

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ 5-АЛК И ГЕКСИЛОВОГО ЭФИРА 5-АЛК

Р.И. Якубовская<sup>1</sup>, А.А. Панкратов<sup>1</sup>, Е.В. Филоненко<sup>1,2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>3</sup>,  
В.И. Иванова-Радкевич<sup>3,4</sup>, А.А. Трушин<sup>2</sup>, А.Д. Каприн<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>МНИОИ им П.А.Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей, Москва, Россия

<sup>4</sup>Российский Университет дружбы народов, Москва, Россия

## Резюме

Проведено сравнительное экспериментальное исследование специфической активности препаратов на основе 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) и ее гексилового эфира (ГЭ 5-АЛК). Оценена их способность индуцировать синтез фотоактивного протопорфирина IX в здоровых тканях мочевого пузыря кролика при инстиляции растворов препаратов в различных концентрациях. Исследования показали, что ГЭ 5-АЛК вызывает индукцию и накопление ППХ в эпителии мочевого пузыря кролика в значительно меньших концентрациях, чем 5-АЛК. Так, достоверное увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем удалось достичь при инстиляции в мочевой пузырь кролика раствора ГЭ 5-АЛК в концентрации всего 0,0001% (интенсивность флуоресценции  $2,20 \pm 0,60$  усл.ед.), а для 5-АЛК – только при использовании раствора в концентрации 0,3% (интенсивность флуоресценции  $2,60 \pm 1,02$  усл.ед.).

**Ключевые слова:** флуоресцентная диагностика, протопорфирин IX, 5-аминолевулиновая кислота, гексиловый эфир 5-аминолевулиновой кислоты, мочевой пузырь.

**Для цитирования:** Якубовская Р.И., Панкратов А.А., Филоненко Е.В., Лукьянец Е.А., Иванова-Радкевич В.И., Трушин А.А., Каприн А.Д. Сравнительное экспериментальное исследование специфической активности 5-АЛК и гексилового эфира 5-АЛК // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, № 3. – С. 43–46. doi: 10.24931/2413–9432–2018–7– 3–43–46.

**Контакты:** Филоненко Е.В., e-mail: derkul23@mail.ru

## COMPARATIVE EXPERIMENTAL STUDY OF 5-ALA AND 5-ALA HEXYL ESTER SPECIFIC ACTIVITY

Yakubovskaya R.I.<sup>1</sup>, Pankratov A.A.<sup>1</sup>, Filonenko E.V.<sup>1,2</sup>, Lukyanets E.A.<sup>3</sup>,  
Ivanova-Radkevich V.I.<sup>3,4</sup>, Trushin A.A.<sup>2</sup>, Kaprin A.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>P Herzen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>State Scientific Center Scientific Research Institute Organic Intermediates and Dyes, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

## Abstract

A comparative experimental study of the specific activity of drugs based on 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and its hexyl ester (5-ALA HE) was carried out. Their ability to induce the synthesis of photoactive protoporphyrin IX in the healthy tissues of the rabbit bladder when instilling the drug solutions at various concentrations has been estimated. It was shown that 5-ALA HE results in the induction and accumulation of PPIX in the rabbit bladder epithelium at much lower concentrations than 5-ALA. Thus, a significant increase in the fluorescence intensity in comparison with the control was achieved by instillation of 5-ALA HE solution in the rabbit bladder at a concentration of only 0.0001% (fluorescence intensity  $2.20 \pm 0.60$  a.u.), and for 5-ALA – only when using a solution at a concentration of 0.3% (fluorescence intensity  $2.60 \pm 1.02$  a.u.).

**Keywords:** fluorescence diagnosis, protoporphyrin IX, 5-aminolevulinic acid, hexyl ester of 5-aminolevulinic acid, bladder cancer.

**For citations:** Yakubovskaya R.I., Pankratov A.A., Filonenko E.V., Lukyanets E.A. Ivanova-Radkevich V.I., Trushin A.A. Kaprin A.D. Comparative experimental study of 5-ALA and 5-ALA hexyl ester specific activity, *Biomedical Photonics*, 2018, T. 7, No. 3, pp. 43–46 (in Russian). doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–3–43–46

**Contacts:** Filonenko E.V., e-mail: derkul23@mail.ru

## Введение

Среди современных методов ранней диагностики рака наиболее перспективными в настоящее время считаются флуоресцентные методы, основанные на возможности распознавания злокачественной ткани по индуцированной световым излучением характерной флуоресценции экзогенных или эндогенных флуорохромов [1,2].

