

## Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2021  
УДК 612.086  
DOI 10.37469/0507-3758-2021-67-6-849-854

Вопросы онкологии, 2021. Том 67, № 6

*А.А. Кокорина<sup>1,2</sup>, А.А. Рафаелян<sup>1</sup>, К.А. Чемодакова<sup>1</sup>, Н.К. Васильева<sup>1</sup>, Н.В. Пак<sup>1</sup>,  
Б.В. Мартынов<sup>1</sup>, Д.В. Свистов<sup>1</sup>, В.Н. Александров<sup>1,2</sup>*

### Индукцированное 5-аминолевулиновой кислотой накопление протопорфирина IX тканью головного мозга крысы

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

**Цель.** Сравнить уровень накопления протопорфирина IX (ППИХ) в головном мозге крыс в норме и при экспериментальной глиоме С6.

**Материалы и методы.** В эксперименте на 15 крысах одной группе животных (n=5) имплантировали интракраниально глиому С6. Через 14 сут после имплантации опухоли животным вводили в боковую вену хвоста фотосенсибилизатор — препарат 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) Аласенс в дозе 100 мг/кг. Другая группа включала 5 интактных крыс, которым также вводили Аласенс. Крыс эвтаназировали спустя 4–5 ч после инъекции фотосенсибилизатора и проводили флуоресцентную метаболическую навигацию с иллюминацией головного мозга светом с длиной волны 417 и 435 нм. Для объективизации выполнили флуоресцентную биоспектроскопию. Аналогичные манипуляции провели с животными еще одной группы — интактными крысами (n=5), не получившими Аласенс.

**Результаты.** Показано, что, в отличие от человека, у крыс метаболит 5-АЛК — ППИХ накапливается в здоровой ткани головного мозга, при этом интенсивность флуоресценции не отличается от визуализируемой в районе опухоли. Также отмечено, что свет синего спектра способствует слабой флуоресценции белого вещества головного мозга крыс в отсутствие экзогенного 5-АЛК, что потенциально можно объяснить активацией эндогенного ППИХ или других флуорофоров.

**Заключение.** После введения препарата 5-АЛК Аласенса накопление ППИХ тканью головного мозга крысы происходит не только злокачественными клетками, но и нормальной тканью мозга без признаков малигнизации или иных патологических изменений. Требуется более тщательное исследование данного феномена, поскольку значительные

отличия в метаболизме 5-АЛК у человека и лабораторных животных ставят под вопрос корректность трансляции результатов экспериментов в клиническую практику.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, 5-аминолевулиновая кислота, Аласенс, головной мозг, глиома С6

#### Введение

В хирургической практике все чаще применяется фотодинамическая терапия (ФДТ) как самостоятельный малоинвазивный способ редукции опухолевой ткани, а также для индукции гибели остаточных клеток опухоли после ее хирургического удаления [1, 2]. Для ФДТ широко используют препарат 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) Аласенс, поскольку в организме человека 5-АЛК метаболизируется до фотосенсибилизатора протопорфирина IX (ППИХ), который избирательно накапливается преимущественно в опухолевых клетках. При фотоактивации светом с длиной волны 635 нм ППИХ вступает в фототоксические реакции, приводящие к гибели накопивших фотосенсибилизатор клеток. Это явление нашло применение в фотодинамическом способе редукции опухолевой ткани [3]. Следует отметить, что возбуждение ППИХ светом синего спектра позволяет визуализировать его флуоресценцию в диапазоне 635–704 нм [4]. Таким образом, возникает возможность использования 5-АЛК для интраоперационной флуоресцентной диагностики, позволяющей увеличить частоту радикальной резекции злокачественных глиом и вдвое увеличить 6-месячную безрецидивную выживаемость [5].

Возможности применения 5-АЛК как компонента ФДТ изучены недостаточно. Существует множество пробелов в знаниях о чувствительности и эффективности этого способа лечения опухолей различного генеза, локализации, морфологии. Без сомнения, результаты надлежащих

исследований на лабораторных животных окажутся полезными для осмысленного понимания возможностей и перспектив ФДТ, однако, чтобы проецировать полученные в эксперименте данные на человека, необходимо использовать адекватную экспериментальную модель, максимально соответствующую клинической картине.

