

**М.Ф. Гамалія, В.В. Куценок, О.Б. Горобець,
М.О. Лозинський, А.М. Борисевич, В.В. Холін**

Фотодинамічна сенсibiliзація пухлин за допомогою природного попередника у синтезі гему – 5-амінолевулінової кислоти

Фотодинамическая терапия (ФДТ) - является принципиально новым методом лечения злокачественных новообразований, основанным на применении фотосенсибилизаторов, обладающих свойствами селективно накапливаться в опухолевых клетках и при воздействии лазерного излучения, вызывать их избирательное разрушение. Работа посвящена изучению фотодинамических противоопухолевых свойств фотосенсибилизатора второго поколения на основе естественного предшественника в синтезе гема – 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). ФДТ с использованием 5-АЛК (ФДТ-АЛК) проводилась на мышах с метастазирующей карциномой легких Льюис (3LL) и саркомой 180 (S-180). Показано, что в результате проведения ФДТ-АЛК достигается значительное торможение роста первичных опухолей обоих штаммов, а также существенное уменьшение количества и объема метастазов карциномы 3LL. Кроме этого, отмечался значительный процент полной регрессии опухолей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что 5-АЛК является эффективным фотосенсибилизатором и может быть использована в будущем для фотодинамической терапии злокачественных новообразований в практической онкологии.

ВСТУП

Серед сучасних лазерних технологій, які використовуються в онкології, особливе місце належить фотодинамічній терапії (ФДТ), оснований на здатності певних фотосенсибилизаторів з макроциклічною хімічною структурою селективно накопичуватись у тканині пухлин. При цьому квант світла певної довжини хвилі, взаємодіючи з фотосенсибилизатором при наявності кисню тканин, викликає фотохімічну реакцію, що призводить до загибелі пухлинних клітин [6, 11, 13, 14]. Механізм цитотоксичності полягає у генеруванні синглетного кисню та вільних радикалів, що опосередковано світловим збудженням молекул сенсibiliзатора [5, 15]. Диференційовано більша цитотоксичність для злоякісних клітин вигідно відрізняє ФДТ від традиційних методів протипухлинної терапії [2, 3, 6].

Аналіз літературних даних показує, що нині синтезовано велику кількість фотосенсибилизаторів, котрі відносяться до різних класів сполук, які завдяки своїм структурним особливостям, фізико-хімічним і спектральним властивостям, можуть бути використані в діагностиці та терапії онкологічних захворювань. Однак проблема вибору оптимального фотосенсибилизатора, який селективно накопичується в пухлинній тканині, має низьку токсичність, зокрема нейротоксичність і фототоксичність шкіри і тепер залишається актуальною. Серед них значний інтерес становлять сполуки ендogenous походження, нормальні метаболіти організму людини. Однією з таких сполук є 5-амінолевулінова кислота (5-АЛК), попередник протопорфірину IX (ППІХ) і гему в їх біологічному синтезі [1, 11].

Біосинтез гему – життєво необхідний процес, що проходить у всіх аеробних

© М.Ф. Гамалія, В.В. Куценок, О.Б. Горобець, М.О. Лозинський, А.М. Борисевич, В.В. Холін

клітинах крім еритроцитів. У нормальних клітинах на першій стадії біосинтезу гемму з гліцину і сукциніл-коА під дією ферменту амінолевулінатсинтетази утворюється 5-АЛК. На останній стадії атом заліза (Fe^{2+}) вбудовується у молекулу ППІХ, що відбувається в мітохондріях під дією ферменту ферохелатази. На проміжних стадіях у біосинтезі гемму бере участь велика кількість ферментів, активність яких регулюється їхніми субстратами та продуктами. При цьому відомо, що синтез 5-АЛК регулюється за принципом зворотного зв'язку гемом.

