

## ІНТРАОПЕРАЦІЙНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ВІЗУАЛІЗАЦІЯ ПРИЩИТОПОДІБНИХ ЗАЛОЗ ПІД ЧАС ЇХ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ У ЩУРІВ

**В.М. Зубачик<sup>1</sup>, Л.Ю. Мін'ко<sup>2</sup>, І.П. Патерега<sup>3</sup>**

*Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького*

<sup>1</sup> *Кафедра терапевтичної стоматології (зав. - проф. В.М. Зубачик)*

<sup>2</sup> *Кафедра терапевтичної стоматології ФПДО (зав. - проф. Т.Д. Заболотний)*

<sup>3</sup> *Державний науково-дослідний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок (директор - проф. І.Я. Коцюмбас)*

### Реферат

*У експерименті на щурах для ідентифікації та візуалізації інтактних прищитоподібних залоз під час їх трансплантації досліджено використання 5-амінолевулінової кислоти. Встановлено, що внутрішньо-очеревне введення флуоресцентного агента за 2 год. до хірургічного втручання у мінімально-ефективній дозі 300-400 мг/кг була оптимальним для фотодетекції прищитоподібних залоз упродовж 2-4 год. Безпечна флуоресцентно направлена хірургія може застосовуватися у людей.*

**Ключові слова:** щурі, прищитоподібна залоза, візуалізація, 5-амінолевулінова кислота

### Abstract

**INTRAOPERATIVE IDENTIFICATION AND VISUALIZATION OF PARATHYROID GLANDS DURING TRANSPLANTATION IN RATS**

*V.M. ZUBACHYK<sup>1</sup>, L.Yu. MIN'KO<sup>1</sup>, I.P. PATEREHA<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv*

<sup>2</sup> *State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Preparations and Fodder Additives*

*The use of 5-aminolevulinic acid to identify and visualize intact parathyroid glands during their transplantation was examined in rats. Intraventral injection of a fluorescent agent 2 hours before surgery using the minimally effective dose of 300-400 mg per kg was found to be optimal for the photodetection of parathyroid glands for 2-4 hours. Thus, this allows safe fluorescence-guided surgery to be performed in patients.*

**Key words:** rats, parathyroid gland, visualization, 5-aminolevulinic acid

### Вступ

Ідентифікація прищитоподібних залоз (ПЩЗ) під час хірургічних втручань може ускладнюватися у зв'язку з їх малими розмірами, кількістю, анатомічними варіаціями, близьким сусідством до важливих структур і ненадійною візуалізацією [6, 7]. Мінімально інвазійні підходи до паратиреоїдектомії є бажаними як для хірурга, так і для пацієнта, тому що асоціюються з меншим боєм, зменшенням рубця, скороченням терміну одужання [2, 14]. Зважаючи на те, що розміри ПЩЗ у щурів менші за 1 мм у діаметрі

й їх не можна візуалізувати в умовах звичайного світла [12], для інтраопераційної ідентифікації цих залоз пропонуються використовувати радіонукліди [13]. Застосування останніх для діагностики безпосередньо під час операції як у тварин, так і у людей, на жаль, є мало ефективним. Водночас барвники [4] зафарбовують великі площі і практично всі тканини, без чіткого окреслення дрібних структур. Тканини не завжди змінюють колір, оскільки для цього повинен бути різний тканинний метаболізм, а при надто малих розмірах ПЩЗ у щурів пропонований спосіб взагалі недоцільний.

Низкою дослідників було запропоноване лікування, зокрема у людей, зі злоякісними новоутворами шкіри, сечового міхура, легень, шлунково-кишкового тракту, порожнини рота, де ідентифікацію тканин під час операції проводили флуоресцентним методом [5, 8, 10, 11]. Для цього використовували 5-амінолевулінову кислоту (5-АЛК), яка має здатність накопичуватися в малігнізованих тканинах [11]. Можна припустити, що ПЩЗ також можливо виявляти флуоресцентним методом, тому що вони (залози) мають підвищений обмін речовин у порівнянні з оточуючими їх тканинами.

Мета нашого дослідження: дослідити можливість флуоресцентної інтраопераційної ідентифікації інтактних прищитоподібних залоз для їх трансплантації.

### Матеріал і методи

Дослідження проведено на 36 білих щурах лінії Вістар віком 8-9 тижнів стадного розведення, самцях і самках порівну, масою 170-200 г. Тварин утримували у пластикових клітках за стандартних умов віварію з 12-годинним циклом "день-ніч", які мали стандартне харчування і вільний доступ до води. Під час роботи із піддослідними тваринами дотримувалися Міжнародних рекомендацій щодо медично-біологічних

досліджень із використання лабораторних тварин [1]. У щурів-донорів проводили двобічну паратиреоїдектомію. Трансплантацію ПЩЗ щурам-реципієнтам здійснювали з метою моделювання у них первинного гіперпаратиреозу.