Часто в исследовательских целях ФДТ проводят на лабораторных животных, которых подвергают операции по доставке суспензии опухолевых клеток через трепанационное отверстие, а после достижения опухоли определенного объема, проводят сеанс ФДТ, позиционируя световод в предыдущий костный дефект. Интраоперационной флуоресцентной визуализации при этом не осуществляют. Данные показывают, что ФДТ с фотосенсибилизатором Фотосенс может неблагоприятно влиять на здоровый головной мозг крыс и даже способствовать гибели животных в контрольной группе [6], в связи с чем возникает вопрос о том, может ли такой эффект быть обусловлен накоплением фотосенсибилизатора в нормальной ткани. Хотя работа L. Lilge и B. Wilson, в которой авторы сравнивали накопление четырех различных фотосенсибилизаторов в здоровой ткани головного мозга кроликов, была опубликована еще в 1998 г. [7], в современной литературе данные о накоплении 5-АЛК в здоровых тканях крыс все еще представлены недостаточно. Тем не менее, знания о накоплении фотосенсибилизаторов в тканях животных очень важны для интерпретации полученных в лаборатории результатов.

## Материалы и методы

Эксперименты проводили с использованием беспородных белых крыс, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Рапполово). Исследование выполнено с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с требованиями Приказа МЗ РФ от 01.04.2016 №199 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Случайной выборкой 15 крыс-самцов Wistar массой 270–380 г разделили на 3 группы, в каждой по 5 животных: контрольная группа включала интактных животных, вторая группа — здоровых крыс, которым вводили препарат Аласенс, третья группа состояла из крыс, которым через 14 сут после имплантации опухоли вводили Аласенс. Успешную имплантацию опухоли подтверждали гистологическим исследованием.

При внутримозговой перевивке животным имплантировали по  $2 \times 10^6$  клеток глиомы крысы линии С6, суспендированных в 10 мкл раствора Хэнкса [8]. Культура клеток была получена из ИИЦ РАН, Санкт-Петербург. Культивировали клетки в стандартных условиях (влажность 95%, температура 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>) в среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. Смену среды осуществляли два

раза в неделю. При достижении 70–90% конfluenceности и перед экспериментом клетки снимали с пластика раствором трипсина-Версена. Все используемые растворы для культивирования производства Биолот (РФ).

Животных наркотизировали препаратом Zoletil 100 в дозе 50 мг/кг (тилетамин, золазепам, Virbac, Франция), фиксировали в стереотаксической установке (Harvard Apparatus, США), на глубину 3 мм через трепанационное окно (2 мм ниже и правее лямбды) вводили суспензию клеток через иглу инсулинового шприца. Кожную рану ушивали (Prolene 3/0, Ethicon, США), для предотвращения инфекционных осложнений шов обрабатывали мазью Левомеколь (Нижфарм, РФ).

Препарат Аласенс (5-АЛК, НИОПИК, РФ) в дозе 100 мг/кг и в концентрации 50 мг/мл 0,9% раствора натрия хлорида животным второй (здоровым) и третьей группы (через 14 сут после имплантации опухоли) вводили в боковую вену хвоста. Через 4–5 ч осуществляли их эвтаназию посредством летальной экспозиции эфира и извлекали головной мозг. Животным контрольной группы вводили внутривенно 0,9% раствор натрия хлорида. Нефиксированный головной мозг использовали для определения эмиссии ППХ.

Флуоресцентную метаболическую навигацию проводили с использованием микроскопа Leica M720 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland), оснащенного флуоресцентным модулем (фильтр FL560) с иллюминацией головного мозга светом с длиной волны 417 и 435 нм, и дополнительного освещения источником света АЛПХ-01-«Диолан». Для объективизации выполнена флуоресцентная биоспектроскопия с использованием волоконного флуоресцентно-отражательного многоканального спектрометра «Skin-AGE». Для возбуждения флуоресценции использовали длину волны 365 нм. Спектры вторичной эмиссии регистрировали в диапазоне 350–750 нм.

Для подтверждения роста внутримозговой опухоли было проведено гистологическое исследование тканей головного мозга животных группы № 3 через 14 сут после имплантации клеток. Биоматериал фиксировали в 10% нормальном забуференном формалине (Биовитрум, РФ), после стандартной гистологической проводки изготавливали парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином (Биовитрум, РФ).

