

mPEG-PCL увеличение количества связанного хлорина в 2-3 раза сопровождается снижением интенсивности флуоресценции на 50-60 %. Исследованные полимерные наноструктуры значительно различаются по скорости выхода связанного ФС. Анализ спектральных и поляризационных характеристик флуоресценции при введении нагруженных мицелл в раствор сыворотки показал, что практически все молекулы Хл e_6 выходят из мицелл mPEG-PLA в течение 10-15 мин и связываются с белками. В случае mPEG-PCL мицелл, скорость выхода молекул ФС крайне низка, даже после 24 ч инкубирования большая часть молекул ФС остается в составе полимерных везикул.

Согласно результатам, полученным с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (микроскоп Leica TCS SPE, Германия), Хл e_6 , введенный в составе mPEG-PCL мицелл, накапливается в клетках Raji в значительно больших количествах в сравнении со свободным Хл e_6 . При этом присутствие белков сыворотки крови практически не влияет на скорость накопления мицеллярной формы ФС.

Проведенные исследования показывают, что применение сополимеров mPEG-PCL и mPEG-PLA позволяет получать высокостабильные мицеллярные структуры, пригодные для создания новых фармакологических форм ФС. Изменение структурных характеристик подобных форм может позволить направленно контролировать фармакокинетику фотосенсибилизаторов при проведении фотодинамической терапии.

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ВВЕДЕНИЯ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

**Зорина Т.Е.¹, Яковец И.В.¹, Янковский И.В.¹, Кравченко И.Е.¹,
Шман Т.В.², Белевцев М.В.²**

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минск, Беларусь*

Эффективность и механизмы фотосенсибилизированного порфиринами повреждения клеток в значительной степени зависят от процессов связывания и внутриклеточной локализации фотосенсибилизаторов (ФС). Ранее было показано, что использование липосомальных форм для введения производных хлорина e_6 (ПХл e_6) существенно влияет на уро-

вень и кинетику накопления их в клетках [1]. В этой связи, представляет интерес анализ механизмов повреждения клеток, фотосенсибилизированных хлоринами и их липосомальными формами.

В данной работе представлены результаты исследования апоптотического и некротического механизмов повреждения клеток при фотооблучении в присутствии производных хлорина e_6 и их липосомальных форм.

В работе использовали культуру клеток Raji. Производные Хл e_6 – ди- и триметилловый эфиры хлорина e_6 (ДМЭ и ТМЭ, соответственно) вводились в суспензию клеток в спиртовом растворе и в составе липидных везикул, приготовленных из димеристоилфосфатидилхолина методом экструзии.

Изменения в клетках, индуцированные фотодинамическим воздействием, анализировали с применением методов проточной цитофлуориметрии. Структурные изменения в клетках при фотосенсибилизации в данной работе оценивали на основании анализа распределения клеток по интенсивности прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. При исследовании динамики апоптоза анализ светорассеяния совмещали с изменениями флуоресценции мембранонепроницаемого флуорохрома йодида пропидия (PI), связывающегося с ДНК.

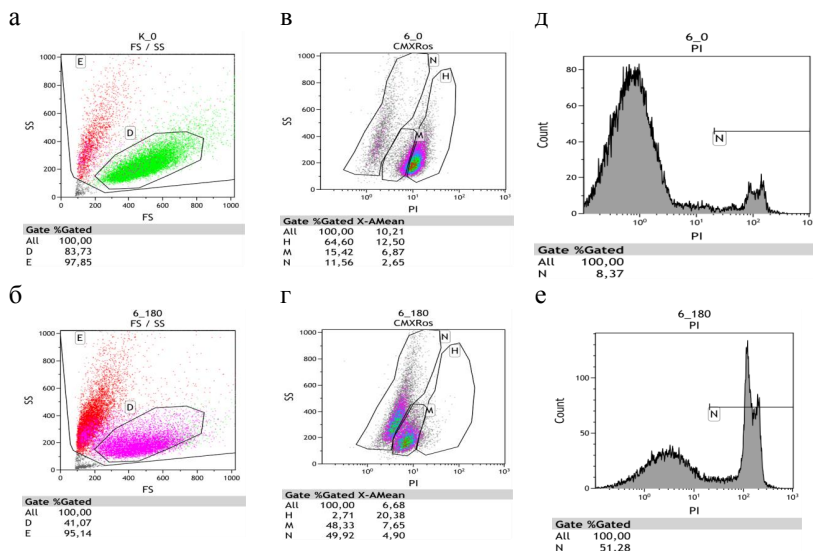
Снижение трансмембранного потенциала митохондрий (СТП) является одним из основных показателей развития апоптоза. Для измерения СТП в данной работе применялся липофильный флуорохром – CMXRos (хлорметил-Х-розамин).

Данные по оценке механизмов повреждения (апоптоз-некроз) клеток Raji при фотосенсибилизации ДМЭ представлены на рисунке 1.

Анализ характеристик светорассеяния позволяет выделить пул интактных клеток контрольного образца, которые характеризуются относительно высокими значениями FSC в сравнении с минорной популяцией поврежденных клеток, отличающейся существенно меньшей интенсивностью FSC (рисунок 1 а). Фотооблучение клеток, сенсибилизированное хлоринами, приводит к значительному изменению светорассеивающих свойств клеток. После воздействия резко возрастает доля клеточной популяции с низкими значениями FSC и более высокими в сравнение с контрольным образцом значениями SSC, что свидетельствует о значительных структурных изменениях в исследуемых клетках (рисунок 1 б).