Для визначення оптимальної дози та часу введення 5-АЛК в експерименті використовували дози 100, 200, 300, 400, 500 і 700 мг/кг тварини. Препарат вводили внутрішньо-очеревинно за 2 год. перед операцією і досліджували флуоресценцію через 1, 2 та через 4 год. під час операційного втручання на ПЩЗ. 5-АЛК білий порошок (Інститут органічної хімії НАН України), який безпосередньо перед ін'єкцією розводили 0,9% фізіологічним розчином до 3% концентрації. Фотодетекцію паратиреоїдної тканини спостерігали за допомогою стереомікроскопа при ілюмінації голубим світлом. ПЩЗ фотографували перед і після видалення, використовуючи джерело ксенонового світла, де час експозиції становив 2 секунди.

### **Методика проведення операції**

#### **з трансплантації прищитоподібних залоз**

Тваринам-донорам під ефірним наркозом проводили розтин шкіри у ділянці передньої щільності шиї довжиною 2-3 см. Після цього тупим шляхом під звичайним світлом розсували м'язи, щоб мати прямий доступ до задньо-латеральної поверхні щитоподібної залози, де розміщені ПЩЗ. У такому стані щура-донора фіксували та продовжували давати наркоз.

У щура-реципієнта проводили розтин шкіри, відповідно щуру-донору, та кивального м'яза в середній третині (*m. Sternocleidomastoides*) по довжині м'яза 1,0 см глибиною 1,0 см і утворювали кишеню (місце) для трансплантованого органу. У щура-донора висікали мічені флюоресцентним агентом прищитоподібні залози (за 2 год. до операції вводили 300 мг/кг препарату 5-АЛК), а за відсутності такого світіння залоз препарування продовжували до адекватного їх розташування, виключаючи топографічну нетиповість і отримання "фальшивих" прищитоподібних тканин. Проводили двобічну паратиреоїдектомію, трансплантат подрібнювали, не розсікаючи на фрагменти, і вводили щуру-реципієнту у підшкірний м'яз шиї (*m. Platizma*) відповідно до рекомендацій В.Б. Добродня і співавт. [3], на роз-

тин накладали кетгутувий шов. Шкіру реципієнта зашивали, а операційну ділянку обробляли 3% спиртовим розчином йоду.

У наступні дні проводили ревізію операційної рани. Повне загоєння рани відзначали через 7-9 діб. За результатами експериментального дослідження визначено, що трансплантовані ПЩЗ добре прижилися. Контролем слугували неправдиво прооперовані щури (5 особин). Цій групі тварин проводили за наведеною методикою розтин, без операційного втручання на ПЩЗ із наступним закриттям рани.

### **Результати й обговорення**

Попереднє введення тваринам препарату 5-АЛК у загальноживаній дозі для раковозмінених тканин показало свічення контраст-агента після його депонування у ПЩЗ (рис. 1). Слід зазначити, що 5-АЛК присутня практично в кожній клітині організму людини чи тварини. Вона утворюється з гліцерину та сукциніл конзиму А і є першою проміжною зв'язковою сполукою в біосинтезі гемоглобіну. Екзогенне засвоєння препарату 5-АЛК призводить до збільшення норми ліміту ензиму ферохелатази, який відповідає за останню ланку біосинтезу гемоглобіну. Фоточутлива молекула протопорфірин IX в подальшому акумулюється [9] і може виявляється при активації частотою хвилі від 380-440 нм, яка утворюється джерелом ксенонового світла. Коли протопорфірин IX ослаблюється з потрійного стану до

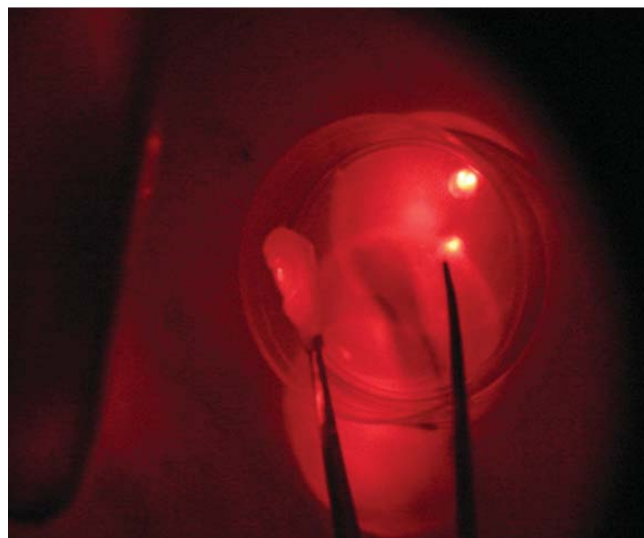


Рис. 1

Флуоресценція видалених прищитоподібних залоз щура після застосування 5-АЛК під мікроскопом в полі голубого світла з використанням світлофільтра

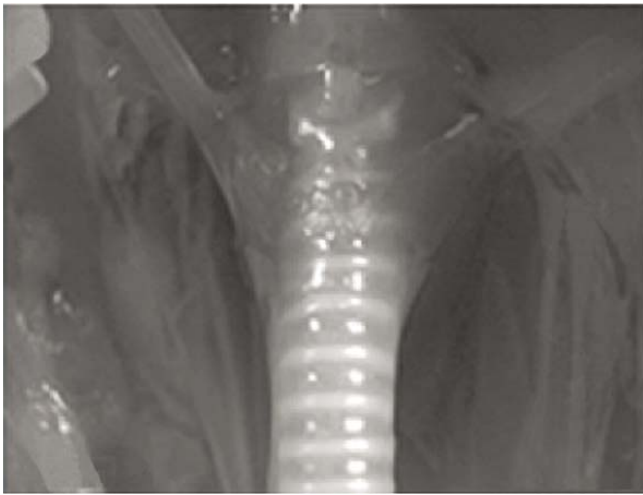


Рис. 2

Прищитоподібні залози щура в полі видимого світла без введення 5-АЛК (відсутня візуалізація залоз)

одиначного, він вивільняє енергію. Оскільки концентрація в мітохондріях (місце біосинтезу гемоглобіну) є вищою в малігнізованих тканинах, ця якість використовувалася для візуалізації пухлин, тому що вони виділяють більше світла ніж оточуючі її тканини [11]. Отримані результати свідчать також про високу метаболітичну активність у тканинах ПЩЗ, що і спричинило її фотодетекцію.

У подальшому результати дослідження 36 тварин засвідчили, що ПЩЗ не візуалізувалися під звичним світлом у жодному випадку (рис. 2). Однак, використання препарату 5-АЛК в дозах 300 мг/кг і більших ПЩЗ експонували достатню флуоресценцію для розрізнення їх на тлі щитоподібної залози (рис. 3). У голубому свіщенні ілюмінація спостерігалася у 22 з 24 випадків (рис. 4). При введення тваринам доз менших за 300 мг/кг флуоресценція ПЩЗ визначалася тільки в 1 із 12 щурів.

Здатність тканин до флуоресценції корелювала з дозою препарату 5-АЛК і тривалістю терміну після її застосування. Отож, через 1 год. у всіх тварин спостерігали свічення лише за умови введення дози 400 мг/кг, а при експозиції 2 год. - 300 мг/кг. Здовження тривалості спостереження до 4 год. не впливало на збільшення випадків флуоресценції. У здійснених дослідженнях в жодної із тварин при дозі 100 мг/кг до 4 год. не проводили фотодетекцію залоз і лише в одній особини дало позитивний результат при дозі 200 мг/кг через 2 год. після введення препарату. Отже, перитональна ін'єкція препарату 5-АЛК щурам за



Рис. 3

Інтраопераційна візуалізація та ідентифікація прищитоподібних залоз у щура в полі голубого світла після введенням 5-АЛК

2 год. до хірургічного втручання у мінімально-ефективній дозі 300-400 мг/кг була оптимальною для інтраопераційної ідентифікації та візуалізації інтактних ПЩЗ через 2-4 год.

У післяопераційному періоді у тварин проводили ревізію рани. Повне загоєння рани відзначали через 7-9 діб. Відсутність клінічної різниці між тваринами, яким були підсажені ПЩЗ щура-донора, і тваринами, яким проводили розтин шкіри без операційного втручання на ПЩЗ, свідчить, що трансплантати добре прижилися. Не відзначали ускладнень і у віддалений термін спостереження.

## Висновок

1. Застосування препарату 5-АЛК в оптимальних дозах та експозиції дає можливість ідентифікувати та візуалізувати ПЩЗ, яка не спосте-

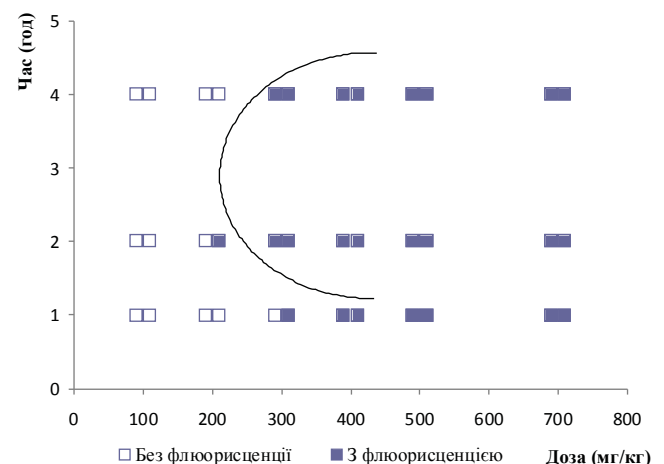


Рис. 4

Визначення оптимальної дози і часу для прищитоподібної флуоресценції

рігається у звичному світлі через надто малі розміри, що є важливим в експериментальній медицині для моделювання патологічних процесів.

2. Вивчення механізмів дії лікарських засобів та малоінвазійний підхід до паратиреоїдектомії сприятиме одужанню хворих на первинний гіперпаратиреоз.

## Література

1. Лабораторные животные. Разведения, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк.- К.: Вища школа, 1983.- 383 с.
2. Павловський М.П. Первинний гіперпаратиреоз: діагностика, лікування, віддалені результати операційного лікування хворих / М.П. Павловський, Н.І. Бойко, В.В. Хом'як // *Acta medica Leopoliensia*.- 2004.- Т. 10, № 2а.- С. 11-12.
3. Пат. 42620, МПК А61В 17/00. Спосіб трансплантації параситоподібних залоз / В.Б. Добродній, В.В. Коптюх, А.В. Добродній і співавт.- № 200902014; заяв. 06.03.2009; опубл. 10.07.2009 // Бюл. № 13.
4. Пат. 64394 А, МПК А61В 17/3209. Спосіб інтраопераційної візуалізації та ідентифікації параситоподібних залоз та нервових структур шиї / В.О. Паламарчук, С.М. Черенько, О.С. Ларін.- № 2003054748; заяв. 26.05.2003; опубл. 16.02.2004 // Бюл. № 2.
5. A comparative study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis / C.S. Betz, H. Stepp, P. Janda et al. // *Int. J. Cancer*.- 2002.- Vol. 97.- P. 245-252.
6. Can localization studies be used to direct focused parathyroid operations? / C. Arici, W.K. Cheah, P.H. Ituarte et al // *Surgery*.- 2001.- Vol. 129.- P. 720-729.
7. Efficacy of selective unilateral exploration in hyperparathyroidism based on localization tests / J.Jr. Ryan, B. Eisenberg, K.M. Pado, F. Lee // *Arch. Surg*.- 1997.- Vol. 132.- P. 886-891.
8. In-vivo kinetics of inhaled 5-aminolevulinic acid-induced photoporphyrin IX fluorescence in bronchial tissue / H. Hautmann, J.P. Pichler, H. Stepp et al. // *Respir. Res*.- 2007.- Vol. 8.- P. 33.
9. Kennedy J.C. Endogenous photoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy / J.C. Kennedy, R.H. Pottier // *J. Photochem. Photobiol. B*.- 1992.- Vol. 14.- P. 275-292.
10. Lang K. Aminolevulinic acid (Levulan) in photodynamic therapy of actinic keratoses / K. Lang, K.W. Schulte, T. Ruzicka, C. Fritsch // *Skin. Therapy Lett*.- 2001.- Vol. 6.- P. 1-5.
11. Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal, and colorectal tumours using 5-aminolevulinic acid induced photoporphyrin IX-a pilot study / J. Regula, A.J. MacRobert, A. Gorchein et al. // *Gut*.- 1995.- Vol. 36.- P. 67-75.
12. Prosst R.L. Kinetics of intraoperative diagnosis of parathyroid glands / R.L. Prosst, L. Schroeter, J. Gahlen / *Eur. J. Endocrinol*.- 2004.- Vol. 150.- P. 743-747.
13. Taillefer R. Detection and localization of parathyroid adenomas in patients with hyperparathyroidism using a single radionuclide imaging procedure with technetium-99m-sestamibi (double-phase study) / R. Taillefer, Y. Boucher, C. Potvin, R. Lambert // *J. Nucl. Med*.- 1992.- Vol. 33.- P. 1801-1807.
14. Terris D.J. Clinical implementation of endoscopic thyroidectomy in selected patients / D.J. Terris, E. Chin / *Laryngoscope*.- 2006.- Vol. 116.- P. 1745-1748.