## Результаты

Ни одно животное не погибло раньше планируемого срока эвтаназии. Через 14 сут после имплантации клеток глиомы С6 у всех крыс группы № 3 сформировались опухоли. Опухолевая ткань была представлена низкодифференцированными активно пролиферирующими плеоморфными клетками. Микроскопически опухоль имела классические для глиобластом признаки: высокую клеточность, наличие атипичных митозов, очаги некроза, пролиферацию микрососудов, инфильтрацию в прилежащие отделы мозга с образованием мелких периваскулярных скоплений опухолевых клеток (рис. 1).

При флуоресцентной метаболической навигации в области имплантации опухолевых клеток выявлена интенсивная флуоресценция ярко-розового цвета, что подтверждает накопление ППХ в опухолевой ткани. В то же время наблюдали флуоресценцию в районе зрительного перекреста, ствола мозга, в мозжечке. Полу-

ченные данные коррелировали с результатами биоспектроскопического исследования (рис. 2). Таким образом можно констатировать, что накопление ППХ происходило в зонах с доминированием белого вещества.

У здоровых крыс, получивших Аласенс, картина визуально не отличалась: флуорес-

ценцию отмечали в белом веществе, а также в районе боковых желудочков. При исследовании головного мозга крыс контрольной группы, не получавших Аласенс, флуоресценцию низкой интенсивности регистрировали лишь в областях зрительного перекреста и ствола мозга (рис. 3).

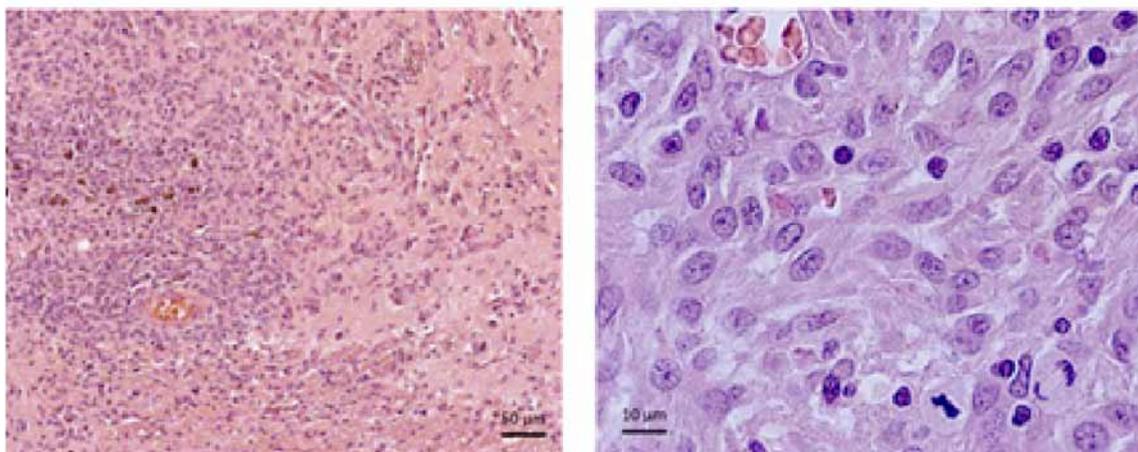


Рис. 1. Микроскопическая картина опухолевой ткани на 14-е сутки после имплантации клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином

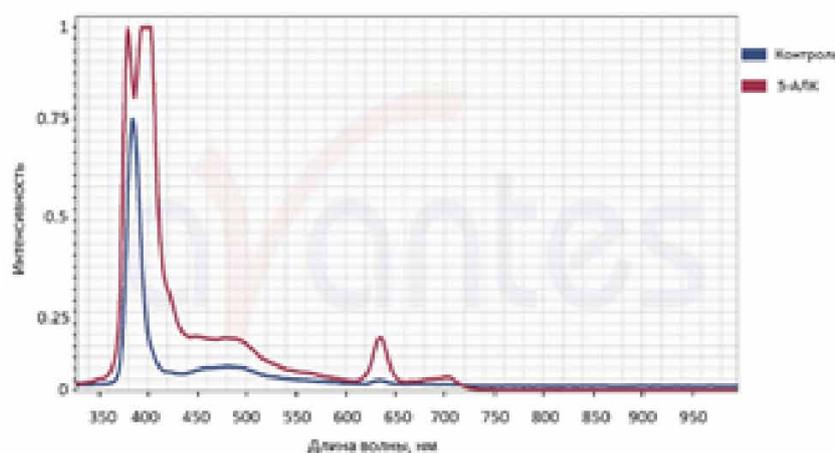


Рис. 2. Спектры эмиссии ткани головного мозга здоровых крыс после введения препарата 5-АЛК или в его отсутствии