При малігнізації в клітині змінюється активність деяких ферментів. Показано, що в більшості пухлинних клітин підвищується активність порфобіліноген-деамінази – ферменту початкового етапу синтезу гемму і знижується активність ферохелатази. Це створює умови для підвищеного перетворення 5-АЛК на ППІХ, який, власне, і є фотосенсибілізатором, всередині пухлинних клітин, спричиняючи їх активну природну фотосенсибілізацію [4, 7, 16, 17, 19]. При накопиченні ППІХ у пухлині його високий вміст утримується до 2–4 год, у той час як у нормальних клітинах він швидко утилізується перетворенням у гем. Результатом накопичення ППІХ у пухлині і швидкої його утилізації в нормальних тканинах є високий флуоресцентний контраст пухлини і навколишньої тканини, що досягає 10–15-кратної величини для різних пухлин і є важливим чинником для демаркації новоутворень при проведенні флуоресцентної діагностики (ФД), а також зумовлює локальний терапевтичний ефект без ушкодження тканини, що оточує пухлину, при ФДТ.

Головною перевагою 5-АЛК є її швидкий метаболізм (препарат виводиться з організму протягом доби) [16], а також можливість місцевого застосування [12], що дозволяє скоротити практично до нуля період шкірної фоточутливості, яка є єдиним побічним ефектом методу ФДТ.

5-АЛК уже випробовується при ФД і ФДТ ракових, предракових і деяких непухлинних захворювань. Нині існує певний досвід застосування цього фотосенсибілізатора у клініках США, Німеччини, Великобританії та ін. [8–10, 18]. В Україні метод ФДТ, зокрема з 5-АЛК, є поки що недоступним.

Наша робота присвячена вивченню впливу ФДТ з використанням природного попередника у синтезу гемму – 5-АЛК (ФДТ–АЛК) на ріст і метастазування перещеплених пухлин у мишей.

МЕТОДИКА

Експеримент проведено на мишах-самцях лінії с57В1/6 і безпородних мишах масою 18–21 г (розведення віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАНУ). Для ФДТ застосовували метастазуючу карциному легень Л'юїс (3LL) і неметастазуючу саркому 180 (S-180), які перещеплювали підшкірно в ділянці крижі по 0,2 мл у вигляді 20%-ї суспензії пухлинної тканини.

ФДТ у мишей проводили після утворення добре сформованої пухлини (14-та доба після перещеплювання для 3LL і 6-та доба росту S-180), коли її об'єм сягав $0,2 \text{ см}^3 \pm 0,03 \text{ см}^3$. Останній розраховували за формулою:

$V_n = \pi/6 \cdot d_1 \cdot d_2 \cdot d_3$, де d – це три взаємно-перпендикулярних діаметри.

Фотодинамічний ефект оцінювали безпосередньо перед початком лікування і на 7-, 14-, 21- і 27-му добу.

Критеріями оцінки протипухлинного ефекту ФДТ–АЛК були: гальмування росту пухлини (ГРП), який розраховували за формулою: $ГРП = V_k - V_d / V_k \cdot 100 \%$, де V_k і V_d – середній об'єм пухлини в контрольній і дослідній групах відповідно; відсоток тварин з повною регресією пухлини; а також облік метастазування 3LL, для чого мишей забивали на 21-шу добу після трансплантації пухлини. Ступінь метастазування встановлювали за зміною маси легень,

середньою кількістю метастазів у мишей кожної групи, середнім діаметром метастатичних вузлів, частотою метастазування. Висновок про повну регресію пухлини робили при відсутності видимого та пальпуемого пухлинного вузла.

Тварини були розділені на п'ять груп. Перша (контрольна) – без введення 5-АЛК і наступного опромінення пухлини; друга – введення 5-АЛК без опромінення пухлини; третя – лазерне опромінення пухлини без попереднього введення 5-АЛК; четверта – ФДТ з введенням 5-АЛК. Перед сеансом ФДТ у зоні росту пухлини шерсть видаляли за допомогою вищипування.

