

EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

Fotovaisto pasiskirstymas žiurkės ir embriono audiniuose (spektroskopinis tyrimas)

Gražina Gražalienė¹, Violeta Žalgevičienė³, Janina Didžiapetrienė¹, Janina Žukienė³, Angelė Sukackaitė¹, Vladislavas Legenis², Ričardas Rotomskis^{1, 2}

Vilniaus universiteto ¹Onkologijos instituto Biomedicininės fizikos laboratorija, ²Lazerinių tyrimų centro Biofotonikos laboratorija, ³Medicinos fakulteto Anatomijos, histologijos ir antropologijos katedra

Raktažodžiai: fluorescencinė spektroskopija, fotovaistas, embriogenezė, placenta, embrionai.

Santrauka. Darbo tikslas. Nustatyti fotosensibilizatoriaus fotofrino II susikaupimą vaikingos žiurkės organuose, placentoje ir embrionuose bei iširti, kurios embriogenezės stadijos metu fotosensibilizatorius efektyviausiai kaupiasi embrionuose.

Tyrimui naudotos Wistar linijos (160–240 g) žiurkės. Patelės nakčiai buvo paliekamos kartu su patiniais. Po 24 valandų buvo daromas patelės makštis tepinėlis ir ieškoma spermatozoidų. Para, kai tepinėlyje nustatomi spermatozoidai, laikoma 0 apvaisinimo para.

Pasirinktomis (7-ąją, 14-ąją, 16-ąją, 18-ąją ir 20-ąją) embriogenezės paromis, žiurkėms į uodegos veną buvo sušvirškta fotosensibilizatoriaus fotofrino II 5 mg/kg dozė. Praėjus 24 valandoms po fotovaisto sušvirškimo, žiurkės užmigdžius, buvo imami šie organai: smegenys, blužnis, kepenys, inkstai, plaučiai, gimda, placenta bei embrionai. Iš paimtų organų paruošiami preparatai fluorescencinei spektroskopijai. Kiekvienam preparatui atliekama 10–15 matavimų įvairiuose taškuose. Audinių sensibilizuota fluorescencija ex vivo matuota naudojant „Ocean Optics S2000-Fl“ šviesolaidinį fluorimetrą žadinant bandinį mėlyna šviesa ($\lambda=400$ nm).

Lyginamieji fluorescencijos spektrų tyrimai 7-ąją, 14-ąją, 16-ąją, 18-ąją ir 20-ąją embriogenezės paromis, parodė, jog 7-ąją embriogenezės parą fotovaisto embrione susikaupia daugiausia, o kitomis paromis užfiksuotas didelis fotosensibilizatoriaus susikaupimas gimdoje bei placentoje. Tyrimo duomenys rodo, jog fotofrino II kaupimasis embrione priklauso nuo embriogenezės stadijos ir galbūt sąlygotas placentinio barjero pralaidumo. Tyrimo duomenimis, fotovaistas gali sukelti embriono pažaidas, švitinant fotosensibilizuotas vaikingas žiurkės taškuose, išsidėsčiusiuose arti embriono.

Įvadas

Fotosensibilizuota navikų terapija (FNT) (literatūroje dažnai vadinama fotodinamine terapija) yra vienas gydymo metodų, sėkmingai aprobuotas įvairiose pasaulio šalyse piktybiniams navikams gydyti (1). Šis metodas pagrįstas fotosensibilizatorių savybe kauptis navike ir, apšvietus ją tinkamo bangos ilgio šviesa, sukelti ląstelių pažaidas (2).

Porfirininiai sensibilizatoriai – vieni plačiausiai vartojamų fotovaistų. Fotofrinas II ir hematoporfirino darinys jau vartojami klinikinėje praktikoje gydant plaučių, stemplės, gimdos kaklelio, šlapimo pūslės, tulžies pūslės navikus ir mezoteliomas (3). Japonijoje šis metodas aprobuotas gimdos kaklelio navikams gydyti (1), todėl neatmetama galimybė FNT metodą taikyti ir nėščioms moterims (gydyti), nes navikinių

ligų vis daugėja tarp jauno amžiaus moterų.