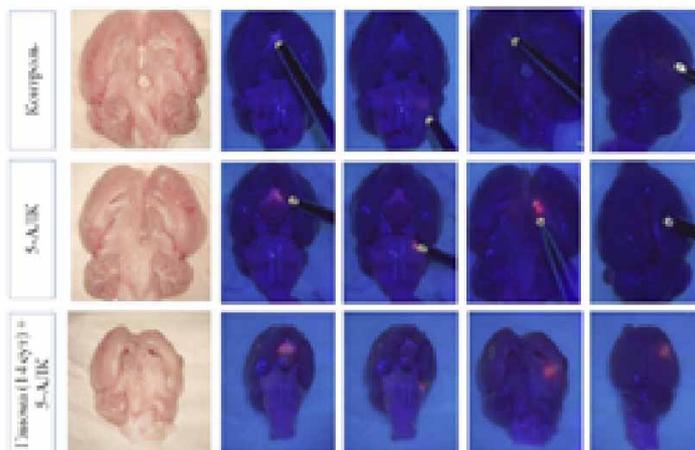


Рис. 3. Сравнение уровня и локализации флуоресценции в группах животных. ППХ визуализируется в розовом спектре при возбуждении синим светом

### Обсуждение

После введения подопытным животным препарата 5-АЛК Аласенса аккумуляция ППХ происходит не только в злокачественных клетках, но и в здоровой ткани головного мозга без признаков малигнизации или иных патологических изменений. Более того, флуоресценция ППХ в некоторых областях головного мозга крысы была выявлена даже в отсутствие экзогенной 5-АЛК, что заставляет задуматься о специфичности и чувствительности метода в контексте экспериментальных исследований.

Действительно, подобные результаты были получены и при исследовании аутофлуоресценции головного мозга мышей после введения 5-АЛК в дозе 200 мг/кг. При этом авторы наблюдали флуоресценцию в области гиппокампа и в мозолистом теле, что соответствует полученным нами данным о накоплении ППХ в белом веществе головного мозга животных. В том же исследовании описан и ложноположительный случай визуализации ППХ у пациента — флуоресценцию наблюдали в области поясной извилины, где отсутствовали опухолевые клетки [9]. Интересно, что в эксперименте с кроликами ситуация была обратная: ППХ в наименьшей степени визуализировали в нормальном белом веществе мозга, по сравнению с серым [7].

В клинической практике Аласенс вводят пациентам перорально в меньшей дозе (около 20 мг/кг), в связи с чем можно предположить, что используемая в работе дозировка могла привести к повышенному накоплению вещества в нормальных клетках. Однако выбранная авторами дозировка и способ доставки обусловлены результатами работ других исследователей, сообщающих об эффективности и рациональности именно такого способа в условиях эксперимента на крысах [10, 11].

Следует отметить, что в клинической практике также фиксируют наличие неспецифической флуоресценции, например, в зонах радионекроза, когда ткань пациента инфильтрована реактивными астроцитами и макрофагами [5]. Кроме того, на фоне приема 5-АЛК врачами-клиницистами замечена слабая флуоресценция здоровой ткани в области боковых желудочков, что, возможно, объясняется высоким уровнем митозов в районе нейрогенеза [12].

Очевидно, что данные о накоплении ППХ нормальной тканью головного мозга животных вызывают опасения в связи с риском повреждения здоровых структур при проведении ФДТ, что может привести к ошибочным выводам при трансляции экспериментальных данных в кли-

ническую практику. Так, в некоторых научных исследованиях показана гибель здоровых животных после проведения ФДТ с 5-АЛК. При этом на гистологических препаратах был отмечен некроз с эозинофильной инфильтрацией и массивный отек головного мозга. Использование стероидных препаратов позволило исследователям нивелировать негативные эффекты, что дает право предполагать, что причиной смерти становился именно отек с последующим повышением внутричерепного давления [6, 13–15]. Однако, следует отметить, что причиной отека может быть гипертермия, а не фотоактивация ППХ. S. Kimura с соавт. показали возникновение неврологического дефицита, повреждение гематоэнцефалического барьера и морфологические изменения в головном мозге у здоровых крыс при проведении ФДТ с 5-АЛК, однако необратимые нарушения были вызваны лишь высокой дозой вещества и/или облучения [16]. Остается актуальным вопрос о том, способен ли высокий уровень накопления ППХ здоровым веществом мозга крыс внести вклад в развитие отека, и насколько это явление видоспецифично.