Як фотосенсибілізатор використовували гідрохлорид 5-АЛК ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), синтез якої розроблений в Інституті органічної хімії НАН України. Препарат розводили в 0,3 мл фізіологічного розчину і вводили перорально в дозі 500 мг/кг. Опромінення пухлин проводили через 4 год після введення препарату. Джерелом випромінювання був гелій-неоновий лазер ЛГ-111 з довжиною хвилі випромінювання 633 нм, при щільності потужності 150 мВт/см² і експозиції 20 хв.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента. Достовірними вважали відмінності при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При проведенні ФДТ у мишей з карциномою 3LL і саркомою-180 в першу добу після впливу опромінена шкіра над пухлиною темніла і надалі покривалася струпом. Інтенсивність ураження пухлин після введення фотосенсибілізатора виявилася значно більшою, ніж без неї. Очевидно, що поглинання випромінювання тканиною пухлини підсилювалося після обробки 5-АЛК. Струп, який формувався у цих випадках, охоплював усю пухлину, і після відторгнення некротичних мас на шкірі

тварин пальпувався м'який гіпертрофічний рубець. Вогнища пухлинного росту, що з'явилися у деяких мишей по периферії зони некрозу, розцінювалися як рецидив.

Як видно з результатів, представлених у табл. 1, ФДТ–АЛК пригнічує ріст карциноми 3LL. Протягом усього терміну спостережень відзначалися вірогідні зміни ГРП, на 7-му добу його значення сягало 85 %. У наступний термін спостереження (14-та і 21-ша доба) відсоток інгібування росту пухлини становив 63 і 66 % відповідно. При цьому тільки лазерне опромінення, а також застосування 5-АЛК без наступного опромінення пухлини не впливали на зміну показників росту карциноми 3LL.

Крім того, на 7-му добу після ФДТ–АЛК повна регресія пухлини спостерігалася у 10 тварин з 14 (71 %). Однак на 21-шу добу у двох мишей з цієї групи було відзначено поновлення росту карциноми 3LL, що призвело до зниження відсотка повної регресії пухлин до 57 %. В інших досліджуваних групах регресія пухлин була відсутня у всіх тварин.

Слід зазначити, що ФДТ–АЛК (див. табл. 1) призводить до ще більш значимого протипухлинного ефекту у відношенні S-180, який виражався в достовірному гальмуванні приросту пухлини порівняно з контролем. Надалі (14-та доба) ГРП у групі тварин, яким проводилася ФДТ–АЛК, зменшилося зі 100 до 90 %. На 27-му добу спостереження ГРП становило 88 %. У дослідних групах, де застосовували 5-АЛК без наступного опромінення або тільки опромінення без попереднього введення препарату, інгібуюча дія на ріст S-180 не відзначена.

При цьому на 7-му добу в групі з ФДТ–АЛК пухлина пальпаторно не визначалася у жодної тварини. Однак до 14-ї доби у 2 з 14 мишей поновлювався ріст S-180, після чого відсоток повної регресії пухлин становив 86 % і залишився незмінним до завершення спостережень (27-ма доба). Як

і при карциномі 3LL, регресія S-180 в інших дослідних групах також не відзначалася.

З результатів дослідів, представлених у табл. 2, видно, що ФДТ–АЛК призводить не тільки до значної протипухлинної дії на саму карциному 3LL, але й істотно впливає на процес утворення метастазів у легенях. Так, у групі тварин, яким була проведена ФДТ–АЛК, частота метастазування була 33 %, у той час як в інших групах (лазерне

опромінення, застосування лише 5-АЛК і контроль) цей показник становив 100 %. Крім того, при дослідженні метастазування було встановлено, що середнє число метастазів у легенях у групі мишей, яким проводилась ФДТ–АЛК, було в 5,1 раза меншим, ніж у групі тварин, що були піддані лазерному опроміненню без попереднього введення 5-АЛК, в 4,7 раза меншим, ніж у групі мишей, яким вводили тільки 5-АЛК і

Таблиця 1. Вплив фотодинамічної терапії з використанням 5-амінолевулінової кислоти (5-АЛК) на ріст карциноми 3LL і саркоми 180