Избирательность накопления в тканях опухолевого узла и возможность его обнаружения по спектрам экзогенной флуоресценции из освещаемой лазерным излучением области составляют основу флуоресцентной диагностики (ФД) опухолей. Данный метод позволяет осуществлять детектирование опухолей, а также определять их топографию при сканировании пятна возбуждающего лазерного излучения по поверхности ткани [3].

Флуоресцентная диагностика рака является наиболее перспективной для обнаружения опухолей малых размеров (до 1 мм), локализуемых в поверхностных слоях (эпидермис, эпителий слизистой оболочки), поскольку чувствительность этого метода существенно выше, чем у других современных методов ранней диагностики. Эффективность метода зависит от уровня накопления и локализации красителя в отдельных структурах опухолевого очага и окружающей ткани [4].

Фотосенсибилизаторы I поколения, относящиеся к группе производных гематопорфирина, имеют ряд недостатков, снижающих их диагностический потенциал: низкую интенсивность флуоресценции и флуоресцентную контрастность (опухоль/норма). В связи с этим в лабораториях многих стран продолжается поиск и синтез новых фотосенсибилизаторов с улучшенными диагностическими свойствами.

Одним из путей создания эффективных концентраций фотосенсибилизатора в опухолевой ткани является стимуляция организма к продукции эндогенных фотоактивных соединений – порфиринов и, в частности, метаболита синтеза гема протопорфирина IX (ППІХ). Одним из соединений, эффективно индуцирующих синтез эндогенного ППІХ, является 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) – эндогенное соединение, один из промежуточных продуктов синтеза гема. Избыточное введение в организм 5-АЛК приводит к повышенному образованию ППІХ, который быстро утилизируется в здоровых тканях, превращаясь в

гем под действием фермента феррохелатаза [5,6]. В опухолевых клетках наблюдается дефицит феррохелатазы, в связи с чем происходит временное, но значительное повышение уровня ППІХ, удерживаемого в клетках опухоли в течение нескольких часов. Результатом этого является высокий флуоресцентный контраст между опухолью и окружающей тканью, достигающий 10–15-кратной величины для различных опухолей [7]. Результатом накопления 5-АЛК-индуцированного ППІХ, интенсивно флуоресцирующего в красной области спектра с максимумом на 635 нм, является возможность выявления опухолей и уточнение границ их распространенности [8].

Для проведения ФД рака мочевого пузыря как в России, так и за рубежом применяют препараты на основе 5-АЛК. Как показали клинические исследования, чувствительность метода ФД с препаратами на основе 5-АЛК при флуоресцентной цистоскопии достигает более 90%, что намного превышает максимальную чувствительность рутинного эндоскопического исследования мочевого пузыря (до 50%). Вместе с тем, высокая чувствительность метода сопровождается более низкой специфичностью (50–65%), что снижает его диагностическую точность [9].

Продолжение исследований по улучшению флуоресцентной диагностики привело к разработке диагностических средств на основе метилового и гексилового эфиров 5-АЛК, которые в организме подвергаются метаболической трансформации до 5-АЛК [10]. Будучи более липофильным соединением, чем сама 5-АЛК, эфиры лучше преодолевают биологические мембраны, что способствует их более быстрому и большому накоплению в клетках и включению в биосинтез как предшественников ППІХ.

В настоящей работе в экспериментах *in vivo* проведено сравнение способности препаратов 5-АЛК и её гексилового эфира (ГЭ 5-АЛК) в различных концентрациях индуцировать синтез и накопление фотоактивного ППІХ в тканях мочевого пузыря.

## Материалы и методы

В исследовании изучена специфическая активность двух препаратов: 5-АЛК и ГЭ 5-АЛК.

В экспериментах по оценке интенсивности 5-АЛК-индуцированной флуоресценции протопорфирина IX в слизистой оболочке мочевого пузыря при вну-

трипузырном введении 5-АЛК использовали его растворы в концентрациях 3,0%, 0,3%, 0,03% и 0,01%.