Literatūroje mažai duomenų apie FNT taikymą nėštumo laikotarpiu, tačiau pavieniai tyrimai jau atliekami. Marco de Santis (2004) su bendraautoriais tyrė fotosensibilizatorių verteporfiną (4), skirdami jį trečią embriogenezės savaitę nėščioms moterims, sirgusioms patologine trumparegyste. Vėliau buvo tiriami ką tik gimę kūdikiai bei 26 mėnesių sulaukę vaikai. Šio fotovaisto neigiamo poveikio tyrėjai nenustatė. Kiti tyrėjai teigia (5), jog 10-ąją embriogenezės parą sušvirškstus žiurkėms 5-aminolevulinės rūgšties ir paveikus fotoaktyvuojančiąja šviesa, sukliamos embrionų rezorbcijos.

Fluorescencinė spektroskopija yra vienas pagrindinių metodų, kuris naudojamas fotovaisto susikaupimui įvairiuose organuose ar jo pasiskirstymui navi-

kiniuose audiniuose tirti (6, 7).

Šio darbo tikslas – spektroskopiniais metodais įvertinti fotosensibilizatoriaus susikaupimą žiurkių embrionuose, placentoje ir gimdoje bei nustatyti, kurios embriogenezės stadijos metu fotosensibilizatorius geriausiai kaupiasi embrionuose.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Eksperimentai buvo atliekami su *Wistar* linijos baltsiomis žiurkėmis, sveriančiomis 160–240 g. Žiurkės gautos iš Vilniaus universiteto Imunologijos instituto Biomodelių laboratorijos. Gautas Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas Nr. 0019 atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais. Tirti 25 embrionai. Vartotas fotovaistas fotofrinas II (AXCAN PHARMA INC. CANADA), dozė – 5 mg/kg.

Patelės nakčiai buvo paliekamos su patiniais. Po 24 valandų mikroskopu buvo nustatoma estralinio ciklo estruso stadija ir ieškoma spermatozoidų. Diena, kai patelės makštis tepinėlyje rasta spermatozoidų, laikoma nuline. Kiekvieną tiriamąją grupę sudarė keturios apvaisintos žiurkės. Nustatytomis (7-ąją, 14-ąją, 16-ąją, 18-ąją ir 20-ąją) embriogenezės paromis žiurkėms į uodegos veną buvo sušvirkšta fotosensibilizatoriaus fotofrino II. Praėjus 24 valandoms po fotovaisto sušvirkštimo, žiurkės buvo užmigdomos ir paimama spektroskopiniams tyrimams smegenys, blužnis, kepenys, inkstai, plaučiai, gimda, taip pat placenta bei embrionai. Iš paimtų organų buvo paruošiami preparatai matavimams fluorescencinės spektroskopijos metodu. Kiekvienam preparatui įvairiuose taškuose atlikta 10–15 matavimų. Audinių fluorescencija *ex vivo* matuota su „Ocean Optics S2000-FI“ šviesolai-

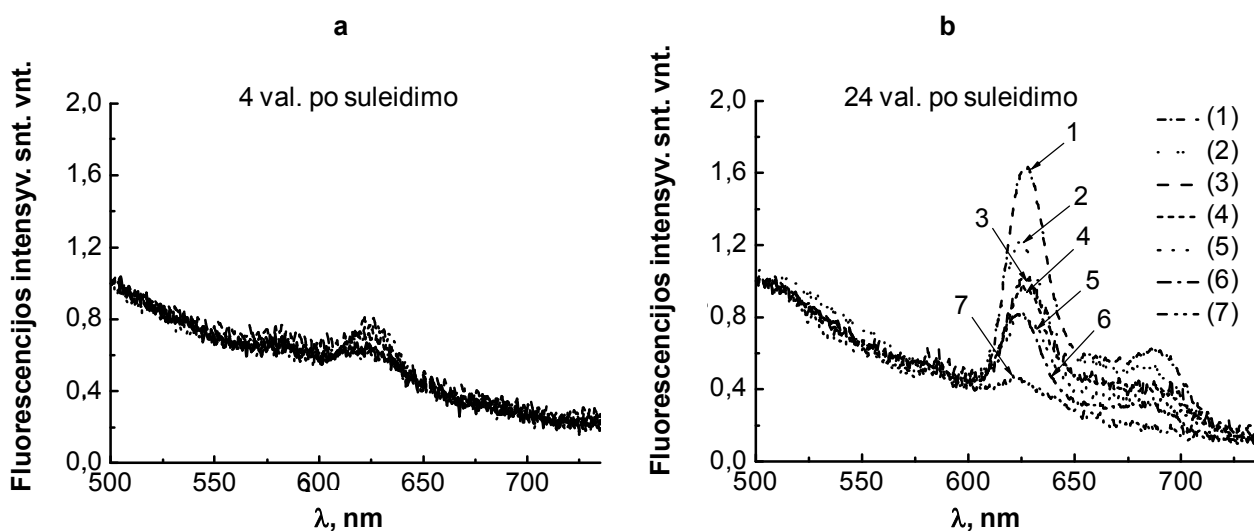
diniu fluorimetru fluorescenciją žadinant diodiniu šviestuku, spinduliuojančiu mėlyną šviesą ($\lambda=400$ nm).