Показник	Контроль	5-АЛК	Лазерне опромінення	Фотодинамічна терапія і 5-АЛК
Карцинома 3LL				
Об'єм пухлини, см ³ до терапії	0,216 ± 0,006	0,212 ± 0,004	0,215 ± 0,006	0,215 ± 0,005
через				
7 діб	0,439 ± 0,023	0,428 ± 0,018	0,443 ± 0,016	0,063 ± 0,041*
14 діб	1,762 ± 0,127	1,694 ± 0,095	1,808 ± 0,084	0,649 ± 0,331*
21 добу	2,595 ± 0,200	2,273 ± 0,314	2,644 ± 0,185	0,871 ± 0,411*
Гальмування росту пухлини, %				
7 діб		0	0	85
14 діб		0	0	63
21 доба		0	0	66
Повна регресія пухлин, %				
7 діб		0	0	71
14 діб		0	0	71
21 доба		0	0	57
Саркома 180				
Об'єм пухлини, см ³ до терапії	0,205 ± 0,004	0,198 ± 0,004	0,207 ± 0,005	0,205 ± 0,006
через				
7 діб	0,739 ± 0,031	0,614 ± 0,063	0,693 ± 0,024	0*
14 діб	1,154 ± 0,077	0,987 ± 0,102	1,203 ± 0,071	0,115 ± 0,115*
21 добу	1,444 ± 0,07	1,341 ± 0,125	1,481 ± 0,08	0,264 ± 0,264*
27 діб	2,727 ± 0,08	2,653 ± 0,220	2,766 ± 0,101	0,339 ± 0,339*
Гальмування росту пухлини, %				
7 діб		0	0	100
14 діб		0	0	90
21 доба		0	0	82
27 діб		0	0	88
Повна регресія пухлин, %				
7 діб		0	0	100
14 діб		0	0	86
21 доба		0	0	86
27 діб		0	0	86

Примітка. Тут і в табл. 2 * P < 0,05 порівняно з контролем.

Таблиця 2. Вплив фотодинамічної терапії з використанням 5-амінолевулінової кислоти на метастазування карциноми 3LL

Група	Маса легень, мг	Середнє число метастазів у групі	Середній об'єм метастазів на мишу, мм ³	Частота метастазування, %
Контроль	386 ± 20,25	9,83 ± 1,17	14,97 ± 1,47	100
5-амінолевулінова кислота	312 ± 26,66	7,83 ± 1,34	12,33 ± 2,23	100
Лазерне опромінення	354 ± 16,04	8,5 ± 0,85	12,73 ± 3,96	100
Фотодинамічна терапія з 5-амінолевулінової кислоти	205 ± 33,3*	1,67 ± 1,17*	3,77 ± 2,48*	33

у 5,9 раза меншим порівняно з контролем. При цьому середній об'єм метастазів у четвертій групі (ФДТ–АЛК) був у 4 рази меншим від рівня контрольної групи. Частково ступінь метастазування можна було оцінити також і за масою легень тварин. Так, у дослідній групі (ФДТ–АЛК) вона становила 205 г ± 33,3 г, у порівнянні з 354 г ± 16,04 г у групі з лазерним опроміненням, 312 г ± 26,66 г у групі, де застосовували 5-АЛК без наступного опромінення пухлини, і 386,2 г ± 20,25 г у контролі.

Таким чином, проведені дослідження показують, що при ФДТ з використанням як фотосенсибілізатора природного попередника у синтезі гемі – 5-АЛК досягається істотне гальмування росту первинної карциноми 3LL і саркоми-180, що становить 66 і 82 % на 21-шу добу після опромінення відповідно, а також значне зменшення кількості й об'єму метастазів карциноми 3LL. Крім того, повна регресія пухлини у мишей в результаті проведеної ФДТ–АЛК становить для карциноми 3LL – 57 %, для саркоми 180 – 86 %. Отримані результати свідчать про те, що 5-АЛК є ефективним фотосенсибілізатором, що потенційно може бути використаний для фотодинамічної терапії злоякісних новоутворень.