Для приготовления растворов необходимой концентрации порошок 5-АЛК в количестве 300 мг (для получения 3,0%-го раствора), 30 мг (0,3%-го раствора), 3 мг (0,03%-го раствора) или 1 мг (0,01%-го раствора) растворяли в 10 мл 5%-го раствора бикарбоната натрия. Полученные растворы были прозрачными, бесцветными. В мочевой пузырь кролика растворы вводили в объеме 10 мл сразу после их приготовления.

Также для исследований использовали препарат ГЭ 5-АЛК – лиофилизат для приготовления раствора для инстилляций.

В экспериментах исследовали специфическую активность 0,2%-го, 0,01%-го, 0,002%-го, 0,001%-го, 0,0001%-го и 0,00005%-го растворов препарата ГЭ 5-АЛК.

Для приготовления растворов необходимой концентрации порошок ГЭ 5-АЛК в количестве 20 мг (для получения 0,2%-го раствора), 1 мг (для 0,01%-го раствора) и 0,2 мг (для 0,002%-го раствора) растворяли в 10 мл 0,9%-го раствора хлорида натрия. Для приготовления 0,001%-го, 0,0001%-го и 0,00005%-го растворов полученный как описано выше 0,01%-ый раствор разводили 0,9%-ым раствором натрия хлорида до 0,001%, 0,0001% и 0,00005% концентраций. Полученные растворы были прозрачными, бесцветными. В мочевой пузырь кролика растворы вводили сразу после их приготовления в объеме 10 мл.

Исследования проводили на intactных кроликах породы «Шиншилла», самках, массой 2,5–3,5 кг. В условиях предварительной седации путем внутривенного введения реланиума (10–30 мг) или дроперидола (5 мг) производили иммобилизацию мочевого пузыря. Затем в мочевой пузырь вводили растворы ГЭ 5-АЛК или 5-АЛК в указанных выше концентрациях.

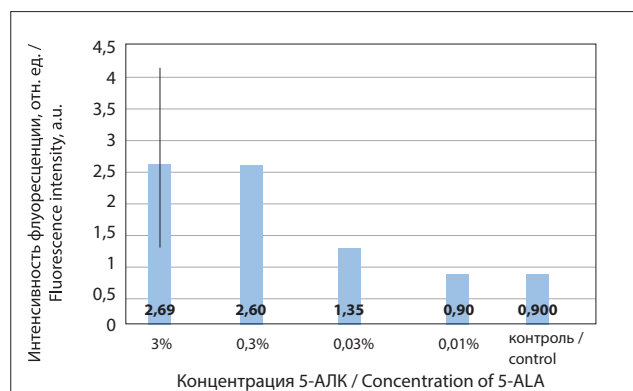
Время экспозиции составляло 2 ч, затем животное умерщвляли путем передозировки препаратов для наркоза, извлекали мочевой пузырь и регистрировали специфическую флуоресценцию ППІХ.

Индукционную флуоресценцию в слизистой мочевого пузыря оценивали методом локальной флуоресцентной спектроскопии с возбуждением излучения твердотельного лазера с длиной волны 532 нм. При математической обработке интегральную интенсивность флуоресценции в диапазоне 620–650 нм нормировали на интегральную интенсивность аутофлуоресценции ткани в диапазоне 555–585 нм, полученную величину обозначили как диагностический параметр (ДП). Регистрацию флуоресценции проводили контактным способом на диагностической установке «Спектр-Кластер» (ООО «Кластер», Россия). Плотность мощности с конца волокна – 7 мВт. В каждом образце ткани для получения достоверного результата измеряли от 5 до 10 спектров. Достоверными считали отличия при  $p \leq 0,05$ .

Контролем служили измерения спектров флуоресценции со слизистой оболочки мочевого пузыря кроликов без введения препаратов.

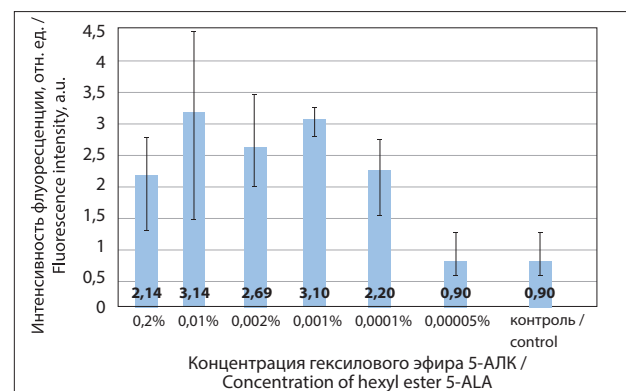
## Результаты и обсуждение

Зависимость 5-АЛК индуцированной флуоресценции ППІХ от концентрации использованного для инстилляций раствора 5-АЛК представлена на рис. 1. Можно видеть, что 2-часовая экспозиция 3% и 0,3% растворов препарата 5-АЛК приводила к значительной индукции синтеза ППІХ в эпителии мочевого пузыря кролика (ДП –  $2,69 \pm 1,37$  усл.ед. и  $2,60 \pm 1,02$  усл.ед., соответственно). При снижении концентрации раствора препарата до 0,03% отмечали снижение интенсивности специфической флуоресценции ППІХ в 2 раза (ДП –  $1,35 \pm 0,32$  усл.ед.) по сравнению с флуоресценцией,



**Рис. 1.** Интенсивность нормированной флуоресценции ППІХ в здоровом эпителии мочевого пузыря кролика после 2-часовой экспозиции растворов 5-АЛК

**Fig. 1.** PPIX normalized fluorescence intensity in the healthy epithelium of the rabbit bladder after a 2-hour exposure to 5-ALA solutions



**Рис. 2.** Интенсивность нормированной флуоресценции ППІХ в здоровом эпителии мочевого пузыря кролика после 2-часовой экспозиции растворов ГЭ 5-АЛК

**Fig. 2.** PPIX normalized fluorescence intensity in the healthy epithelium of the rabbit bladder after a 2-hour exposure to 5-ALA HE solutions

наблюдаемой при использовании 5-АЛК в виде 3%-го раствора, и его неравномерный синтез. Применение 5-АЛК в виде 0,01% раствора не приводило к индукции синтеза эндогенного ППІХ в нормальном эпителии мочевого пузыря кролика (ДП –  $0,90 \pm 0,03$  усл.ед.), что было сопоставимо с контролем.

Экспозиция водного раствора препарата ГЭ 5-АЛК в мочевом пузыре в течение 2 ч в концентрациях 0,2%, 0,01%, 0,002% и 0,001% приводила к значительной индукции синтеза ППІХ (ДП –  $2,14 \pm 0,59$  усл.ед.,  $3,14 \pm 1,64$  усл.ед.,  $2,69 \pm 0,78$  усл.ед. и  $3,10 \pm 0,16$  усл.ед., соответственно). Следует отметить, что интенсивность флуоресценции ППІХ при использовании концентраций растворов ГЭ 5-АЛК до 0,001% была такая же, как при использовании 0,3%-го раствора 5-АЛК. При снижении концентрации раствора препарата ГЭ 5-АЛК до 0,0001% отмечали незначительное снижение (в виде тенденции, статистически недостоверное) интенсивности специфической флуоресценции флуорохрома до  $2,20 \pm 0,60$  усл.ед. Введение 0,00005%-го раствора ГЭ

5-АЛК не приводило к индукции синтеза эндогенного ППІХ в нормальном эпителии мочевого пузыря кролика (ДП –  $0,90 \pm 0,03$  усл.ед.), что было сопоставимо с контролем.