### Заключение

При введении крысам препарата Аласенс в дозе 100 мг/кг ППХ накапливается в здоровой ткани головного мозга, при этом интенсивность флуоресценции не отличается от визуализируемой в случае наличия опухоли. Флуоресценция наблюдается в области боковых желудочков, зрительного перекреста, ствола мозга, в мозжечке. В отсутствие экзогенной 5-АЛК флуоресценцию низкой интенсивности регистрировали лишь в областях зрительного перекреста и ствола мозга.

Возможно, значительное накопление 5-АЛК нормальной тканью головного мозга, продемонстрированное в работе, является видоспецифичным для грызунов. Требуется более тщательное исследование природы данного явления для формирования вывода о возможности или невозможности использования крысиной модели глиомы С6 для совершенствования техники ФДТ и преклинических исследований эффективности лечебных подходов. Главным вопросом остается участие аккумулярованного нормальными клетками ППХ в формировании негативных эффектов, возникающих на фоне ФДТ в эксперименте.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

*Финансирование*

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рафаелян А.А., Алексеев Д.Е., Мартынов Б.В. и др. Стереотаксическая фотодинамическая терапия в лечении рецидива глиобластомы. Случай из практики и обзор литературы // Журнал «Вопросы нейрохирургии» им. Н.Н. Бурденко. 2020;84(5):81–88 [Rafaelyan AA, Alekseev DE, Martynov BV et al. Stereotactic photodynamic therapy in the treatment of glioblastoma recurrence. Case study and literature review // Zhurnal Voprosy Neirokhirurgii Imeni N.N. Burdenko. 2020;84(5):81–88 (In Russ.)]. doi.org/10.17116/neiro20208405181
2. Артемкин Э.Н., Крюков Е.В., Соколов А.А. и др. Первый опыт внутрипротоковой фотодинамической терапии опухоли Клацкина с использованием технологии SpyGlass™ DS в России // Хирург. 2020;3–4:58–71 [Artemkin EN, Kryukov EV, Sokolov AA et al. The first experience of intraductal photodynamic therapy of Klatskin's tumor using SpyGlass™ DS technology in Russia // Surgeon. 2020;3–4:58–71 (In Russ.)]. doi:10.33920/med-15-2002-06
3. Stepp H, Stummer W. 5-ALA in the management of malignant glioma // Lasers Surg Med. 2018;50(5):399–419. doi:10.1002/lsm.22933
4. Mahmoudi K, Garvey KL, Bouras A et al. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas // J Neurooncol. 2019;141(3):595–607. doi:10.1007/s11060-019-03103-4
5. Горяйнов С.А., Потапов А.А., Пицхелаури Д.И. и др. Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия при повторных операциях по поводу глиом головного мозга // Журнал «Вопросы нейрохирургии» им. Н.Н. Бурденко. 2014;78(2):22–31 [Goryainov SA, Potapov AA, Pitskhelauri DI et al. Intraoperative fluorescence diagnostics and laser spectroscopy in repeated operations for cerebral gliomas // The journal «Questions of neurosurgery» named after N.N. Burdenko. 2014;78(2):22–31 (In Russ.)].
6. Кубасова И.Ю., Смирнова З.С., Ермакова К.В. и др. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия злокачественных глиом у крыс // Российский онкологический журнал. 2013;2:14–18 [Kubasova IYu, Smirnova ZS, Ermakova KV et al. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy of malignant gliomas in rats // Russian Journal of Oncology. 2013;2:14–18 (In Russ.)].
7. Lilje L, Wilson BC. Photodynamic therapy of intracranial tissues: a preclinical comparative study of four different photosensitizers // J Clin Laser Med Surg. 1998;16(2):81–91. doi:10.1089/clm.1998.16.81
8. Фисенко Д.Е., Козар Я.В., Раджабов Р.М. и др. Опухолевая прогрессия глиобластомы С6 при измененном тиреоидном статусе // FORCIPE. 2019;9–14 [Fisenko DE, Kozar YaV, Radzhabov RM et al. Tumor progression of C6 glioblastoma with altered thyroid status // FORCIPE. 2019;9–14 (In Russ.)].
9. Cho SS, Sheikh S, Teng CW et al. Evaluation of diagnostic accuracy following the coadministration of delta-aminolevulinic acid and second window indocyanine green in rodent and human glioblastomas // Mol Imaging Biol. 2020;22(5):1266–1279. doi:10.1007/s11307-020-01504-w