N.F. Gamaleia, V.V. Kutsenok, O.B. Gorobets, M.O. Lozinsky, A.N. Borisevich, V.V. Holin

EXPERIMENTAL PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS WITH 5-ALA

The photodynamic therapy (PDT) of Lewis carcinoma in

c57Bl/6 mice and sarcoma 180 in random bred mice was carried out with 5-aminolaevulinic acid (ALA) used as a photosensitizer. It has been shown that ALA-PDT effectively inhibited the growth of Lewis carcinoma and sarcoma 180, decreased the frequency of metastatic spreading and the number of metastases to lung in mice with Lewis carcinoma. It is concluded that PDT with ALA is a potentially perspective method of tumor treatment.

R.E. Kavetsky Institute for Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine; Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine; "Photonics plus", Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гамалія Н.Ф., Куценко В.В., Чехун В.Ф. Применении 5-аминолевулиновой кислоты в фотодинамической терпии и фотодиагностике опухолей // Онкология. – 2003. – 5, №3. – С. 239–244.
2. Гамалія Н.Ф., Михалкин И.А. Световая терапия опухолей с применением фотосенсибилизаторов // Эксперим. онкология. – 1988. – 10, №1. – С. 9–16.
3. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Молочков В.А. и др. О применении фотодинамической терпии в лечении солитарных и множественных базалиом // Рос. журн. кожн. и венерол. болезней. – 2000. – 4. – С. 4–12.
4. Bagnonas S., Ma L.W., Iani V. et al. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro: a spectroscopy study // Photochem. Photobiol. – 2000. – 72, №2. – P. 186–192.
5. Bonnett R. // Chemical aspects of PDT. – 2000.
6. Bugelski PJ, Porter CW, Dougherty TJ. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse // Cancer Res. – 1981. – 41. – С. 4606–4612.
7. Gerscher S., Connelly J.P., Griffiths J. et al. Comparison of the pharmacokinetics and phototoxicity of protoporphyrin IX metabolized from 5-aminolevulinic acid and two derivatives in human skin in vivo // Photochem. Photobiol. – 2000. – 72, №4. – С. 569–574.
8. Goldman M., Atkin D. ALA/PDT in the treatment of actinic keratosis: spot versus confluent therapy // J. Cosmet. Laser Ther. – 2003. – 5, №2. – С. 107–110.

9. Hinnen P., de Rooij F.W., Hop W.C. et al. Timing of 5-aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy for the treatment of patients with Barrett's oesophagus // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2002. – **68**, №1. – С. 8–14.
10. Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy // *Ibid.* – 1992. – **14**. – С. 275–292.
11. Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience // *Ibid.* – 1991. – **6**. – С. 143–148.
12. Ketly C.J., Brown N.J., Reed M.W.R., Ackroyd R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnosis // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – **1**. – С. 158–168.
13. Kohen E., Santus R., Hirschberg I.G. Photobiology. – 1995.
14. Macdonald LG, Dougherty TJ. Basic principles of photodynamic therapy // *J. Porphyrins Phthalocyanines.* – 2001. – **5**. – С. 105–129.
15. Pass H. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1993. – **85**, №6. – С. 443–456.
16. Rick K., Sroka R., Stepp H. et al. Pharmacokinetics of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood // *J. Photochem. Photobiol.* – 1997. – **40**, №3. – С. 313–319.
17. Sorensen R., Iani V., Moan J. Kinetics of photobleaching of protoporphyrin IX in the skin of nude mice exposed to different fluence rates of red light // *Ibid.* – 1998. – **68**, №6. – С. 835–840.
18. Szeimies R.M., Landthaler M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis of skin cancers // *Cancer. Res.* – 2002. – **160**. – С. 240–245.
19. Van den Boogert J., Houstmuller A.B., de Rooij F.W. et al. Kinetics, localization, and mechanism of 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin accumulation in normal and Barretts-like rat esophagus // *Lasers Surg. Med.* – 1999. – **24**, №1. – С. 3–13.
- Ин-т експерим. патології, онкології і радіобіології ім. Р.С.Кавецького НАН України, Київ;*
Ин-т орган. хімії НАН України, Київ;
Виробниче підприємство „Фотоніка плюс”, Черкаси