## Заключение

Сравнительный анализ уровня флуоресценции ППІХ после введения 5-АЛК и ее гексилового эфира в зависимости от концентрации вводимых растворов показал значительно более высокую эффективность растворов ГЭ 5-АЛК. При инстилляции в мочевой пузырь кролика 0,0001%-го растворов ГЭ 5-АЛК интенсивность флуоресценции (ДП –  $2,20 \pm 0,60$  усл.ед.) была сопоставима с аналогичным показателем при инстилляции в мочевой пузырь 0,3%-го раствора 5-АЛК (ДП –  $2,60 \pm 1,02$  усл.ед.). Таким образом, сравнение средних данных интенсивности флуоресценции свидетельствуют о том, что ГЭ 5-АЛК вызывает лучшую индукцию и накопление ППІХ в эпителии мочевого пузыря кролика при более низких концентрациях, чем 5-АЛК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов В.В., Чиссов В.И., Филоненко Е.В. и др. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия с препаратами фотосенс и аласенс: опыт 11-летнего клинического применения // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 32–33.
2. Fotinos N., Campo M.A., Popowycz F., et al. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives // *Photochem Photobiol.* – 2006. – Vol. 82, No. 4. – P. 994–1015.
3. Соколов В.В., Филоненко Е.В., Телегина Л.В. и др. Комбинация флуоресцентного изображения и локальной спектрофотометрии при флуоресцентной диагностике раннего рака гортани и бронхов // Квантовая электроника. – 2002. – Т. 32, № 11. – С. 963–969.
4. Kelly J.F., Snell M.E. Hematoporphyrin derivate: a possible aid in diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder // *J. Urol.* – 1976. – Vol. 115. – P. 150–151.
5. Geavlete B., Muțescu R., Georgescu D., Geavlete P. Hexvix induced fluorescence blue light cystoscopy – a new perspective in superficial bladder tumors diagnosis // *Chirurgia (Bucur).* – 2008. – Vol. 103(5). – P. 559–564.
6. Stepp H., Baumgartner R., Beyer W., et al. Fluorescence imaging and spectroscopy of ALA-induced protoporphyrin IX preferentially accumulated in tumor tissue // *Proc. SPIE.* – 1995. – Vol. 2627. – P. 13–24.
7. Kennedy J.C., Pottier R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy (review) // *Photochem. Photobiol.* – 1994. – No. 4. – P. 275–292.
8. Филоненко Е.В., Гришаева А.Б. Методологические аспекты флуоресцентной диагностики злокачественных опухолей с препаратом аласенс // Рос. онкол. журн. – 2011. – № 5. – С. 30–33.
9. Schmidbauer J., Witjes F., Schmeller N., et al. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy // *J. Urol.* – 2004. – Vol. 171. – P. 135–138.
10. Панкратов А.А., Венедиктова Ю.Б., Андреева Т.А. и др. Оценка общетоксических свойств препарата гексасенс в эксперименте // Российский онкологический журнал. – 2010. – № 3. – С. 19–21.

## REFERENCES

1. Sokolov V.V., Chissov V.I., Filonenko E.V., Yakubovskaya R.I., Lukyanets E.A., Vorozhtsov G.N., Kuzmin S.G. Fluorescent diagnostics and photodynamic therapy with photosens and alasens: the experience of 11-year clinical use, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2006, Vol. 5, No. 1, pp. 32–33. (in Russian)
2. Fotinos N., Campo M.A., Popowycz F., Gurny R., Lange N. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives, *Photochem Photobiol*, 2006, Vol. 82, No. 4, pp. 994–1015.
3. Sokolov V.V., Filonenko E.V., Telegina L.V., Bulgakova N.N., Smirnov V.V. Combination of fluorescence imaging and local spectrophotometry in fluorescence diagnostics of early larynx and bronchial cancer, *Kvantovaya elektronika*, 2002, Vol. 32, No. 11, pp. 963–969. (in Russian)
4. Kelly J.F., Snell M.E. Hematoporphyrin derivate: a possible aid in diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder, *J. Urol.*, 1976, Vol. 115, pp. 150–151.
5. Geavlete B., Muțescu R., Georgescu D., Geavlete P. Hexvix induced fluorescence blue light cystoscopy – a new perspective in superficial bladder tumors diagnosis, *Chirurgia (Bucur)*, 2008, Vol. 103(5), pp. 559–564.
6. Stepp H., Baumgartner R., Beyer W., et al. Fluorescence imaging and spectroscopy of ALA-induced protoporphyrin IX preferentially accumulated in tumor tissue, *Proc. SPIE*, 1995, Vol. 2627, pp. 13–24.
7. Kennedy J.C., Pottier R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy (review), *Photochem. Photobiol.*, 1994, No. 4, pp. 275–292.
8. Filonenko E.V., Grishaeva A.B. Methodological aspects of malignant tumors fluorescent diagnostics with alasens, *Ros. onkol. zhurn.*, 2011, No. 5, pp. 30–33. (in Russian)
9. Schmidbauer J., Witjes F., Schmeller N., et al. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy, *J. Urol.*, 2004, Vol. 171, pp. 135–138.
10. Pankratov A.A., Venediktova Yu.B., Andreeva T.A., Yakubovskaya R.I., Rayhlin N.T. Experimental estimation of the hexasens general toxic properties, *Ros. onkol. zhurn.*, 2010, No. 3, pp. 19–21. (in Russian)