. Показано, що прищеплена внутрішньом'язово карцинома Льюїс накопичує максимальну кількість ПП ІХ через 4 год, але максимальний флуоресцентний контраст між пухлиною і навколишньою тканиною (шкірою) досягається через 2 год після введення 5-АЛК. При цьому пікові значення флуоресценції відображали певну селективність накопичення ПП ІХ у пухлині, що перевищувало таке у нормальних тканинах в 1,6–8,2 разу.

Рис. 2 також свідчить, що флуоресцентний контраст між пухлиною та навколишньою тканиною виникає в результаті різної кінетики: у пухлинах ПП ІХ накопичується швидше, ніж у шкірі.

Таблиця 1

Накопичення 5-АЛК-індукованого ПП ІХ у тканинах мишей з карциномою Льюїс (інтенсивність флуоресценції, ум.од.)  
5-ALA-induced PP IX accumulation in the tissues of the mice with Lewis' carcinoma (fluorescence intensity, conventional units)

Тканина	Час після введення 5-АЛК, год						
	1	2	4	6	12	24	36
Пухлина	169,8 ± 10,7	336,7 ± 7,3	491,9 ± 6,8	327,9 ± 9,0	190,0 ± 5,2	0	0
Шкіра	42,2 ± 0,6	61,7 ± 1,8	230,7 ± 12,5	269,4 ± 6,6	110,2 ± 4,3	0	0
Печінка	266,4 ± 8,3	313,9 ± 6,9	223,7 ± 13,7	92,4 ± 6,1	9,7 ± 0,4	2,6 ± 0,3	0
Нирки	10,6 ± 0,7	28,9 ± 1,4	60,1 ± 1,1	46,3 ± 0,8	19,0 ± 0,5	5,1 ± 0,8	0
Кров	186,8 ± 5,9	209,3 ± 7,1	114,2 ± 2,6	84,2 ± 3,4	27,6 ± 0,7	0	0
*Фк пухлина/шкіра	4,0	5,5	2,1	1,2	1,7	0	0

Примітка. \*Фк — флуоресцентний контраст.

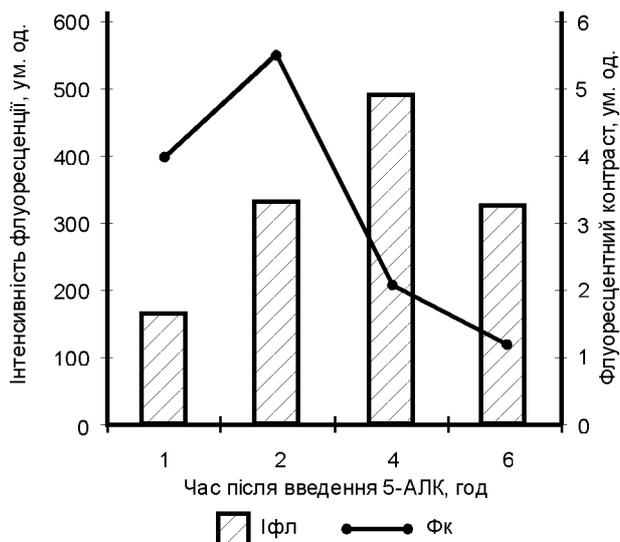


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції пухлинної тканини (Іфл) і флуоресцентний контраст (Фк) при внутрим'язовому прищепленні карциноми Льюїс

Fig. 2. Tumor tissue fluorescence intensity and fluorescent contrast at intramuscular transplantation of Lewis' carcinoma

У доступній літературі ми не знайшли даних щодо аналізу накопичення 5-АЛК-індукованого ПП ІХ у карциномі Льюїс у порівнянні з нормальними тканинами. Проте дослідження з використанням інших моделей пухлинного росту вказують на те, що ПП ІХ, індукований введенням препаратів (похідних 5-АЛК), селективно накопичується у пухлинах мишей. При цьому максимум для ПП ІХ варіює від 2 до 12–14 год [4,14,15].

Таким чином, вивчення характеру і динаміки накопичення фотосенсибілізатора в пухлинних і нормальних тканинах дозволило визначити оптимальний темпоральний інтервал між введенням фотосенсибілізатора та опромінюванням, а також передбачити можливе виникнення у хворого фоточутливості шкіри під впливом ФДТ.

## ВИСНОВКИ

1. Пероральне введення 5-АЛК мишам з прищепленою карциномою Льюїс при дозуванні 500 мг/кг ваги приводить до накопичення в органах і тканинах протопорфірину ІХ у діагностично значущих концентраціях в інтервалі 2–6 год після введення препарату з практично повною його елімінацією через 24–36 год.

2. Різний ступінь і динаміка накопичення ПП ІХ залежать, насамперед, від типу тканин. Серед обстежених найбільша концентрація ПП ІХ спостерігалась у пухлинній тканині. Оптимальний флуоресцентний контраст між новоутвором та навколишньою тканиною виникає через 2 год після введення 5-АЛК.

3. Знання динаміки накопичення фотосенсибілізатора необхідне для вибору оптимального часу проведення флуоресцентної діагностики, добору дози, шляхів введення 5-АЛК і часу проведення сеансу фотодинамічної терапії.

## Література

1. Куценко В.В., Гамалея Н.Ф. // Онкол. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 69–73.
2. Macdonald L.G., Dougherty T.J. // *J. Porphyrins Phthalocyanines*. – 2001. – №5. – P.105–129.
3. Соколов В.В., Жаркова Н.Н., Фабелинский В.И. и др. *Диагностика злокачественных опухолей на основе экзогенной и эндогенной флуоресценции: Пособие для врачей*. – М., 2001.
4. Фомина Г.И. *Изучение новых фотосенсибилизаторов, предназначенных для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии опухолей* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2001. – 33 с.
5. Hajri A., Wack S., Meyer C. et al. // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – Vol.75, №2. – P.140–148.
6. Гамалея Н.Ф., Куценко В.В., Чехун В.Ф. // Онкол. – 2003. – Т.5, № 3. – С.239–244.
7. Fukuda H., Casas A., Batlle A. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol.37, №2. – P. 272–276.
8. Vagnonas S., Ma L.W., Iani V. // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – Vol.72, №2. – P.186–192.
9. Juzenas P., Iani V., Rotomscis R., Moan J. // *J. Photochem. Photobiol. B*. – 2001. – Vol.61, №1–2. – P.78–86.
10. Беляева Л.А., Адамян Л.В., Степанян А.А. и др. // *Рос. биотер. журн.* – 2003. – Т.2, №4. – С.35–39.
11. Aalders M.C., Sterenborg H.J., Stewart F.A. et al. // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – Vol.72, №4. – P.521–525.
12. Stolik S., Tomas S.A., Ramon-Gallegos E., Sanchez F. // *J. Photochem. Photobiol. B*. – 2002. – Vol. 68, №2–3. – P. 117–122.
13. Iinuma S., Farshi S.S., Ortel B., Hasan T. // *Br. J. Cancer*. – 1994. – Vol. 70, №1. – P. 1283–1287.
14. Bedwell J., MacRobert A.J., Phillips D., Bown S.G. // *Ibid.* – 1992. – Vol. 65, №6. – P. 818–824.
15. Heyerdahl H., Wang I., Liu D.L. et al. // *Cancer Lett.* – 1997. – Vol.112, №2. – P.225–231.

Надходження до редакції 23.12.2005.

Прийнято 06.02.2006.

Адреса для листування:  
Куценко Вадим Васильович,  
Інститут експериментальної патології, онкології  
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ,  
вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна