

Московский Государственный Университет им М.В. Ломоносова
Факультет Биоинженерии и Биоинформатики

**Исследование механизмов клеточного действия
новой композиции для фотодинамической терапии
злокачественных новообразований**

Работу выполнил: Галимов Евгений Рафаэлевич
студент 4-го курса факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ

Научные руководители: к.б.н. Неверов К.Н.
к.б.н. Прусов А.Н.
к.б.н. Киреев И.И.

Москва, 2006.

Оглавление

1. Введение	3
2. Литературный обзор	4
2.1. Фотодинамическая терапия	4
2.1.1. Молекулярные механизмы фотодинамического действия	5
2.1.2. Принципы отбора фотосенсибилизаторов для ФДТ	8
2.1.3. Клиническое использование ФДТ	12
2.1.4. Фотодинамическая терапия опухолей с участием НРД и других фотосенсибилизаторов	12
2.1.5. Возможные формы клеточной смерти при ФДТ: апоптоз и некроз	14
2.1.6. Проблемы ФДТ и пути их преодоления	14
2.2. Перфторан®	16
2.2.1. Перфторорганические соединения и состав перфторана	16
2.2.2. Безопасность перфторана	17
2.2.3. Газотранспортная способность перфторана	17
2.2.4. Свойства и клиническое применение перфторана	19
3. Материалы и методы	21
3.1. Культивирование клеток	21
3.2. Эксперименты по облучению	21
3.3. Фиксация клеток и окраска DAPI	22
3.4. Гипотонические условия	22
3.5. Окраска трипановым синим и родамином 123	22
3.6. Методика окраски трипановым синим:	22
3.7. Микроскопические исследования	23
3.8. Электрофорез ДНК.	23
3.9. Состав препарата «ПФП»	23
4. Результаты и обсуждения	24
4.1. Проверка цитотоксичности перфторана	24
4.2. Оценка влияния препарата «ПФП» на клетки HeLa	25

4.3. Изучение реакции клеточных мембран на воздействие препарата	28
4.4. Оценка повреждения ДНК клеток HeLa после обработки «ПФП»	31
5. Заключение	33
6. Выводы	34
Список литературы	35

1. Введение

В настоящее время весьма эффективным и в то же время сравнительно безопасным методом лечения поверхностных и неглубоко залегающих злокачественных новообразований является фотодинамическая терапия (ФДТ). Фотодинамическая терапия основана на цитотоксическом действии синглетного молекулярного кислорода и других активных форм кислорода, производимых при поглощении красного света фотоактивными веществами - фотосенсибилизаторами. Важнейшей особенностью фотосенсибилизаторов является селективное накопление в опухолях и низкая темновая токсичность, что обеспечивает безопасность ФДТ. Несмотря на эти свои достоинства, ФДТ имеет и недостатки. В то время как большинство из них определяются несовершенством применяемого фотосенсибилизатора, недостаток кислорода (гипоксия), существенно снижающий эффективность ФДТ, связан с особенностью физиологии опухолей. Проблему гипоксии в опухоли можно решить, доставляя кислород в опухоль с помощью искусственных кровезаменителей. Применение искусственного кровезаменителя на основе перфторуглеродных эмульсий с нашей точки зрения является наиболее перспективным для борьбы с гипоксией в опухолевых тканях и повышения эффективности ФДТ.

Для изучения эффективности совместного применения фотосенсибилизатора и перфторуглеродного кровезаменителя (коммерчески препарат "Перфторан") при ФДТ необходимо получить детальное представление о механизмах цитотоксического и цитостатического действия такой композиции. В первую очередь представляет интерес исследовать особенности ее воздействия на модельную клеточную культуру. Это позволит определить главные внутриклеточные мишени, поражаемые при ФДТ с представленным сочетанием компонентов и разработать подходы для изучения ее противоопухолевой активности.

Данная работа посвящена изучению воздействия новой композиции для применения в ФДТ, содержащей перфторан и бактериопорфирин в качестве фотосенсибилизатора, на физиологию модельной клеточной культуры (клеток аденокарциномы человека HeLa).

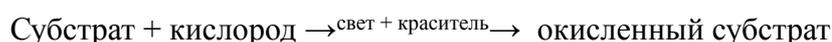
2. Литературный обзор

2.1. Фотодинамическая терапия

Фотохимиотерапия различных болезней, в том числе злокачественных новообразований, основана на фотодинамическом действии пигментов-фотосенсибилизаторов. Фотодинамическая терапия (ФДТ) применяется во многих отраслях медицины:

- в косметологии для лечения угревых сыпей, микробного воспаления сальных желез и т.д.
- в дерматологии - для лечения псориаза (так называемая PUVA, psoralen-UV-A-терапия)
- в онкологии для лечения поверхностных и неглубоко залегающих злокачественных новообразований.

Термин “фотодинамическое действие” используется для того, чтобы различать фотохимические реакции в биологии от физико-химических процессов, происходящих, например, в эмульсиях фотопленок. Этот термин был введен Таппайнером в 1900 году и обозначал явление потери подвижности и гибели клеток парамеции, окрашенных эозином при освещении. Затем выяснилось, что для фотодинамического действия необходим кислород. Это позволило предположить, что в основе фотоповреждения клеток лежит процесс фотосенсибилизированного (т.е. зависящего от света) окисления биосубстратов кислородом:



В настоящее время установлено, что фотосенсибилизированному окислению кислородом в модельных системах с разной скоростью подвергаются аминокислоты, белки, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, липиды, жирные кислоты, токоферолы, каротиноиды, хлорофиллы, порфирины, а также многие другие органические соединения. В живых организмах эти реакции определяют фотоингибирование фотосинтеза и фотодеструкцию фотосинтетического аппарата зеленых растений, участвуют в фотоповреждении сетчатки и хрусталика глаза, влияют на фототаксис микроорганизмов. Кроме того, они являются причиной фототоксичности различных лекарственных препаратов и порфиринов при их избыточном накоплении в клетках растений и животных, а также, что наиболее важно для нашей работы, определяют фотодинамическую терапию раковых опухолей [Красновский мл., 1999].

Открытие и изучение веществ, обладающих фотодинамическим действием на раковые клетки, началось с работ Липсона и Шварца в 1960 г., которые обнаружили, что при инъекции неочищенных препаратов гематопорфирина во время хирургической операции можно увидеть флюоресценцию опухолей. Затем Шварцем была подобрана смесь производных порфиринов ("hematoporphyrin derivatives", или HPD), которая селективно локализовалась в опухолях [Dougherty et al., 1998]. Позднее, в 1975 году, было описано полное уничтожение привитой опухоли при действии HPD и красного света, в то время как окружающая ее кожа осталась без чрезмерных повреждений [Dalla Via et al., 2001]. Таким образом, были найдены вещества, селективно накапливающиеся в опухолях и обладающие фотодинамическим действием. Этими веществами оказались порфирины, выполняющие множество различных функций в живых организмах, включая участие в фотосинтезе растений (хлорофилл), переносе кислорода (гемоглобин) и окислительно-восстановительных реакциях (цитохромы). Значительная эффективность и низкая токсичность порфиринов, как природных веществ, а также их инертность при взаимодействии с другими антираковыми препаратами сделали фотодинамическую терапию перспективной для дальнейшего изучения и применения.

2.1.1. Молекулярные механизмы фотодинамического действия

Выше было указано, что в основе фотоповреждения клеток лежит процесс фотосенсибилизированного окисления биосубстратов кислородом, который можно описать в виде следующей реакции:



При дальнейшем исследовании механизмов этой реакции по характеру первичного фотопроцесса было выделено два ее типа: тип I и тип II [Фут, 1979].

К типу I были отнесены реакции, на первичной стадии которых образующаяся молекула сенсибилизатора непосредственно взаимодействует с молекулой субстрата:



Молекула сенсибилизатора **P** в синглетном состоянии под действием света переходит в возбужденную синглетную $\mathbf{^1P^*}$, а затем триплетную форму $\mathbf{^3P^*}$ (Рис. 1.). Последняя реагирует с субстратом – донором электронов, давая два радикала (1). Восстановленная форма сенсибилизатора окисляется кислородом воздуха в исходную структуру (2). Радикал субстрата $\mathbf{\cdot D^+}$ может либо окислять другие субстраты, либо присоединять кислород, образуя перекисные радикалы (3).

К типу II были отнесены реакции, на первичной стадии которых триплетно-возбужденная молекула сенсибилизатора взаимодействует с молекулярным кислородом, давая активный синглетный кислород $\mathbf{^1O_2}$ (4). Последний обладает значительно большей подвижностью по сравнению с формой $\mathbf{\cdot P^-}$ (тип I) и более активно окисляет внутриклеточные субстраты (5). Предполагается, что механизм по второго типа преобладает при ФДТ:



где P , $^1P^*$, $^3P^*$ - молекулы фотосенсибилизатора в основном и возбужденных триплетном и синглетном состояниях, D – субстрат окисления, 1O_2 – молекула кислорода в синглетном состоянии [Красновский мл., 1999 г.].

Молекула сенсибилизатора P (рис. 1) при поглощении кванта света определенной длины волны переходит из основного синглетного состояния S_0 в возбужденное синглетное состояние S_1 и затем, с определенной вероятностью, в результате потери части энергии - в долгоживущее триплетное состояние T_1 . На стадии триплетного состояния сенсибилизатор может участвовать в фотохимических реакциях типа I. При достаточном времени жизни триплетного состояния и его энергии, превышающей 94 кДж/моль, в присутствии молекулярного кислорода возможно образование синглетного кислорода 1O_2 , согласно переходу 6.

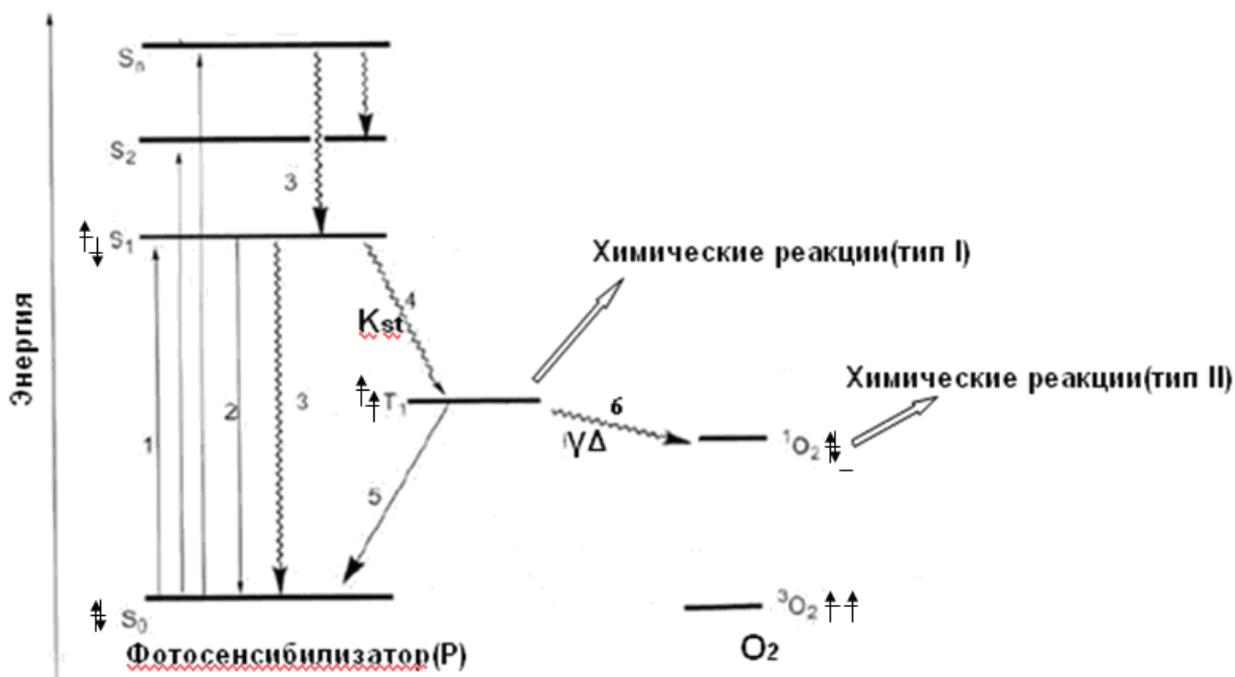


Рис 1. Общая схема электронных переходов возбужденных фотосенсибилизаторов и образования синглетного кислорода.

1 – поглощение; 2 – флуоресценция; 3 – внутренняя конверсия; 4 – интеркомбинационная конверсия; 5 – фосфоресценция; 6 – переход триплетного кислорода 3O_2 в синглетный кислород 1O_2 . K_{st} – константа синглет-триплетного перехода, $\gamma\Delta$ – квантовый выход генерации синглетного кислорода [с изменениями из Pushpan et al., 2002].

Молекулярный кислород является одним из немногих соединений, для которых триплетное состояние является основным. Образующаяся в ходе реакции фотовозбуждения молекула кислорода в синглетном состоянии является чрезвычайно активной. Синглетный кислород окисляет в первую очередь аминокислоты: триптофан, гистидин, метионин (константа тушения $\sim 5 \cdot 10^7$), белки ($k_q \sim 10^8$), аскорбат ($k_q \sim 10^7$) и значительно хуже липиды, сахара и нуклеотиды (константа тушения для большинства из них $\sim 10^4 - 10^5$). Константа тушения состоит из физической (k_{phys}) и химической (k_{chem}) составляющих: $k_q = k_{phys} + k_{chem}$. Каротиноиды, токоферолы и порфирины тушат 1O_2 в основном по физическому механизму: $k_{chem}/k_{phys} \ll 1$. Аминокислоты, белки, аскорбат и т.п. окисляются при тушении 1O_2 , т.е. $k_{chem}/k_{phys} \gg 1$. Это определяет протекание деструктивных процессов в биологических системах во время фотодинамического действия. Время жизни 1O_2 (τ_Δ) в водных растворах и, особенно в биологических системах очень короткое и главным образом определяется концентрацией перечисленных аминокислот и белков в среде. Для цитоплазмы клеток τ_Δ - около 200 нс. Из-за короткого времени жизни в живых клетках длина пробега молекулы 1O_2 меньше или сопоставима с толщиной мембраны, т.е. разрушительное действие 1O_2 проявляется практически только в месте его генерации [Красновский мл., 1999].

Общая схема окислительных реакций 1O_2 с биологическими субстратами выглядит так:

- 1) Образование органических перекисей;
- 2) Распад перекисей с образованием RO-радикалов;
- 3) Цепные окислительные радикальные реакции.

На рис. 2 показаны реакции окисления некоторых биологически активных соединений синглетным кислородом.

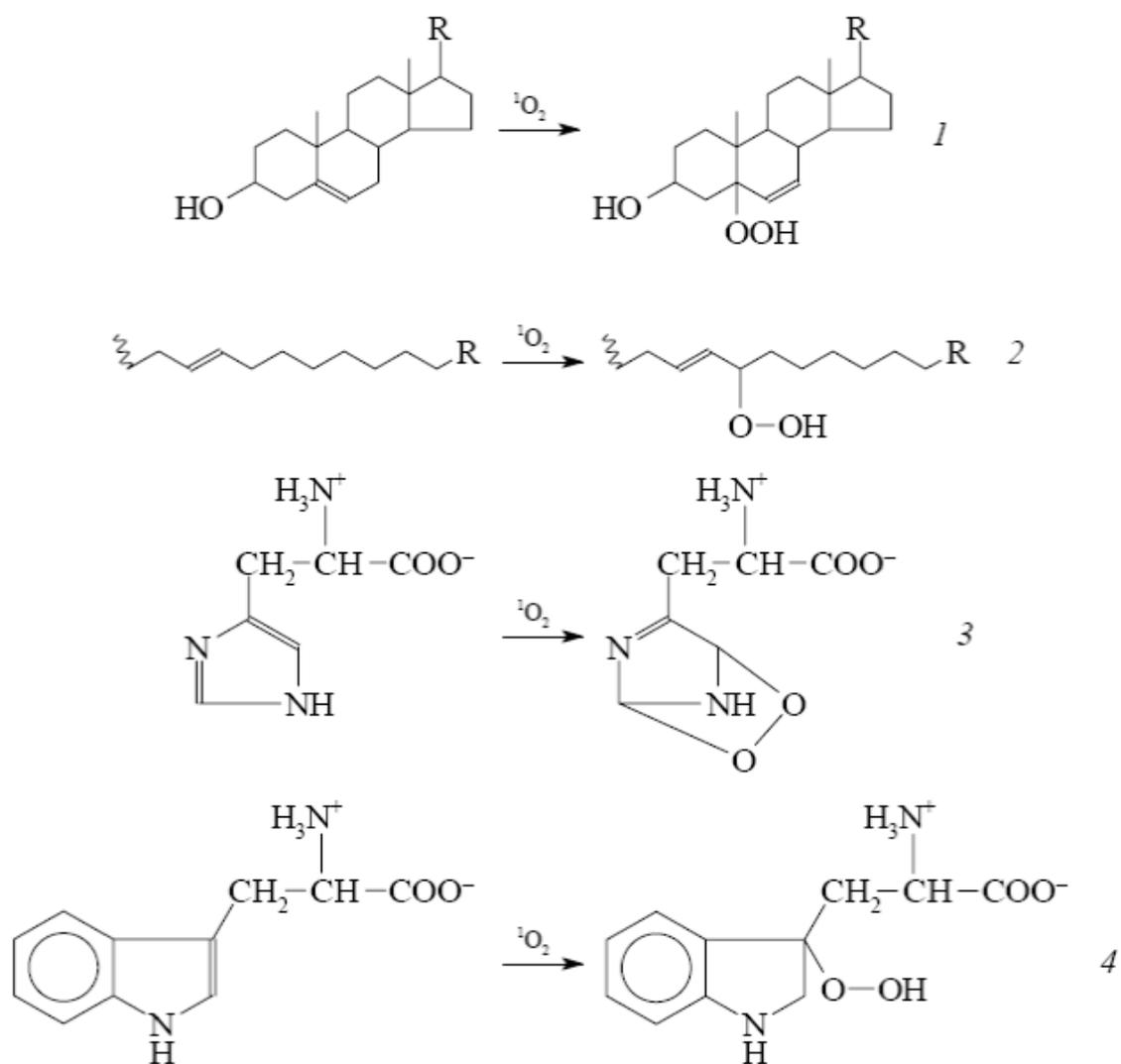


Рис. 2. Некоторые реакции 1O_2 с биомолекулами: окисление холестерина (1), липидов (2), гистидина (3), триптофана (4) [из Миронов, 1996].

2.1.2. Принципы отбора фотосенсибилизаторов для ФДТ

Ранее мы отметили, что первыми веществами, примененными в ФДТ, были порфириновые соединения. В основе всех порфириновых соединений лежит сопряженное макроциклическое кольцо (Рис. 3.), состоящее из четырех пиррольных колец, соединенных между собой метиновыми мостиками. Это макроциклическое кольцо называется порфин, а порфирины можно считать его производными, получаемыми замещением в положениях 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18. В ФДТ важную роль играют также производные порфиринов: хлорины и бактериохлорины. Хлорины имеют два добавочных атома водорода (вместо двойной связи) в положениях 17 и 18, а бактериохлорины - 4 атома водорода в положениях 7, 8, 17 и 18 [Досон и др., 1991].

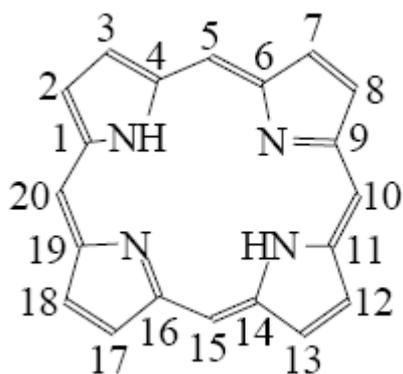


Рис. 3. Структура порфина.

Как уже указывалось выше, Шварцем была подобрана смесь производных порфиринов (“hematoporphyrin derivatives”, или HPD), которая наиболее селективно локализовалась в опухолях. HPD состоял из нескольких различных производных гематопорфирина, находящихся в мономерной, димерной и олигомерной формах. На основе очищенного HPD Догерти создал первый препарат для фотодинамической терапии - Photofrin®. Photofrin® содержал производные порфиринов уже в основном в олигомерной форме(85%) в отличие от HPD(45%) [Dougherty et al., 1998]. В России был создан аналог фотофрина фотогем® - препарат, который также состоял из производных гематопорфирина [Миронов, 1996].

Хотя высокая доля олигомерной фракции была ответственна за локализацию в опухолях, она же приводила к низкому квантовому выходу триплетного состояния сенсibilизатора и низкой эффективности генерации синглетного кислорода. Другими недостатками производных гематопорфирина были сравнительно низкое поглощение света в красной области (коэффициент молярной экстинкции для максимума поглощения при 630 нм: $\epsilon = 3500-4000$), долгий период кожной фоточувствительности (4-6 недель) и относительно небольшая селективность по отношению к опухолям. В клинике для активации Photofrin® и фотогема применялся свет с длиной волны 630 нм, что также ограничивало воздействие на глубоко залегающие опухоли [Pushpan et al., 2002]. Препараты на основе производных гематопорфирина были названы фотосенсibilизаторами первого поколения.

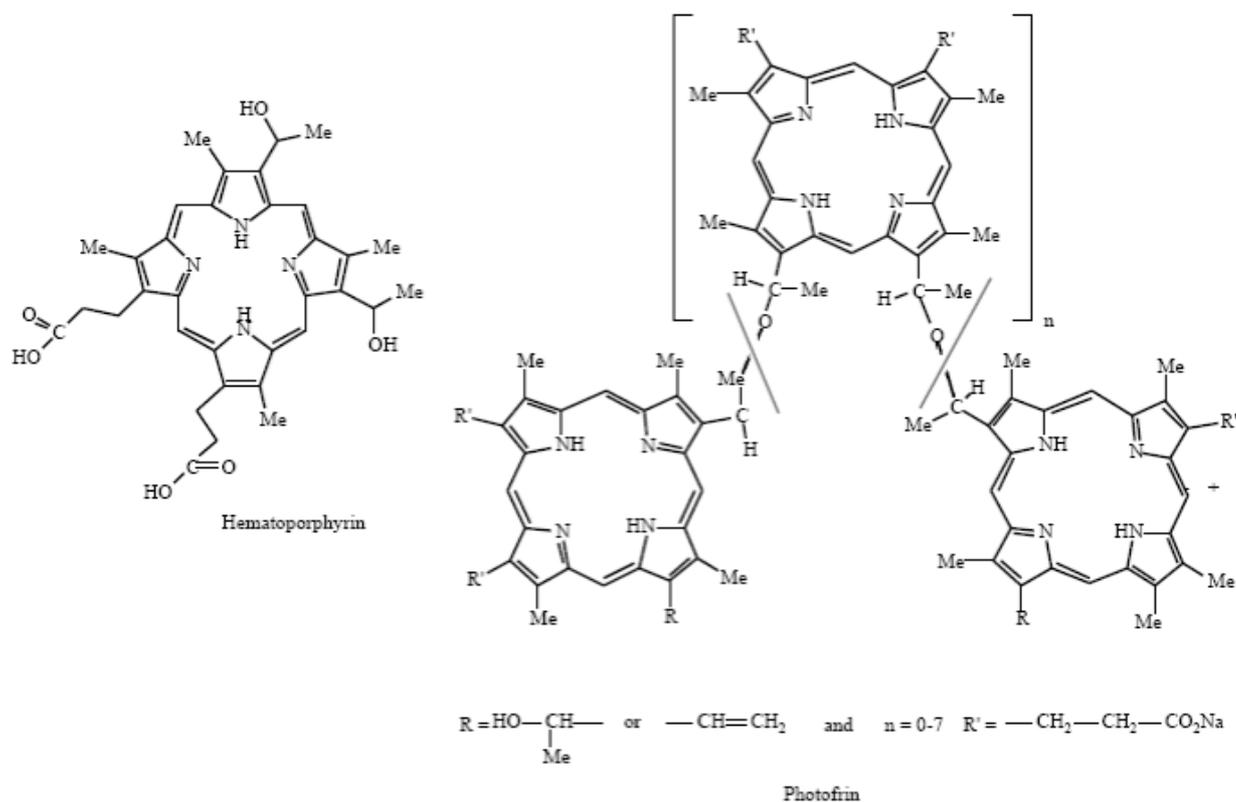


Рис. 4. Структуры гемтопорфирина и его производных, входящих в состав Photofrin® [Pushpan et al., 2002].

С учетом недостатков фотосенсибилизаторов первого поколения, в настоящее время предпринимаются попытки создания более эффективных препаратов. Одним из перспективных групп фотосенсибилизаторов являются производные бактериохлоринов. Эти соединения имеют максимум поглощения при длине волны 740-780 нм! Кроме того, они обладают высокими значениями коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon = 150000-250000$), выходов триплетного состояния фотосенсибилизатора ($\Phi_T = 0.54$) и синглетного кислорода ($\gamma_\Delta = 0.2-0.8$) [Странадко и др., 1998; Странадко и др., 2002].

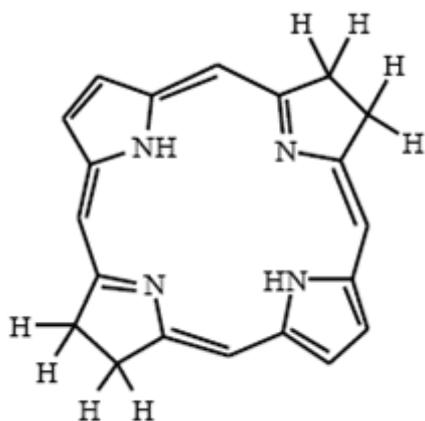


Рис. 5. Структура бактериохлорина.

Еще одним препаратом с улучшенными свойствами является разработанный в России фотосенс®. Фотосенс® относится к фотосенсибилизаторам второго поколения из группы производных фталоцианина и представляет собой смесь ди-, три- и тетразамещенных фракций фталоцианина алюминия [Странадко и др., 1998, Странадко и др., 2002] (Рис. 6.).

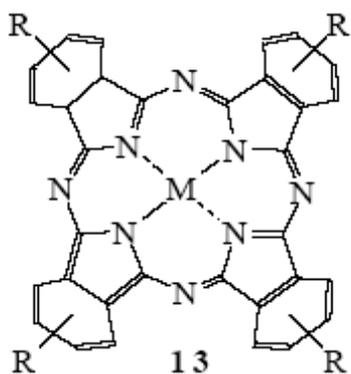


Рис. 6. Структура фталоцианина, М – Al.

По своим характеристикам фотосенс® значительно отличается от фотогема®. Коэффициент экстинкции ($\epsilon = 210000$) в пятьдесят раз превышает таковой у фотогема, а выходы триплетного состояния фотосенсибилизатора и синглетного кислорода препарата фотосенс® больше, чем для фотогема в 2 и 3 раза соответственно. Еще одним важным преимуществом фотосенс® является то, что максимум его поглощения приходится на длину волны 675-680 нм при 630 нм для фотогема. Благодаря меньшему рассеянию длинноволнового света (680 нм) человеческими тканями, фотосенс® можно использовать для воздействия на более массивные опухоли и подводить к ним большее количество энергии. Недостатком фотосенс® является высокая темновая токсичность и большее количество осложнений [Странадко и др., 1998, Странадко и др., 2002].

Таким образом, хотя фотосенсибилизаторы второго поколения и являются более эффективными, они недостаточно хороши для применения в клинике.

Опыт применения первых фотосенсибилизаторов в клинической практике ФДТ опухолей позволил сформулировать требования к “идеальному” фотосенсибилизатору. Их можно перечислить в следующих пунктах:

- 1) высокая селективность к опухолевым клеткам и слабое накопление нормальными тканями;
- 2) низкая темновая токсичность;
- 3) большая скорость выведения из организма;
- 4) устойчивость структуры при хранении и введении в организм;
- 5) хороший выход люминесценции для надежной диагностики опухоли;
- 6) высокие значения константы синглет-триплетного переноса – K_{st} и квантового выхода генерации синглетного кислорода - γ_{Δ} ; (рис. 1.)
- 7) Наличие интенсивного максимума поглощения в области 660 - 900 нм [Allison et al., 2004].

2.1.3. Клиническое использование ФДТ

В настоящее время ФДТ преимущественно используется для лечения различных видов рака кожи и желудочно-кишечного тракта, рака легких, рака крови, опухолей мозга [Schuitmaker et al. 1996]. Эффективность терапии наиболее высока для ранних стадий заболевания, когда еще нет метастазов. Особенно эффективна ФДТ для лечения злокачественных новообразований кожи.

2.1.4. Фотодинамическая терапия опухолей с участием НРД и других фотосенсибилизаторов

Фотодинамическая терапия, как уже было показано, включает в себя три компонента: фотосенсибилизатор, источник света, необходимый для его активации, и кислород. Лечение методом ФДТ проводится в 4 этапа. На первом этапе пациенту вводят внутривенно раствор сенсибилизатора. Второй этап продолжительностью от нескольких часов до трех суток необходим для накопления сенсибилизатора в опухоли. При этом в зависимости от химической природы вещества и типа опухоли устанавливается определенное соотношение концентрации сенсибилизатора в опухоли и окружающей нормальной ткани. Для используемых сегодня препаратов это отношение колеблется от 3 до 10. На этом этапе по флуоресценции сенсибилизатора судят о размерах опухоли и ее расположении. На третьем этапе пораженный участок облучают светом определенной длины волны в течение 15 - 20 минут. В качестве источника света обычно используется лазер и система световодов, которая позволяет доставлять свет к опухолям во внутренние

органы. В участках опухоли, содержащих сенсibilизатор, развиваются окислительные фотохимические превращения, которые приводят к гибели раковых клеток в опухоли. При этом соседние нормальные клетки сохраняются. Четвертый этап продолжительностью от 2 до 4 недель приводит к резорбции злокачественной опухоли и к частичному или полному восстановлению пораженных участков [Миронов, 1996].

Фотодинамическая терапия часто рассматривается как метод лечения с двойной специфичностью. Селективность воздействия на опухоль достигается благодаря повышенному накоплению фотосенсibilизатора в опухоли по сравнению с нормальной тканью и локальному освещению пораженного участка. Хотя точного объяснения способности опухоли удерживать и накапливать фотосенсibilизатор пока нет, существует несколько факторов, определяющих данное свойство. Среди них:

- низкий лимфатический дренаж, или его отсутствие;
- высокая скорость пролиферации, при которой наблюдается высокий уровень экспрессии LDL-рецепторов (захватывают многие лекарства, в том числе гидрофобные фотосенсibilизаторы, которые переносятся по кровотоку липопротеидами низкой плотности (LDL));
- более низкий pH (увеличивает захват клеткой различных веществ с невысокой pK_a);
- повышенная проницаемость сосудов;
- аномальная структура опухолевой стромы, характеризующаяся увеличенным межклеточным пространством и повышенной продукцией коллагена, который связывает порфирины;
- повышенное содержание в опухолях липидных телец и большая гидрофобность мембран по сравнению с нормальными клетками;
- проникновение в опухоли макрофагов, которые являются эффективными ловушками для гидрофобных фотосенсibilизаторов [Nowis et al., 2005].

Низкий лимфатический дренаж и слабое развитие сосудов в опухоли способствуют накоплению лекарства в увеличенном межклеточном пространстве, а присутствие LDL-рецепторов, более низкий pH, повышенная гидрофобность и аномальная структура опухолевой стромы обеспечивают усиление захвата трансформированными клетками фотосенсibilизатора [Lukšienė, 2003]

Методами флуоресцентной микроскопии было показано, что фотосенсибилизаторы первоначально адсорбируются на внешней мембране клетки. В течение нескольких часов, в зависимости от вида фотосенсибилизатора большая или меньшая его часть проходит через мембрану внутрь клетки и затем адсорбируется на мембранах органелл. Тип органелл, в которых локализуется фотосенсибилизатор, также в значительной степени определяется его химической природой. Для некоторых веществ показана высокая селективность по отношению к митохондриям, внешней клеточной мембране или лизосомам. Более гидрофильные фотосенсибилизаторы так же, как и агрегаты фотосенсибилизаторов, часто захватываются клеткой путем пиноцитоза и, таким образом, локализуются в лизосомах. В общем случае правильно говорить о распределении сенсибилизатора в различных мембранах клетки [Dougherty et al., 1998].

Недавно был предложен способ доставки фотосенсибилизатора хлорина e_6 в ядро в составе интернализуемого конъюгата, содержащего сигнал ядерной локализации. Так как ядро намного чувствительнее к воздействию кислородных радикалов, эффективность ФДТ значительно повысилась [Соболев и др., 2004].

2.1.5. Возможные формы клеточной смерти при ФДТ: апоптоз и некроз

На настоящий момент принято выделять апоптоз и некроз как два возможных варианта гибели клеток, в том числе в процессе фотодинамического действия.

Апоптоз – это программируемая клеточная смерть у многоклеточных организмов. В норме этот процесс происходит в эмбриогенезе, в тканях организма как механизм регуляции числа клеток, при позитивной и негативной селекции Т- и В-лимфоцитов и др.

Процесс апоптоза строго регулируется клеткой. Системы, запускающие и предотвращающие апоптоз, находятся в постоянном противодействии и стимулируются соответствующими факторами-индукторами и факторами-ингибиторами апоптоза.

При преобладании индуцирующих апоптоз сигналов запускается каскад активации каспаз – цистеиновых протеиназ, основных белков, выполняющих программу самоубийства клетки.

Морфологически апоптоз выглядит следующим образом:

Хроматин, который в норме представлен открытыми и конденсированными областями (гетеро- и эухроматин), становится сверхконденсированным в форме полумесяца по периферии ядра. Видны разрывы нитей ядерной ДНК. Сама клетка сморщивается, теряя

до 1/3 своего объема за несколько минут. При этом целостность мембран сохраняется. Затем следует специфическая фрагментация ДНК, распад ядра на части, фрагментация клетки на мембранные везикулы с внутриклеточным содержимым (апоптотические тельца), фагоцитируемые макрофагами и соседними клетками.

В отличие от апоптоза, некроз – это непрограммируемая, патологическая форма клеточной смерти. Он характеризуется разрывом цитоплазматической и внутриклеточных мембран, что приводит к разрушению органелл, высвобождению лизосомальных ферментов и выходу цитоплазмы в межклеточное пространство. Некроз могут вызвать физические и химические повреждения: механическая травма, обморожение, ожог, недостаток кислорода, отравление [Самуилов, 2001].

2.1.6. Проблемы ФДТ и пути их преодоления

В фотодинамической терапии существует несколько серьезных проблем, значительно снижающих эффективность ее применения:

- недостаточная селективность фотосенсибилизатора в отношении опухолевых тканей;
- ограничение применения метода преимущественно к поверхностным опухолям вследствие низкой проникающей способности красного света с длиной волны до 650 нм;
- низкое содержание кислорода в опухолях (гипоксия).

В то время как первые две проблемы связаны с разработкой фотосенсибилизаторов с улучшенными качествами – такими, например, как максимальное поглощение в более дальней красной области спектра и повышенная селективность к опухолевым клеткам, гипоксия связана с особенностями физиологии опухолей.

Причинами гипоксии является недостаточное количество кровеносных сосудов, вызванное быстрым ростом опухолей. Более того, недостаток кислорода стимулирует выброс опухолевыми клетками аденозина и молочной кислоты. Аденозин через воздействие на рецепторы макрофагов и лимфоцитов приводит к снижению активности иммунной системы, а молочная кислота вызывает спазм сосудов, ухудшает микроциркуляцию крови и усиливает гипоксию [Sitkovsky et al. 2004].

Гипоксия опухолей значительно снижает эффективность ФДТ, т.к. кислород является необходимым компонентом фотоокислительных реакций.

Проблему недостатка кислорода в настоящее время можно решить одним из трех способов:

- озонирование [Торшина и др., 1998];
- гипербарическая оксигенация [Jirsa et al., 1991];
- транспорт кислорода в опухоль с помощью искусственных газотранспортных систем, к которым относятся кровезаменители.

С нашей точки зрения, применение искусственного кровезаменителя на основе перфторуглеродных эмульсий является наиболее перспективным, так как его можно совмещать с двумя другими методами.

В настоящее время существует перфторан – кровезаменитель на основе перфторуглеродных эмульсий. Этот препарат улучшает микроциркуляцию крови в спазмированных сосудах опухоли и более эффективно, чем эритроциты, транспортирует по ним кислород. Это приводит к снижению гипоксии в опухоли и, как результат, к активации макрофагов и лимфоцитов, следующей за уменьшением выброса аденозина из клеток в кровоток. Кроме того, как всякое чужеродное вещество, введенное в кровь, он активизирует иммунную систему. Важно отметить, что время жизни синглетного кислорода – основной активной формы кислорода при ФДТ - в перфторуглеродах в 10000 раз больше, чем в воде [Красновский, 1994, 1999]. Эти свойства делают перфторан чрезвычайно перспективным для применения вместе с эффективным фотосенсибилизатором.

2.2. Перфторан®

2.2.1. Перфторорганические соединения и состав перфторана

Перфторан® - клинически испытанный и одобренный искусственный кровезаменитель с газотранспортной функцией. Основу перфторана составляют перфторорганические соединения (ПФОС), приставка "перфтор-" указывает на полное замещение атомов водорода на фтор. Главными компонентами перфторана являются два вещества: быстровыводящийся липофильный перфтордекалин ($C_{10}F_{18}$; 7 дней; 40/190) и медленновыводящийся более липофобный перфторпараметил-циклогексил-пиперидин ($C_{12}F_{23}N$; 90 дней; 40/150). В скобках указаны формулы, молекулярный вес в дальтонах, период полувыведения из организма и соотношение растворения O_2 к CO_2 в объемных процентах [Иваницкий, 2001].

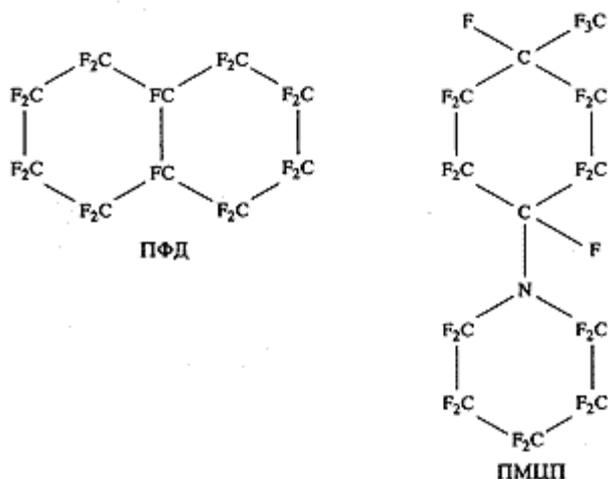


Рис. 7. Химическая структура компонентов, используемых в композиции перфторана: ПФД – перфтордекалин, ПМЦП – перфторпараметил-циклогексил-пиперидин.

ПФОС - соединения приблизительно в два раза более тяжелые, чем вода и в ней практически не растворяются. Для использования их в качестве кровезаменителей необходимо приготовить эмульсию из перфторуглеродов. Для ее изготовления требуются поверхностно-активные вещества, т.к. в противном случае смесь будет плохо эмульгироваться и быстро расслаиваться. В качестве эмульгатора разработчиками было выбрано слаботоксичное поверхностно-активное вещество – проксанол-268, быстро выводящееся из организма. Кроме того, это соединение предотвращает гемолиз эритроцитов, создает незначительное коллоидно-осмотическое давление и является слабым антикоагулянтом. Понижая вязкость крови, оно усиливает эффективность ПФОС-эмульсии как газотранспортного средства [Иваницкий и др., 1997].

2.2.2. Безопасность перфторана

Перфторуглероды являются чрезвычайно химически инертными соединениями. Они разлагаются при температурах около 600-10000⁰С. При обычных температурах не реагируют с концентрированными кислотами, сильными окислителями, металлами и щелочами. С щелочными металлами ПФУ реагируют только при очень сильном нагреве (свыше 200⁰С) или в жидком NH₃ при температуре 20⁰С. Поскольку в организме такие условия отсутствуют, то ПФУ-соединения не метаболизируются. ПФОС не экстрагируют кофакторы из белковых комплексов (гемы, флавины и другие) и не модифицируют гидрофобное ядро белков. Причины их химической инертности заключаются в необычной

прочности ковалентных связей C-F (энергия химической связи 120 ккал/моль) и в особой стереохимии молекул ПФУ. Длины связей F и H с углеродом соизмеримы 1,39Å и 1,09Å, но атом F в 19 раз тяжелее атома водорода. Поэтому молекулы перфторуглеродов такие же компактные как молекулы аналогичных углеводородов, но весьма плотные и тяжелые. Перфторированные соединения как бы покрыты "шубой" из атомов фтора, все связи которых ковалентно замыкаются на атомы углерода, находящиеся внутри [Иваницкий, 2001].

Неблагоприятное биологическое действие перфторуглеродов может проявляться в модификации мембран клеток (например, эритроцитов) и во вспенивании клеточных мембран (в альвеолах легких) при испарении ПФОС с их поверхности. За оба эти эффекта отвечают быстровыводящиеся липофильные вещества. Проблема решается при использовании смеси двух перфторуглеродных соединений: липофильного быстровыводящегося и более липофобного медленновыводящегося. В перфторане это перфтордекалин (ПФД) и перфторпараметил-циклогексил-пиперидин (ПМЦП) соответственно. Первый компонент перфторана ПФД обеспечивает высокую скорость выведения, а второй (ПМЦП) - повышает устойчивость результирующей эмульсии и "гасит" реактивный ПФД, сильно модифицирующий мембраны клеток и приводящий к их вспениванию [Иваницкий, 2000].

ЛД₅₀ перфторана при внутривенной инъекции мышам составляет 140 мл/кг. Для человека с большим запасом безопасности допустимая доза перфторана установлена в 20 мл/кг [Иваницкий, 2001].

2.2.3. Газотранспортная способность перфторана

Чистые ПФОС: ПФД и ПМЦП – способны растворять до 40 об. % кислорода. Так как ПФОС составляют в препарате лишь 20 весовых процентов, кислородная емкость перфторана равна 7 об. % при давлении 760 мм.рт.ст. и 20⁰С. Для сравнения кислородная емкость крови (гематокрит 45%) в тех же условиях составляет 20 об. %, а плазмы крови или воды – 2-2.4 об. %. Несмотря на то, что растворимость кислорода в перфторане почти в 3 раза хуже, чем в крови, препарат компенсирует этот недостаток значительным улучшением динамики газообмена. Это свойство достигается за счет трех эффектов:

- изменение скорости кровотока;
- изменение поверхности газообмена;

- изменение скорости обогащения кислородом крови в легких и скорость его отдачи из крови в тканевую жидкость.

Вязкость перфторана (2.5 сантипуаз) ниже, чем вязкость цельной крови (3-7 сантипуаз), поэтому при кровезамещениях вязкость системы "перфторан+оставшаяся кровь" понижается. Кроме того, снижение вязкости связано с нелинейным эффектом, определяемым модификацией мембран эритроцитов. Перфторуглероды, частично растворяясь в мембранах эритроцитов, делают их более эластичными, что, с одной стороны, противодействует повреждающим эритроциты факторам и увеличивает время их "жизни" (до гемолиза), а с другой - уменьшает вязкость крови. Снижение вязкости крови снижает нагрузку на сердце и, облегчая кровоток, увеличивает его скорость [Иваницкий, 2001].

В 10 мл эмульсии содержится $5,5 \cdot 10^{16}$ частичек, а их суммарная поверхность в 100 мл перфторана равна $\sim 850 \text{ м}^2$. С другой стороны в 100 мл крови содержится $4,5 \cdot 10^{11}$ эритроцитов. Их суммарная поверхность составляет порядка 70 м^2 . Таким образом, в системе "перфторан + оставшаяся после кровопотери кровь" поверхность газообмена не падает, а напротив возрастает [Иваницкий и др., 1997].

Кислорода в гемоглобине эритроцитов, даже при потере $2/3$ эритроцитов, достаточно для функционирования организма. Неполная передача гемоглобином кислорода в ткани связана с экранирующим эффектом окружающей эритроциты воды, плохо растворяющей кислород (2 об. %). По расчетам Иваницкого и др. на каждый эритроцит приходится свыше 105 частичек эмульсии (при соотношении перфторан : цельная кровь – 1 : 5). Таким образом, каждый эритроцит может быть окутан "облаком" из движущихся в кровотоке частичек перфторуглерода в 3-4 слоя. Эритроцит в процессе движения вытесняет находящуюся перед ним воду к стенкам сосуда. Частицы перфторуглерода, увлекаемые водой, также устремляются к стенке сосуда. Из частичек перфторуглерода возникают различные динамические структуры. В том числе появляются и структуры типа "жемчужных нитей", когда частички касаются друг друга и замыкают поверхность эритроцита на стенки сосуда (Рис. 8.). Такие структуры являются кислородными каналами, т.к. по ним проводимость кислорода в 20-25 раз выше, чем по окружающей их воде. Образование из частиц эмульсии кислородных каналов важно не только для передачи в ткань кислорода от оставшихся после кровопотери эритроцитов, но и для насыщения

этих же эритроцитов кислородом в альвеолах легких при переходе гемоглобина в оксигемоглобин [Иваницкий, 2001].

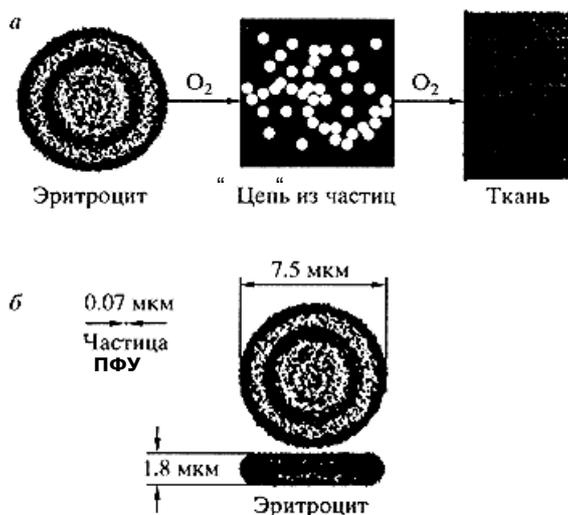


Рис. 8. Механизм кислородного транспорта с участием ПФУ.

а - организация кислородного транспорта из эритроцита в ткань с помощью образования из перфторуглеродных частиц в кровотоке “цепи-канала”; б – сравнительные размеры частицы эмульсии и эритроцита [из Иваницкий, 2001].

Существенным для нашей работы является то, что частички перфторуглерода, размер которых в 100 раз меньше размера эритроцита, могут проникать и в спазмированные микрососуды. При этом улучшается микроциркуляция крови. Особенно важно это в альвеолах легких, т.к. при этом ускоряется обогащение крови кислородом [Иваницкий и др., 1997].

Таким образом, перфторан обеспечивает транспорт кислорода из легких в ткани как за счет собственной кислородной емкости, так и за счет своих реологических параметров: низкой вязкости, малых размеров частиц, большой суммарной поверхности, модификации мембран эритроцитов и способности перфторуглеродных частиц в кровотоке служить кислородными каналами между эритроцитами и стенками сосуда.

2.2.4. Свойства и клиническое применение перфторана

Фармакологические свойства препарата:

- улучшает доставку кислорода из альвеол к эритроцитам и от эритроцитов к тканям;
- улучшает метаболизм и газообмен на уровне тканей;

- восстанавливает центральную гемодинамику;
- способствует улучшению кровотока вплоть до периферической микроциркуляции;
- обладает мембраностабилизирующим эффектом;
- оказывает отчетливое кардиопротекторное действие;
- активирует детоксикационную функцию печени;
- обладает сорбционными и диуретическими свойствами.

В клинике перфторан применяется в качестве противошокового и противоишемического средства. Препарат также показан к применению у кардиологических больных (в острой стадии инфаркта миокарда), при сосудистых и воспалительных заболеваниях головного мозга, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, инфекционных заболеваниях.

Важно отметить, что перфторан применяется в онкологии, как во время оперативного лечения, так и для снижения неблагоприятных последствий лучевой и химиотерапии [цит. по Иваницкий, 2001]. Мы считаем, что для ФДТ перспективно применять систему перфторан + фотосенсибилизатор. В качестве фотосенсибилизатора можно использовать производные бактериохлорина, имеющие максимум поглощения в дальней красной области ($\lambda_{\max} \geq 750$ нм). При применении новой композиции ожидается повышение эффективности ФДТ за счет увеличения концентрации кислорода в опухоли, снижения гипоксии и последующей активации иммунной системы.

Целью работы являлось изучение воздействия новой композиции на физиологию модельной клеточной культуры аденокарциномы человека (клеток HeLa).

При выполнении работы в первую очередь необходимо было определить цитотоксичность перфторана для клеточной культуры HeLa. Следующий шаг состоял в том, чтобы подобрать условия облучения, сходные с теми, что применяются в клинической практике. Для оценки воздействия препарата на жизнедеятельность клеток HeLa определялось число митозов и апоптозов, а затем подсчитывалась их доля среди всех клеток в популяции, т.е. митотический и апоптотический индексы. Так как перфторан и бактериопорфирины – гидрофобные вещества, в первую очередь решено было проверить влияние новой композиции на работу цитоплазматической и митохондриальной мембран. Последний наш эксперимент был посвящен определению степени развития апоптоза с

использованием биохимического метода. Для этого мы оценивали повреждения ДНК клеток HeLa после обработки препаратом и облучения с помощью ДНК-электрофореза.

3. Материалы и методы

3.1. Культивирование клеток.

Исследования были проведены на клетках культуры HeLa (Ассоциация специалистов по клеточным культурам, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в культуральных флаконах или на покровных стеклах на среде DMEM («ПанЭко») содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (High-tech, США), L-глутамин и антибиотик-антимикотик A5955 («Сигма», США). Для экспериментов брали покровные стекла, на которых растущие клетки образовали монослой, при этом конfluence составляла 70-100%.

3.2. Эксперименты по облучению.

Непосредственно перед облучением клетки инкубировались в среде следующего состава:

16-50% перфторан:84-50% DMEM, а клетки для контрольного эксперимента в 100% DMEM в течение часа при температуре 37°C. Облучение проводилось с помощью проекционного аппарата, имеющего оптическую скамью и водный фильтр толщиной 5 см. В качестве источника света использовали лампу накаливания мощностью 300-750 Вт. Напряжение подаваемого тока – 100-220 В, плотность мощности облучения - 70-130 мВт/см². Красный свет отсекали при помощи светофильтров КС-14 или КС-17, $\lambda_{1/2} > 640-660$ нм. Облучение проводилось при температуре 37°C. Общее время облучения варьировало от 30 до 70 минут. Плотность энергии облучения варьировала от 125 до 700 Дж/см².

После облучения в зависимости от задач клетки инкубировали в эксикаторе при 37°C (в атмосфере 5%-го CO₂) в течение 15 часов для развития апоптоза или помещали в гипотонические условия, либо приготавливали для проведения электрофореза ДНК.

3.3. Фиксация клеток и окраска DAPI

Фиксация клеток проводилась с помощью 70%-го этилового спирта в течение 2-х часов при комнатной температуре.

Для окраски клеток красителем DAPI использовался следующий протокол:

- 1) 3 раза промыть клетки PBS в течение 5-ти минут;
- 2) покрасить водным раствором DAPI (0.1 мг/мл);
- 3) промыть PBS в течение 10 минут;
- 4) заключить клетки в мовиол (коммерческий препарат).

Состав PBS:

KCl	200 мг/л
KH ₂ PO ₄	200 мг/л
NaCl	8 г/л
Na ₂ HPO ₄	1.15 г/л

pH = 7.2 – 7.4

Готовые препараты хранили при 4°C в темноте.

3.4. Гипотонические условия

После проведения облучения из чашки Петри выливали среду и наливали 15% раствор Хэнкса для создания гипотонических условий.

3.5. Окраска трипановым синим и родамином 123.

Окраска родамином 123 проводилась по следующей методике:

- 1) покрасить клетки 0.4 мкМ родамином 123, разведенном на растворе Хэнкса в течение 10 минут;
- 2) однократно промыть PBS;
- 3) отмыть раствором Хэнкса в течение 15 минут.

3.6. Методика окраски трипановым синим:

- 1) красить клетки 0.4 % раствором трипанового синего в течении 10-ти минут;
- 2) промыть PBS – 10 минут.

3.7. Микроскопические исследования

Определение апоптического и митотического индексов, наблюдение за развитием реакции клеток на гипотонию, а также их окрашиванием родамином 123 и трипановым синим производилось с помощью флуоресцентного микроскопа LSM 510 Carl Zeiss с программным обеспечением LSM 510 Carl Zeiss version 3,2.

3.8. Электрофорез ДНК.

Клетки снимали с покровных стекол раствором, содержащим: 1% SDS, 1мМ ЭДТА и 100мМ Tris, pH = 8.0.

Затем добавляли 2 мкл проназы (концентрация 10 мг/мл) и держали при 60°C в течение 1 часа. После этого к раствору добавляли 4 мкл чистого глицерина и бромфенолового синего до достижения интенсивной синей окраски.

Горизонтальный электрофорез ДНК проводили в 1.2% геле в следующем буфере: 25 мМ Tris, 25 мМ борная кислота, 2мМ ЭДТА, 0.1% SDS, pH = 8.0. Напряжение 100 В, сила тока 24 мА. Гель окрашивали бромистым этидием (10мкг/мл) в течение 30 минут.

ДНК детектировали в геле при его облучении УФ светом с длиной волны 302 нм.

В качестве маркеров длин фрагментов ДНК использовали 1 kb ДНК-маркер (СибЭнзим) и ДНК фага λ .

3.9. Состав препарата «ПФП»

Препарат «ПФП» представляет собой стабилизированную перфторуглеродную эмульсию в изотоническом физрастворе (“перфторан”), содержащую $5 \cdot 10^{-8}$ М фотосенсибилизатора бактериопорфиринового ряда. В препарате также содержался этанол

в концентрации до 1%. При этом соотношение молекулы фотосенсибилизатора/мицеллы ПФУ составляло 1:10 - 1:15.

Список используемых сокращений:

ДАПИ/DAPI – 4,6-Diamidin –2-phenylindole dichloride,

PBS – phosphate buffer solution:

4. Результаты и обсуждение

4.1. Проверка цитотоксичности перфторана

Нашей первоочередной задачей было проверить цитотоксичность перфторана для клеток модельной культуры, т.к. использование токсичного вещества затруднило бы контрольные эксперименты. Известно, что в клинике перфторан применяется в соотношении с кровью не более, чем 1 к 5. Для усиления эффекта воздействия клетки HeLa выращивались на среде, содержащей 50% перфторана, в течение 3-х суток, затем клетки фиксировались и окрашивались DAPI. После визуальной оценки состояния клеточной культуры с помощью флуоресцентного микроскопа установлено, что перфторан не оказывает заметного токсического действия на исследуемые клетки. Наоборот, после инкубации с ним митотический индекс возрос с 5 до 6% (см. Табл. 1.). На Рис. 9. представлены микрофотографии клеток, выросших в чистой среде DMEM и наполовину разбавленной перфтораном. Из сравнения микрофотографий можно заключить, что морфология ядра при воздействии перфторана не изменилась и осталась типичной для клеток HeLa. На обеих микрофотографиях можно увидеть ядра клеток, в которых ДНК представлена ярко окрашенным гетерохроматином и менее интенсивно окрашенным эухроматином. Гетерохроматин расположен по периферии ядра вокруг одного или нескольких ядрышек или беспорядочно, в виде глыбок.

Таким образом, культивирование клеток HeLa в присутствии перфторана (до 50%) не влияет на морфологию клеток и состояние ядерной ДНК.

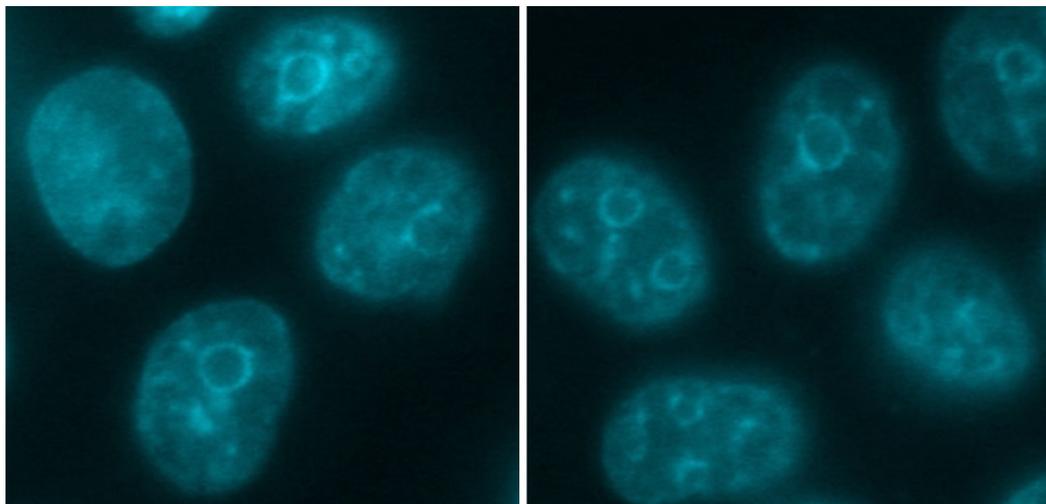


Рис. 9. Окрашенные DAPI клетки HeLa, инкубированные в течение 3-х суток в 100% среде DMEM (слева) и в среде, содержащей 50% DMEM : 50% перфторана (справа). Канал возбуждения флуоресценции – $\lambda = 359$ нм.

4.2. Оценка влияния препарата «ПФП» на клетки HeLa

Препарат «ПФП» представляет собой стабилизированную перфторуглеродную эмульсию в изотоническом физрастворе (“перфторан”), содержащую $5 \cdot 10^{-8}$ М фотосенсибилизатора порфиринового ряда. Квантовый выход синглетного кислорода для мономерного бактериохлорофилла и его аналогов по разным оценкам равен: $\gamma_{\Delta} = 0.2 - 0.8$ [Красновский, 1994]. Известно, что агрегированные молекулы фотосенсибилизаторов значительно теряют способность производить синглетный кислород [Красновский, 1994, 1999, Pushpan et al., 2002]. Для того, чтобы подтвердить мономерное состояние фотосенсибилизатора, были определены спектры поглощения бактериофеофорбида в 100 % этаноле и в составе препарата «ПФП» (рис.10).

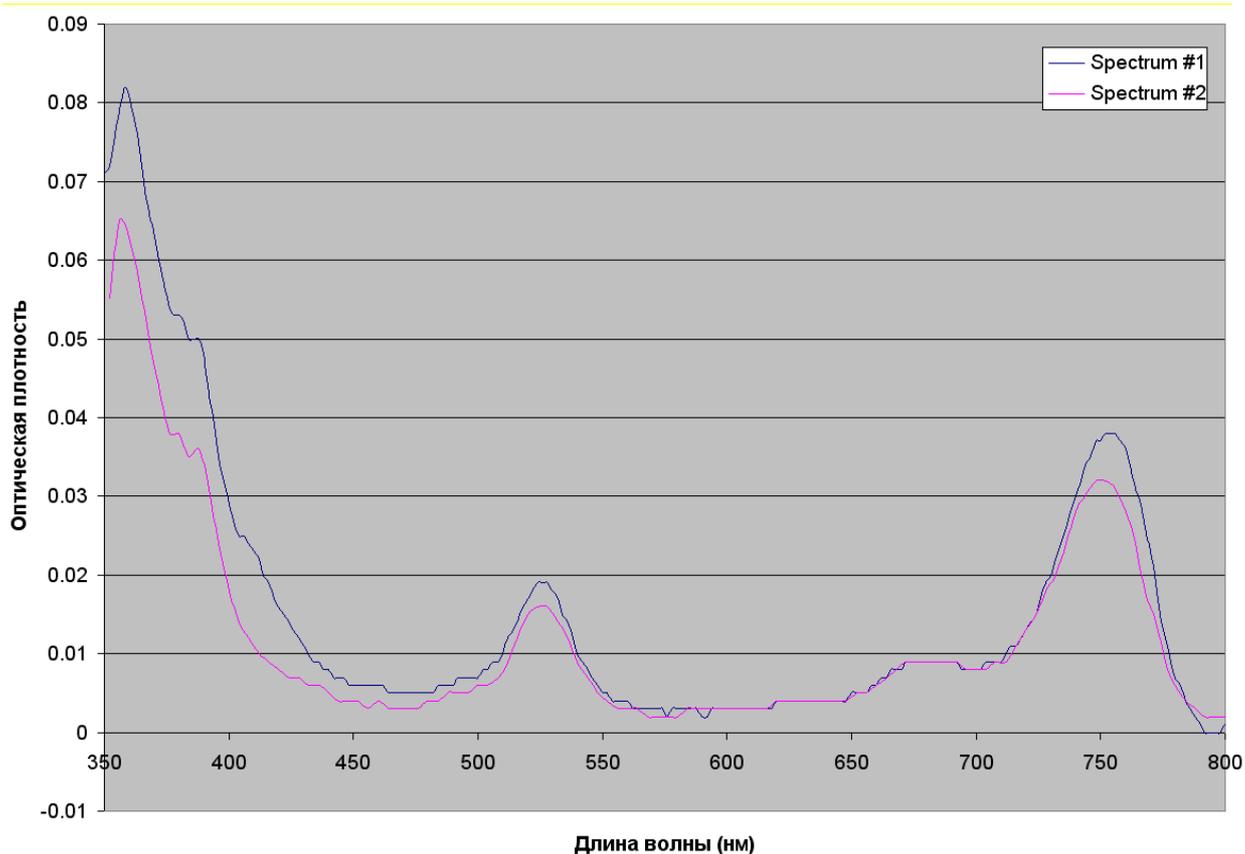


Рис. 10. Спектры поглощения фотосенсибилизатора в 100%-м этаноле (спектр #1) и в препарате «ПФП» с 1% EtOH (спектр #2).

Из представленного графика видно, что спектр поглощения фотосенсибилизатора в препарате «ПФП» и в 100 % этаноле качественно не различаются. Следовательно, бактериопорфирин в составе «ПФП» существует преимущественно в мономерной форме и данная композиция должна быть эффективна для использования в ФДТ.

Опираясь на условия облучения в клинике [Странадко и др., 1998, Странадко и др., 2002], мы установили следующие параметры облучения клеток: напряжение на проекционном аппарате 100-220 В, мощность лампы $W = 300-750$ Вт, световые фильтры КС14 или КС-17 (для облучения светом с длиной волны больше 640-660 нм). При данных параметрах плотность мощности облучения составила 70-130 мВт/(см²). В зависимости от плотности мощности и времени облучения плотность энергии облучения варьировала от 125 до 700 Дж/см², что близко к значениям, применяемым в клинических условиях (150 – 600 Дж/см).

Для оценки эффективности фотодинамической терапии с использованием новой композиции («ПФП»), мы провели эксперименты по облучению клеток HeLa красным светом в присутствии «ПФП», варьируя время облучения.

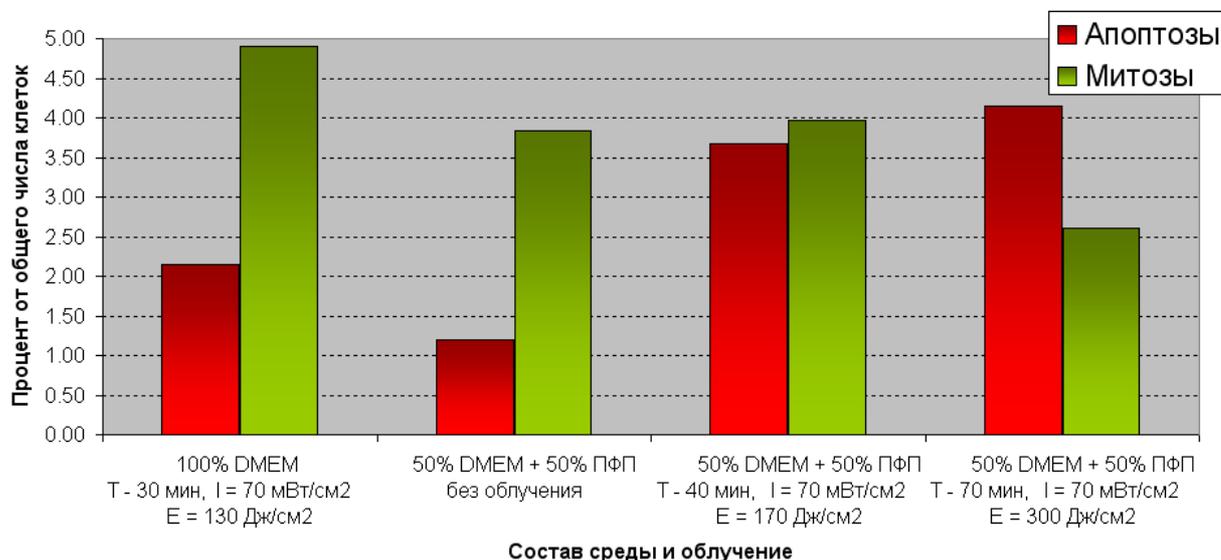


Рис. 11. Эксперимент по облучению клеток HeLa дальним красным светом с использованием препарата «ПФП», мощность источника света $W = 300$ Вт, I – плотность мощности облучения, E – плотность энергии облучения.

В качестве контроля использовались клетки, растущие на среде DMEM (контроль 1). Их облучение не привело к возникновению токсического эффекта.. Апоптотический и митотический индексы в контроле были равны 2.1% и 4.9% соответственно. В качестве еще одного контроля мы использовали среду, содержащую 50% DMEM и 50% «ПФП», при этом клетки не облучались (контроль 2). В других двух чашках, имеющих аналогичный предыдущей состав среды, клетки подвергались облучению в течение 40 и 70 минут. Согласно нашим ожиданиям, число апоптозов возросло (примерно в 4 раза, рис. 11) по сравнению с контролем 2. Интересным фактом является то, что увеличение дозы облучения приводило также к снижению митотического индекса. Возможно, это связано с остановкой клеточного цикла в фазе G₂, вызванной повреждением ДНК [Morrison et al., 2004].

В следующем эксперименте (результаты приведены на Рис. 12) мы увеличили плотность мощности облучения с 70 до 130 мВт/см² и время облучения до 60 и 90 минут. В качестве контроля облучались клетки (плотность энергии 310 Дж/см²), инкубированные в среде

DMEM, содержащей фотосенсибилизатор. Так как в водном растворе фотосенсибилизатор находится в агрегированной форме и, следовательно, не активен, облучение не привело к повреждению клеток [Красновский, 1994, 1999, Pushpan et al., 2002]. Такие высокие дозы привели к тотальному развитию апоптозов (20 и 35% при плотности энергии облучения 470 и 700 Дж/см²) и практически остановили развитие митозов (0.9 и 0.2% при плотности энергии облучения 470 и 700 Дж/см²). Таким образом, увеличение суммарной дозы облучения привело к закономерному усилению эффекта воздействия фотосенсибилизатора (табл.1).

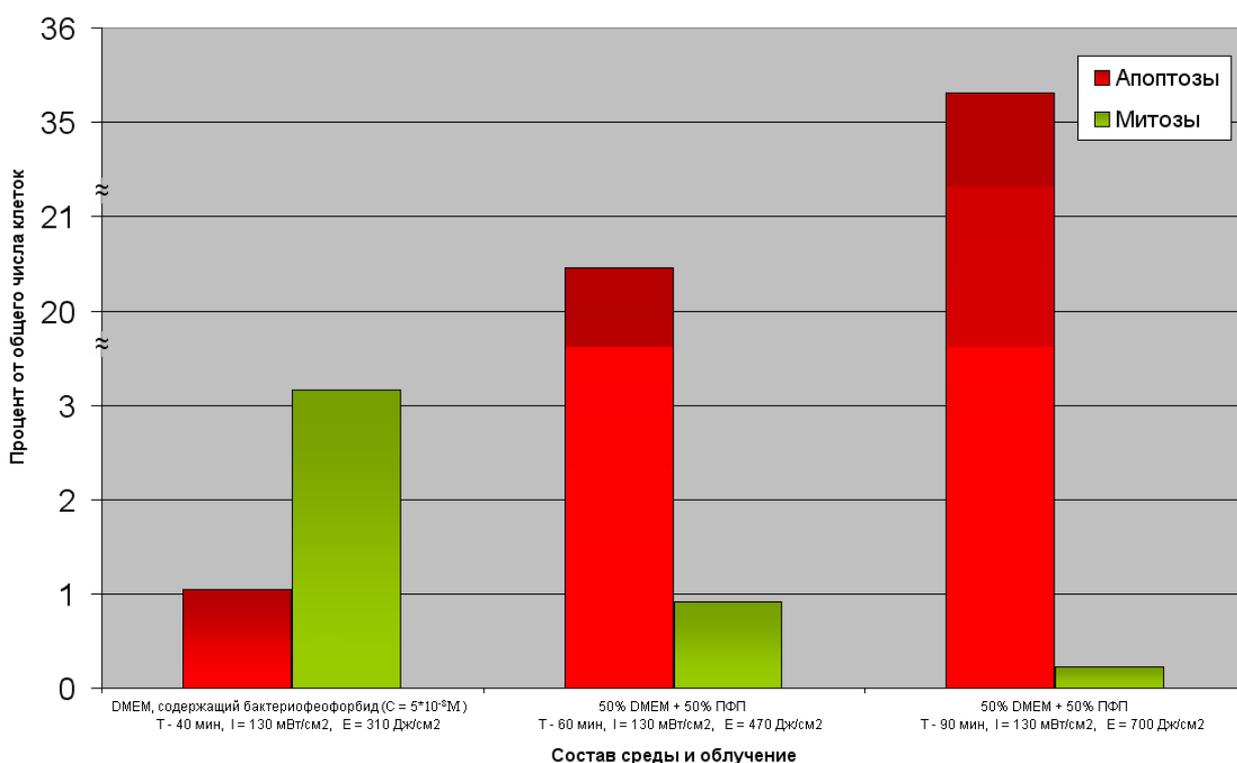


Рис. 12. Эксперимент по облучению клеток HeLa дальним красным светом с использованием препарата «ПФП», мощность источника света $W = 750$ Вт, I – плотность мощности облучения, E – плотность энергии облучения.

В Таблице 1. приведены доверительные интервалы на уровне значимости 0.05 для апоптического и митотического индексов в контрольных экспериментах. Из Табл. 1. видно, что описанные результаты статистически значимы.

	Состав среды	Плотность энергии облучения, Дж/см ²	Апоптозы, %	Митозы, %
Контроль 1	100% DMEM	без облучения	1.9±0.9	5.0±0.1
Контроль 2	50% DMEM + 50% «ПФП»	без облучения	1.7±1.3	4.5±1.4
Опыт 1	50% DMEM + 50% ПФ	без облучения	1	6
Опыт 2	50% DMEM + 50% «ПФП»	170	3.7	4.0
Опыт 3	50% DMEM + 50% «ПФП»	300	4.1	2.6
Опыт 4	50% DMEM + 50% «ПФП»	470	20.5	0.9
Опыт 5	50% DMEM + 50% «ПФП»	700	35.3	0.2

Табл. 1. Влияние препарата “ПФП” и облучения красным светом на количество апоптозов и митозов в культуре клеток линии HeLa.

4.3. Изучение реакции клеточных мембран на воздействие препарата

В литературе пока не существует прямых данных о взаимодействии бактериопорфиринов с клеткой, тем не менее, можно предположить, что на основании того, что бактериопорфирин более гидрофобен, чем другие бактериохлорины и хлорины, он в первую очередь будет локализоваться в липидной фазе, мигрируя из раствора. Поэтому следует ожидать, что первичной мишенью при ФДТ в нашей системе будет являться плазматическая мембрана.

Для проверки этой гипотезы мы решили сначала исследовать реакцию внешней клеточной мембраны клеток, подвергнутых облучению, на гипотонические условия внешней среды. Клетка, у которой не нарушена целостность мембраны, и нормально функционируют мембранные каналы, в гипотонических условиях набухает. В противном случае можно утверждать, что функционирование мембран нарушено.

На рисунке 13 представлен результат контрольного эксперимента, в котором клетки линии HeLa, культивируемые в среде DMEM, были помещены в 15% раствор Хенкса на 3 минуты. Как и следовало ожидать, произошла нормальная реакция клеток, заключающаяся в поглощении воды из среды с меньшей ионной силой. При этом увеличился объем клетки за счет проникновения в нее воды, образовались выпячивания плазматической мембраны, увеличился объем ядра вследствие деконденсации хроматина, ядрышки стали видны менее отчетливо [Дудник и др, 1993].

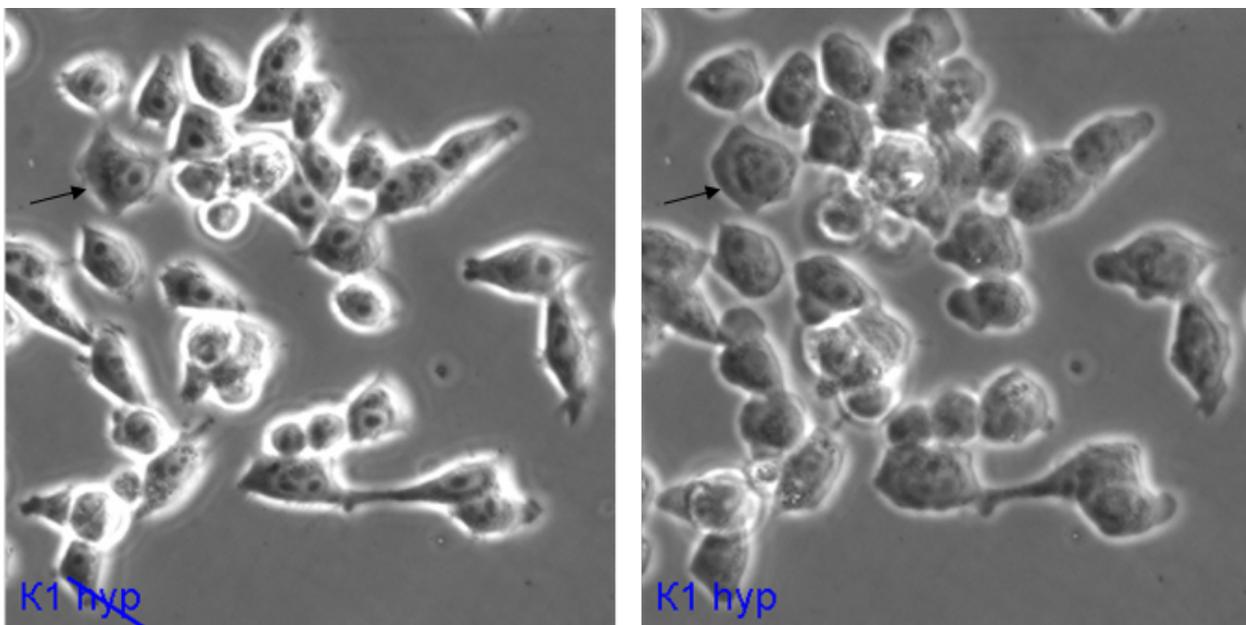


Рис. 13. Необлученные клетки HeLa, культивируемые в среде DMEM без добавления «ПФП», до и через 3 минуты после помещения в гипотонические условия. Фазовый контраст.

На рис. 14 представлены результаты эксперимента по воздействию гипотонических условий на клетки линии HeLa, облученные в течение 40 минут красным светом в среде состава 50% DMEM : 50% «ПФП» (плотность мощности облучения 70 мВт/см^2). Видно, что объем клеток и их ядер практически не изменился, ядрышки видны столь же отчетливо, что и в контроле, выпячиваний мембраны у клеток нет. Таким образом, видимых изменений в морфологии клеток при помещении их в гипотонический раствор не наблюдается. Механизмы такой реакции мембраны еще не были нами тщательно изучены. Возможно, причиной полученного эффекта является повреждение различных мембранных каналов в процессе фотодинамического действия или модификация мембран перфторуглеродами.

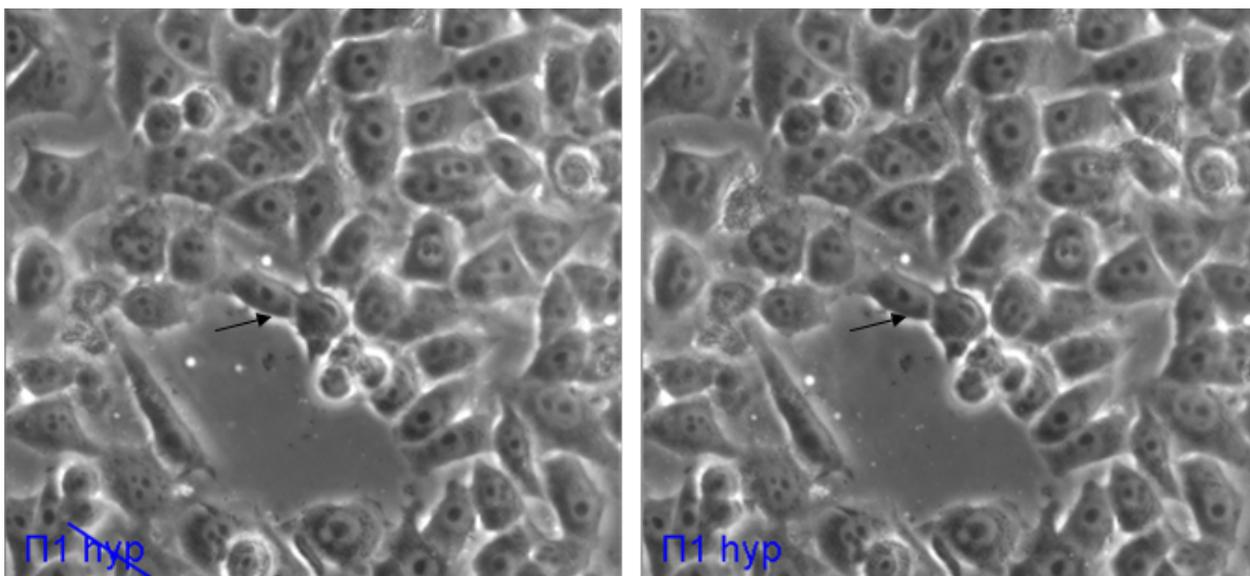


Рис. 14. Облученные в течение 40 минут клетки HeLa, культивируемые в среде, имеющей состав 50% DMEM : 50% «ПФП», до и через 3 минуты после помещения в гипотонические условия. Фазовый контраст.

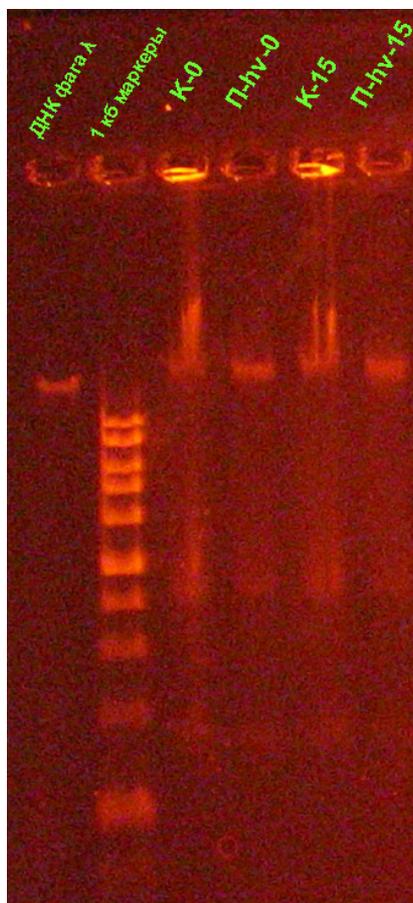
Сначала мы посчитали, что такая реакция клеток обусловлена тем, что «ПФП» некоторым образом “фиксирует” клетки под действием облучения, подобно эффекту, описанному в [Prusov et al., 2003]. Чтобы проверить эту гипотезу, сразу после облучения в среде, содержащей «ПФП», клетки линии HeLa были покрашены трипановым синим и затем родамином 123. После обработки трипановым синим количество окрашенных клеток практически не отличалось числа таковых в контроле. С другой стороны, после покраски родамином 123 большая часть клеток и в эксперименте, и в контроле флуоресцировали при наблюдении за ними с помощью флуоресцентного микроскопа. Таким образом, и первый, и второй тест, с одной стороны убедительно показали, что основная масса клеток остается живой, а с другой стороны свидетельствуют в пользу целостности плазматической мембраны и ее непроницаемости для воды.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что целостность мембран облученных клеток под действием «ПФП» не нарушается. Данное утверждение подтверждается несколькими фактами. Во-первых, при помещении клетки в гипотонические условия не изменился объем ее ядра, что обязательно произошло бы при проникновении внутрь воды. Во-вторых, при окраске клеток родамином 123, митохондрии флуоресцируют, несмотря на воздействие «ПФП». Если бы в цитоплазматической мембране возникали “дырки”, то

«ПФП», вызвавший их появление, проник бы внутрь клетки и “продырявил” митохондрии. Это привело бы к исчезновению $\Delta\psi_H$ и не позволило митохондриям прокраситься родамином. В-третьих, подавляющая часть облученных клеток не окрашивается трипановым синим, что также говорит в пользу целостности мембран.

Таким образом, при облучении клеток в присутствии «ПФП» цитоплазматическая мембрана не теряет своей целостности, но становится непроницаемой для воды, в то время как митохондриальная мембрана остается нетронутой. Наиболее вероятной причиной этого явления скорее всего служит повреждение мембранных каналов (в том числе аквапоринов).

4.4. Оценка повреждения ДНК клеток HeLa после обработки «ПФП».



Одним из признаков апоптоза является расщепление ДНК, которое происходит в несколько стадий. На первой стадии ДНК расщепляется на крупные участки длиной несколько миллионов п.н., на второй – 50000 - 300000 п.н., на третьей стадии она представляет собой отдельные нуклеосомы или полинуклеосомы (200 – 1000 п.н.) [Huang et al., 2005]. Чтобы изучить развитие апоптоза в нашей модельной системе мы решили провести ДНК-электрофорез облученных клеток.

Рис. 15. ДНК-электрофорез лизата клеток линии HeLa; К-0 – клетки инкубируемые в среде DMEM (не облучались), П-hv-0 клетки инкубируемые в среде состава 50% DMEM : 50% «ПФП» и облученные в течение 40 минут, К-15 – клетки, инкубируемые в среде

DMEM в течение 15 часов (не облучались), П-hv-15 клетки инкубируемые в среде состава 50% DMEM : 50% «ПФП» в течение 15 часов после 40-минутного облучения; плотность мощности облучения 70 мВт/см². ДНК фага λ – ~49 т.п.н., 1 кб маркеры – 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 т.п.н..

ДНК из облученных и необлученных клеток выделялась сразу (П-hv-0, К-0) и через 15 часов (П-hv-15, К-15) после облучения. На контрольных дорожках видна высокомолекулярная ДНК и ДНК в областях длиной 60000 – 300000 п.н., 2500 - 3000 п.н. и 1500 п.н..

Из Рис. 15 видно, что наиболее высокомолекулярная фракция ДНК, отсутствует при ДНК-электрофорезе облученных клеток в отличие от контролей. В то же время ДНК облученных клеток мигрирует в геле со скоростью меньшей, чем скорость движения фага λ , т.е. ее длина 60000 – 300000 п.н. Следовательно, картина расщепления ДНК соответствует 2-ой стадии апоптоза.

Причин такого расщепления ДНК может быть две: прямое повреждение ДНК активными формами кислорода или быстрая активация нуклеаз (например, CAD) в процессе апоптоза. В пользу первой гипотезы говорит отсутствие изменений в характере расщепления ДНК облученных клеток, фиксированных сразу и через 15 часов после облучения. С другой стороны, возможно, что в результате быстрого развития апоптоза активация нуклеаз успевает пройти за те 40 минут, которые длится облучение.

Описанный характер расщепления ДНК позволяет объяснить причины уменьшения числа митозов в эксперименте, приведенном выше. Такая начальная деградация ДНК не вызывает немедленного перехода в апоптоз, но запрещает дальнейшее деление клетки. Накопленные повреждения не проходят проверки системами клеточного контроля и перед вступлением в митоз клетки останавливают цикл в G2 фазе, в итоге число митозов в популяции снижается.

5. Заключение

Таким образом, мы выяснили, что перфторан не оказывает токсического действия на исследуемые клетки, а наоборот, увеличивая к ним доступ кислорода, он улучшает состояние клеточной культуры, что выражается в возрастании числа митозов.

При облучении клеток линии HeLa, инкубируемых с «ПФП», число апоптозов возросло примерно в 4 раза, в то время как митотический индекс снизился. Эти данные и данные, полученные в эксперименте с электрофорезом ДНК, позволяют предположить, что под действием препарата практически во всех облученных клетках происходит начальная деградация ДНК. Она является следствием либо прямого повреждения ДНК активными формами кислорода, либо быстрой активации нуклеаз. При этом такая деградация при малых дозах облучения недостаточна для развития программируемой клеточной смерти, что выражается в незначительном увеличении числа апоптозов. Однако снижение митотического индекса свидетельствует, что и делиться клетки с такими повреждениями уже не могут.

Увеличение дозы облучения привело к закономерному тотальному развитию апоптозов и практически остановило развитие митозов.

Мы также исследовали реакцию цитоплазматической мембраны на воздействие «ПФП». Выяснилось, что именно эта часть клетки является главной мишенью действия препарата. После облучения, по-видимому, происходит повреждение мембранных каналов (в том числе аквапоринов), и плазматическая мембрана становится непроницаемой для воды, и, возможно, других веществ. Мы предполагаем, что активация нуклеаз, приводящая к начальной деградации ДНК, запускается при повреждении внешней клеточной мембраны. Важно отметить, что после воздействия «ПФП» митохондриальная мембрана остается неповрежденной.

6. Выводы:

- Перфторан не оказывает токсического действия на клетки линии HeLa.
- Воздействие препарата «ПФП» приводит к развитию апоптозов и достоверному снижению митотического индекса, степень развития данного эффекта определяется дозой облучения.
- После применения «ПФП» и умеренных доз облучения ДНК большинства клеток расщеплена на участки более 50000 п.н., что предполагает дальнейшее развитие апоптоза или остановку клеточного цикла системами клеточного контроля на стадии G2.
- Главным объектом воздействия «ПФП» является плазматическая мембрана, которая после облучения в присутствии препарата становится непроницаемой для воды, в то время как митохондриальная мембрана остается неповрежденной.

Список литературы:

- 1) Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К., Справочник биохимика, Москва, изд-во “Мир”, 1991.
- 2) Дудник О.А., Заценпина О.В., Ченцов Ю.С., Влияние растворов слабой ионной силы на структуру и функцию ядер живых клеток линии ESK. Цитология, 1993;35(5):10-6.
- 3) Иваницкий Г.Р., Воробьев С.И., Кровезаменитель – перфторан. Вестник РАН, 1997;67:998-1013.
- 4) Иваницкий Г.Р., Биофизика на пороге нового тысячелетия: перфторуглеродные среды и газотранспортные кровезаменители. Биофизика, 2001;46(1):5-33.
- 5) Красновский А.А., мл., Синглетный молекулярный кислород: Механизмы образования и пути дезактивации в фотосинтетических системах. Биофизика, 1994;39(2):236-250.
- 6) Красновский А.А., мл., Фотосенсибилизированная фосфоресценция синглетного молекулярного кислорода: методы измерения и применение к анализу

- фотодеструктивных процессов в клетках. Успехи биологической химии, 1999;39:255-288.
- 7) Миронов А.Ф., Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных заболеваний. Соросовский образовательный журнал, 1996;8:32-40.
 - 8) Самуилов В.Д. Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных. Соросовский образовательный журнал, 2001;18–25.
 - 9) Соболев А.С., Розенкранц А.А., Гилязова Д.Г., Подходы к направленной внутриклеточной доставке фотосенсибилизаторов для увеличения их эффективности и придания клеточной специфичности. Биофизика, 2004; 49:351-359.
 - 10) Странадко Е.Ф., Мешков В.М., Рябов М.В., Маркичев Н.А., Использование фотобиологических свойств порфиринов в клинической онкологии. Тезисы II-го Всероссийского съезда фотобиологов, 1998, Пущино, с.402-404.
 - 11) Странадко Е.Ф., Рябов М.В., Волкова Н.Н., Фотодинамическая терапия злокачественных новообразований. Мат. Науч.-практ. Конф. “Актуальные аспекты лазерной медицины, Москва-Калуга”, 2002:363-365.
 - 12) Торшина Н.Л., Харнасс С.С., Волкова А.И., Посыпанова А.М., Повышение эффективности ФДТ с Фотосенсом. Тезисы II-го Всероссийского съезда фотобиологов, 1998, Пущино, с.414-416.
 - 13) Фут Х., Фотосенсибилизированное окисление и синглетный кислород. В кн.: Свободные радикалы в биологии, Москва, изд-во “Мир”, 1979;2:96:150.

- 14) Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Xin-Hua Hu, Childs C.J., Sibata C.H., Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004;1:27—42.
- 15) Dalla Via L., Magno S.M., Photochemotherapy in the Treatment of Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 2001; 8:1405-1418.
- 16) Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q., Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998;90:889–905.
- 17) Huang X., Halicka H.D., Traganos F., Tanaka T., Kurose A., Darzynkiewicz Z., Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif.* 2005 Aug;38(4):223-43.
- 18) Jirsa M., Pouchkova P., Dolezal J., Pospisil O., Hyperbaric oxygen and photodynamic therapy in tumour-bearing nude mice. *European Journal of Cancer*, 1991;27:109.
- 19) Morrison C., Rieder C.L., Chromosome damage and progression into and through mitosis in vertebrates. *DNA Repair (Amst.)*, 2004;3(8-9):1133-9.
- 20) Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Issat T. and Gołąb J., Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta biochimica polonica*, 2005;2:339–352.
- 21) Prusov A.N., Kireev I.I., Polyakov V.Y., Visible light irradiation of ethidium bromide-stained interphase nuclei causes DNA-protein linking and structural stabilization of nucleoprotein complexes. *Photochem Photobiol.* 2003 Dec;78(6):592-8.
- 22) Pushpan S.K., Venkatraman S., Anand V.G., Sankar J., Parmeswaran D., Ganesan S. and Chandrashekar T.K., Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 2002;2:187-207.

- 23) Schuitmaker J.J., Baas P., van Leengoed H.L., van der Meulen F.W., Star W.M., van Zandwijk N., Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J Photochem. Photobiol. B.*, 1996 Jun;34(1):3-12.
- 24) Sitkovsky M.V., Lukashev D., Apasov S., Kojima H., Koshiba M., Caldwell C., Ohta A., Thiel M., Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol.*, 2004;22:657-82.