10. Hebeda KM, Saarnak AE, Olivo M et al. 5-Aminolevulinic acid induced endogenous porphyrin fluorescence in 9L and C6 brain tumours and in the normal rat brain // Acta Neurochir (Wien). 1998;140(5):503–12;discussion 512–3. doi:10.1007/s007010050132
11. Hirschberg H, Spetalen S, Carper S et al. Minimally invasive photodynamic therapy (PDT) for ablation of experimental rat glioma // Minim Invasive Neurosurg. 2006;49(3):135–142. doi:10.1055/s-2006-932216
12. Потапов А.А., Гаврилов А.Г., Горяйнов С.А. и др. Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия в хирургии глиальных опухолей головного мозга // Журнал «Вопросы нейрохирургии» им. Н.Н. Бурденко. 2012;76(5):3–12 [Potapov AA, Gavrillov AG, Goryainov SA. And other Intraoperative fluorescence diagnostics and laser spectroscopy in surgery of glial brain tumors // The journal «Questions of neurosurgery» named after N.N. Burdenko. 2012;76(5):3–12 (In Russ.)].
13. Madsen SJ, Angell-Petersen E, Spetalen S et al. Photodynamic therapy of newly implanted glioma cells in the rat brain // Lasers Surg Med. 2006;38(5):540–8. doi:10.1002/lsm.20274
14. Madsen SJ, Kharkhuu K, Hirschberg H. Utility of the F98 rat glioma model for photodynamic therapy // J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2007;26(2):149–55. doi:10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.v26.i2.100
15. Mathews MS, Chighvinadze D, Gach HM et al. Cerebral edema following photodynamic therapy using endogenous and exogenous photosensitizers in normal brain // Lasers Surg Med. 2011;43(9):892–900. doi:10.1002/lsm.21135
16. Kimura S, Kuroiwa T, Ikeda N et al. Assessment of safety of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in rat brain // Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018;21:367–374. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.02.002

Поступила в редакцию 19.07.2021 г.

*A.A. Kokorina<sup>1,2</sup>, A.A. Rafaelyan<sup>1</sup>, K.A. Chemodakova<sup>1</sup>,  
N.K. Vasileva<sup>1</sup>, N.V. Pak<sup>1</sup>, B.V. Martynov<sup>1</sup>,  
D.V. Svistov<sup>1</sup>, V.N. Aleksandrov<sup>1,2</sup>*

**5-aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX in rat brain tissue**

<sup>1</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, St Petersburg, Russia

<sup>2</sup> St Petersburg State Pediatric Medical University, Russian Ministry of Health, Russia

The aim of the study was to compare the level of accumulation of protoporphyrin IX (PPIX) in the brain of rats in normal conditions and in experimental C6 glioma.

Materials and methods. In an experiment on 15 rats, one group of animals (n=5) was intracranially implanted with rat glioma of the C6 line. 14 days after tumor implantation, the animals were injected into the lateral vein of the tail with a photosensitizer — a preparation of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) Alasens at a dose of 100 mg /

kg. Another group consisted of 5 intact rats, which were also injected with Alasens. The rats were euthanized 4–5 hours after the injection of the photosensitizer, and fluorescent metabolic navigation was performed with illumination of the brain with light with wavelengths of 417 and 435 nm. For objectification, fluorescence biospectroscopy was performed. Similar manipulations were performed with animals of another group (n=5) — intact rats that did not receive Alasens.

**Results.** In contrast to humans, in rats, the 5-ALA metabolite — PPIX accumulates in healthy brain tissue, while the fluorescence intensity does not differ from that visualized in the tumor area. It was also noted that the light of the blue spectrum promotes weak fluorescence of the white matter of

the rat brain in the absence of exogenous 5-ALA, which can potentially be explained by the activation of endogenous PPIX or other fluorophores.

**Conclusion.** After the administration of Alasens (5-ALA preparation), the accumulation of PPIX by the rat brain tissue occurs not only by malignant cells, but also by normal brain tissue without signs of malignancy or other pathological changes. A more thorough study of this phenomenon is required, since significant differences in the metabolism of 5-ALA in humans and laboratory animals will call into question the correctness of translation of experimental results into clinical practice.

**Key words:** photodynamic therapy, 5-aminolevulinic acid, Alasens, brain, glioma C6