Rezultatai ir jų aptarimas

Pirmame (a, b) paveiksle pateikti įvairių žiurkės organų fluorescencijos spektrai, išmatuoti praėjus 4 ir 24 valandoms po fotovaisto fotofrino II sušvirkštimo į uodegos veną. Visų žiurkės organų audiniai pasižymi savita fluorescencija, kurios intensyvumas mažėja didėjant registruojamo spektro bangos ilgiui. Sensibilizuotuose audiniuose raudonoje spektro srityje ties 600–700 nm registruojama fotovaisto fotofrino II fluorescencija su jai būdingomis fluorescencijos juostomis ties 630 ir 705 nm (1 pav.).

Fotofrino II fluorescencijos intensyvumas raudonoje spektro srityje yra daug didesnis matuojant spektrus praėjus 24 valandoms po jo sušvirkštimo į žiurkės uodegos veną (1 b pav.). Bandinių, paimtų iš blužnies, kepenų, plaučių, smegenų, ausies odos, inkstų bei gimdos, fluorescencijos spektrai (sunormuoti ties 500 nm – audinių savitosios fluorescencijos maksimalus intensyvumas) pateikti antrame paveiksle.

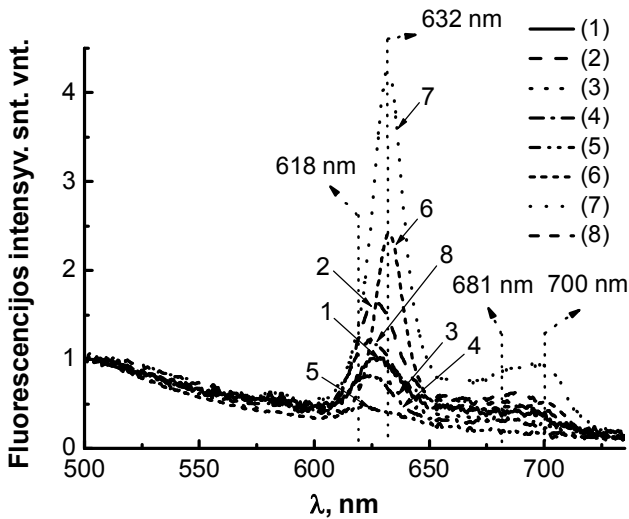
Didžiausias fluorescencijos intensyvumas, praėjus 24 valandoms po fotofrino II sušvirkštimo užfiksuotas gimdos, odos ir kepenų audiniuose. Fotovaisto, susikaupusio šiuose gausiai kraujyje aprūpinamuose organuose, fluorescencijos intensyvumai panašūs. Manant, kad fotofrino II sąveika su aplinka įvairiuose organuose neturėtų labai skirtis (tai rodo fluorescencijos intensyvumo smailės padėties pastovumas matuojant fluorescencijos spektrus įvairiuose organuose), susikaupusio fotofrino II koncentracija minėtuose organuose yra panaši.



1 pav. Žiurkės organų fluorescencijos spektrai

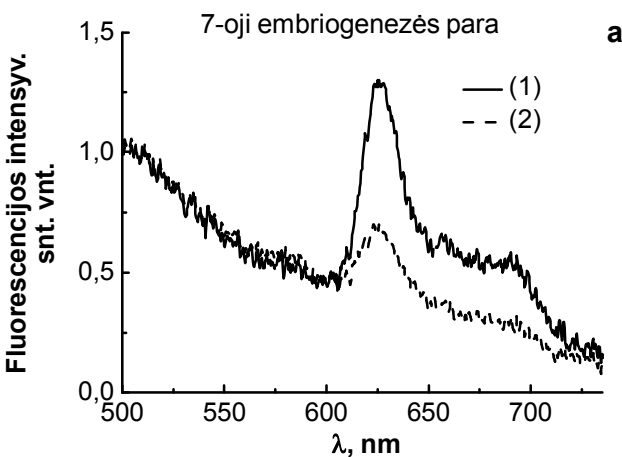
a – praėjus 4 val. ir b – 24 val. po fotofrino II išvirkštimo:

1 – kepenys, 2 – inkstai, 3 – blužnis, 4 – gimda, 5 – plaučiai, 6–7 – smegenys.

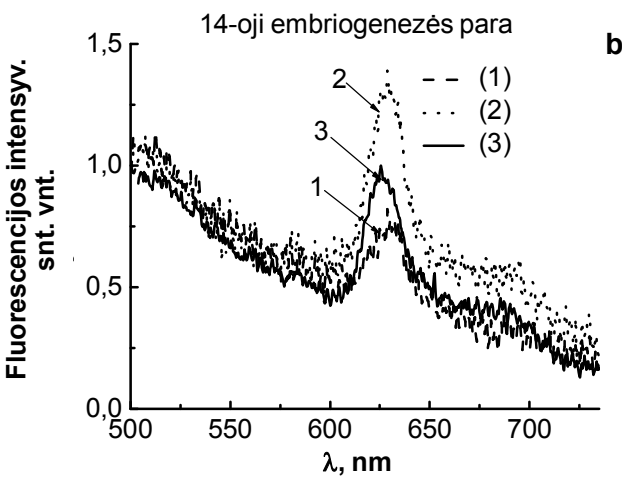


2 pav. Normuoti ties 500 nm žiurkės organų fluorescencijos spektrai po 24 valandų po fotofrino II įšvirkštimo

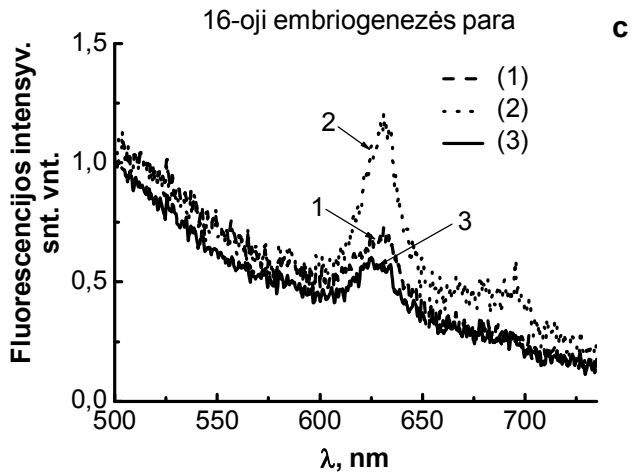
1 – blužnis, 2 – kepenys, 3 – plaučiai, 4–5 – smegenys, 6 – oda, 7 – gimda, 8 – inkstai.



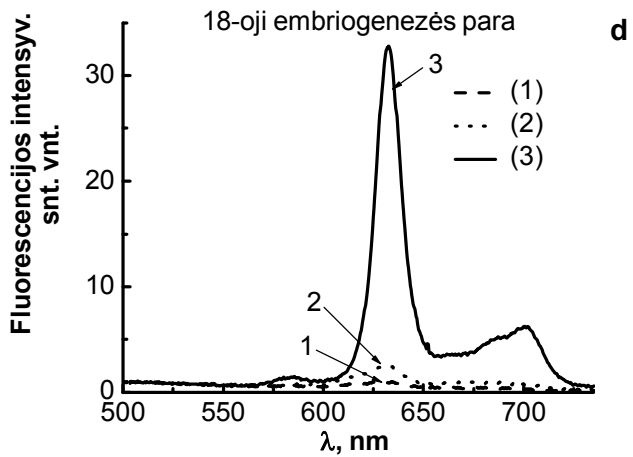
a



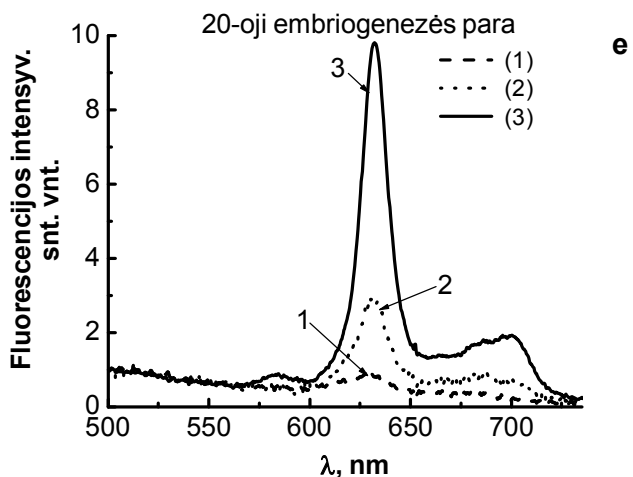
b



c



d



e

3 pav. Fotofrino II susikaupimo fluorescencijos spektrų vidurkiai ir norma ties savitosios fluorescencijos maksimaliu intensyvumu (500 nm)

a – 7-oji embriogenezės para: 1 – embrione, 2 – gimdoje;

b, c, d, e – 14-oji, 16-oji, 18-oji, 20-oji embriogenezės paros: 1 – embrione, 2 – placentoje, 3 – gimdoje.

Nustatyta, kad fotofrino II fluorescencijos intensyvumas priklauso ne tik nuo audinio, bet ir nuo embriogenezės paros. Tai rodo embriono ir gimdos audinių fluorescencijos spektrai, pateikti 3 a, b, c, d, e paveiksluose.

Septintąją embriogenezės parą, kai placenta dar nesuformavusi ir embrionus sieja tiesioginė kraujotaka su motina, fotovaisto embrione susikaupia gerokai daugiau nei gimdoje (3 a pav.). Šią parą yra tik embriono užuomazga, tačiau fluorescencijos matavimai rodo, kad embriono formavimosi vietoje fotofrino II susikaupimas yra didesnis nei aplinkiniuose gimdos audiniuose. 14-ąją embriogenezės parą embrionuose fotovaisto susikaupia mažiau nei placentoje ar gimdoje (3 b pav.). 16-ąją, 18-ąją bei 20-ąją embriogenezės paromis embrionuose susikaupusio fotofrino II fluorescencijos intensyvumas ties 630 nm išlieka nedidelis ir varijuoja nežymiai (3 c, e, pav.). Šiomis embriogenezės paromis placentos ir gimdos audinių fluorescencijos spektrai pasižymi didesniu fluorescencijos intensyvumu nei embrionų. Matuojant placentos fluorescenciją motininėje placentos dalyje ir chorione (vaisiaus placenta), užfiksuotas panašus susikaupusio fotovaisto fluorescencijos intensyvumas. Jis padidėja tik chorione, virkštelės prie placentos prisitvirtinimo vietoje (4 pav.). Tai rodo, kad, esant aktyviai žiurkės kraujotakos sistemos veiklai, kai per placentą aktyviai pristatomos embrionui būtinos maisto ir kitos medžiagos, tiek motininėje placentos dalyje, tiek chorione susikaupia ir fotovaistas. Mažas fluorescencijos intensyvumas embrione, matyt, yra todėl, kad jį sustabdo placentos barjeras. Todėl į embriono audinius fotovaisto patenka nedaug ir jo koncentracija vaisių aprūpinančioje kraujotakos sistemos dalyje yra žymiai mažesnė nei placentoje.

20-ąją embriogenezės parą užfiksuotas didesnis

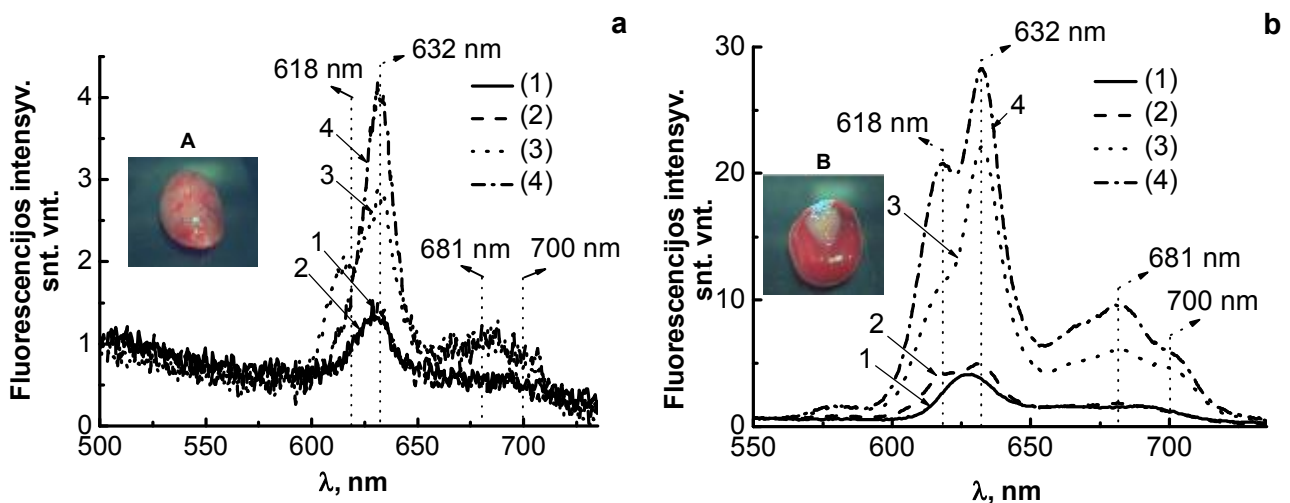
fotovaisto susikaupimas chorione ir embrione (4 pav.). Toks fotovaisto koncentracijos padidėjimas vaisiaus audiniuose paskutinę embriogenezės parą gali būti siejamas su placentos persitvarkymu prieš gimdymą. Be to, pastebėta, jog vaisiaus placentoje, virkštelės prisitvirtinimo vietoje, kur esti vaismaišio liekanos, fluorescencijos intensyvumas dar didesnis. Todėl manoma, jog fotovaisto patekimui į embrioną didelės įtakos turi ir kiti embriono dangalai, pvz., vaismaišis.

Išvados

Šio tyrimo duomenimis, fotofrinas II kaupiasi visuose tirtuose audiniuose. Fotovaisto pasiskirstymas žiurkės organuose, praėjus 4 valandoms po injekcijos į uodegos veną, yra panašus, tačiau, praėjus 24 valandoms po fotovaisto injekcijos, daugiau jo susikaupia kepenyse, blužnyje, inkstuose, taip pat gimdoje.

Fotovaisto kaupimasis embrione priklauso nuo embriogenezės stadijos: intensyvi fotosensibilizatoriaus fluorescencija nustatyta 7-ąją embriogenezės parą – placentos formavimosi pradžioje; mažesnė – 14-ąją, 16-ąją, 18-ąją, kai placenta jau susiformavusi. Padidėjusį fluorescencijos intensyvumą embrione, užfiksuotą 20-ąją embriogenezės parą, matyt, sąlygoja placentos persitvarkymas prieš gimdymą.

Palyginus fotovaisto fluorescencijos intensyvumą placentoje bei embrione, nustatyta, kad, susiformavus placentai, embrione fotosensibilizatoriaus susikaupia daug mažiau, o pačioje placentoje registruojama intensyvi fotovaisto fluorescencija, sąlygota didelio jo susikaupimo placentos audinyje. Todėl manoma, jog placenta atlieka barjero funkciją fotovaistui ir fotofrino kaupimasis embrione priklauso nuo placentos barjero pralaidumo.



4 pav. Placentos fluorescencijos spektrai, pamatuoti motinos (a) ir vaisiaus (b) dalyse praėjus 24 val. po fotofrino II įšvirkštimo

1 – 14-oji, 2 – 16-oji, 3 – 18-oji, 4 – 20-oji embriogenezės paros.

Fotovaisto kaupimasis embrione gali turėti neigiamą įtaką embriono vystymuisi, tačiau ši prielaida gali būti patvirtinta tik nuodugniai ištyrus FNT embriotoksinį bei teratogeninį poveikį.

Padėka

Straipsnio autoriai dėkoja Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui, finansavusiam šiuos mokslinius tyrimus (tema Nr. T-90/05).

Accumulation of photosensitizer in rat embryos (a spectroscopic study)

Gražina Gražalienė¹, Violeta Žalgevičienė³, Janina Didžiapetrienė¹, Janina Žukienė³,
Angelė Sukackaitė¹, Vladislavas Legenis², Ričardas Rotomskis^{1, 2}

¹Laboratory of Biomedical Physics, Institute of Oncology, ²Laser-induced Research Center, Vilnius University,

³Department of Anatomy, Histology and Anthropology, Faculty of Medicine, Vilnius University, Lithuania

Key words: fluorescence spectroscopy, photodrug, embryogenesis, placenta, embryo.

Summary. *The aim* of the present study was to investigate the accumulation of photosensitizer Photofrin II in the different organs as well as the placenta and embryos of pregnant rats and to determine during which stage of embryogenesis the photosensitizer is accumulated the most effectively.

Materials and methods. The experiments were carried out on 25 fetuses from 10 Wistar rats (weight 160-240 g). Female rats were mated with male rats in the evening. Vaginal smears were collected from each female rat next morning and were examined by microscope in order to determine the presence of sperm. The day when sperm was detected in the vagina was considered to be pregnancy day 0. Photofrin II (a dose of 5 mg/kg) was administered intravenously to pregnant rats on days 7, 14, 16, 18 and 20 of embryogenesis. Rats were euthanized 24 hours after intravenous injection of Photofrin II and the following organs were taken: brain, spleen, liver, kidneys, lungs, uterus, placenta, and embryos. The accumulation of the photosensitizer was observed in the samples prepared from these parts of body. Fluorescence measurements *ex vivo* were performed with an S2000-FI fluorescence spectrometer (Ocean Optics Inc., Florida, USA) by exciting the samples with a blue light emitting diode ($\lambda=400$ nm).

Results. A comparative study of fluorescence spectra on days 7, 14, 16, 18 and 20 of embryogenesis showed that the most intense accumulation of Photofrin II in the embryo was on day 7, while on the other days of embryogenesis the accumulation of Photofrin II increased obviously in the uterus and placenta.

Conclusions. The obtained data show that the accumulation of Photofrin II in the embryo depended on the stage of embryogenesis as well as on permeability of the placental barrier. Further photodynamic therapy studies are necessary to determine the total effect of Photofrin II on the embryo.

Correspondence to G. Gražalienė, Laboratory of Biomedical Physics, Institute of Oncology, Vilnius University, Polocko 2, 01204 Vilnius, Lithuania. E-mail: grazina.grazeliene@takas.lt

Literatūra

1. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature* 2003;3:3080-7.
2. Rotomskis R, Streckytė G, Gričiūtė L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai (monografija). (Photosensitized tumour therapy: primary processes.) Vilnius: Lietuvos mokslas; 2002.
3. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer I* 1998;90(12):889-905.
4. De Santis M, Carducci B, De Santis L, Lucchese A, Straface G. First case of post-conception Verteporfin exposure: pregnancy and neonatal outcome. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82(5):623.
5. Yang JZ, Van Vugt DA, Melchior MF, Hahn PM, Reid RL. Photodynamic ablation of early pregnancy in the rat with 5-aminolevulinic acid: a potential new therapy for tubal ectopic pregnancy in the human. *Fertil Steril* 1994;62(5):1060-5.
6. Rotomskis R, Streckytė G. Fluorescencinė navikų diagnostika. (Fluorescence diagnostics of tumors.) *Medicina (Kaunas)* 2004;40(12):1219-30.
7. Tamosiunas M, Makaryceva J, Labanauskiene J, Bagdonas S, Aleksandraviciene C, Didžiapetrienė J, et al. Autofluorescence of Transplantable Hepatoma A22 (MH-A22): Prospects of Tumor Tissue Optical Biopsy. *Exp Oncol* 2004; 26(2):118-24.

Straipsnis gautas 2005 11 07, priimtas 2005 12 15
Received 17 November 2005, accepted 15 December 2005