Сенсибилизированное ПХл e_6 фотовоздействие вызывает значительный рост числа клеток, у которых проявляется изменение трансмембранного потенциала, что свидетельствует о вовлечении этих клеток в процесс апоптоза. Дополнительно по уровню флуоресценции PI идентифи-

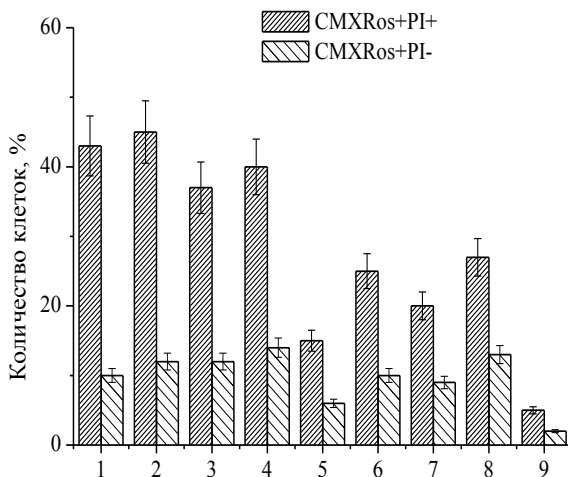
цировали клетки с фрагментированной ДНК (на рисунке 1 д, 1 е). Анализ двухпараметрического (по боковому светорассеянию и флуоресценции CMXRos) распределения клеток позволил дифференцировать неповрежденные и апоптотические клетки. Через 3 ч после облучения в присутствии ДМЭ число апоптотических клеток возросло до 50 % (рисунок 1 в, 1 г, регион М).



а, б – клетки разделены по параметрам прямого и бокового светорассеяния; в, г – диаграммы, отражающие распределение клеток, окрашенных CMXRos по отклику на степень фотосенсибилизированного воздействия: Н – живые клетки, М – апоптотические клетки, N – погибшие клетки; д, е – диаграмма, отражающая рост количества погибших клеток (тест с PI). а, в, д – клетки до облучения; б, г, е – клетки после облучения; время облучения – 20 с; время после облучения – 3 ч. Концентрация ДМЭ – 6×10^{-7} М. Доза светового воздействия – $1,1 \text{ Дж/см}^2$, $\lambda = 660 \text{ нм}$.

Рисунок 1 – Оценка механизмов повреждения (апоптоз-некроз) клеток Raji при фотосенсибилизации ДМЭ

С использованием описанных выше методик проведено сравнение результативности фотоповреждения клеток при их сенсibilизации ДМЭ и ТМЭ, введенными в клеточный образец в спиртовом растворе и в составе липосомальной формы. Согласно полученным данным при одинаковых режимах фотооблучения исследуемые ФС различаются по способности индуцировать апоптотические и некротические изменения в клетках (рисунок 2).



1 – ДМЭ, клетки после облучения; 2 – ДМЭ, время после облучения – 3 ч; 3 – ЛФ ДМЭ, клетки после облучения; 4 – ЛФ ДМЭ, время после облучения – 3 ч; 5 – ТМЭ, клетки после облучения; 6 – ТМЭ, время после облучения – 3 ч; 7 – ЛФ ТМЭ, клетки после облучения; 8 – ЛФ ТМЭ, время после облучения – 3 ч; 9 – контрольные образцы (клетки без ФС).
 Время облучения – 30 с; концентрация ДМЭ – 4×10^{-7} М. Доза светового воздействия – $1,2 \text{ Дж/см}^2$, $\lambda=660 \text{ нм}$. Общее количество клеток в образце принято за 100%. Представлены средние значения и ошибка среднего ($M \pm m$) для 3 независимых экспериментов.

Рисунок 2 – Относительное содержание апоптотических (CMXRos+PI-) и некротических (CMXRos+PI+) клеток при фотосенсibilизации ПХл c_6 и их липосомальными формами

При использовании в качестве ФС ТМЭ результативность повреждения клеток была значительно ниже по сравнению с ДМЭ. Для 30-минутной инкубации относительное количество поврежденных клеток, определяемых в тесте с PI, при использовании ТМЭ в спиртовом растворе было ниже в 3 раза в сравнении с ДМЭ. Выход апоптотических клеток в этом случае был также ниже в 2 раза. Увеличение продолжительности инкубирования клеток в растворе с ТМЭ сопровождалось увеличением эффективности фотоповреждения клеток, при этом число некротически и апоптотически поврежденных клеток было на 40 % и 18 %, соответственно, ниже в сравнении с образцами, содержащими ДМЭ. Введение ТМЭ в составе липосом сопровождалось значительным увеличением результативности фотосенсибилизированного повреждения клеток по сравнению с ТМЭ, введенным в спиртовом растворе. В случае ДМЭ относительный выход апоптотически и некротически поврежденных клеток не зависел от формы его введения в клеточную суспензию, при этом ДМЭ характеризовался существенно большей способностью сенсибилизировать апоптотические и некротические изменения в клетках в сравнении с ТМЭ и хлорином e_6 .

Полученные результаты показывают, что использование липосомальных форм неполярных фотосенсибилизаторов оказывает существенное влияние на клеточные механизмы фотоповреждения. При этом ПХл e_6 в ЛФ проявляют высокую фотодинамическую активность и могут быть успешно применены для решения различных задач ФДТ.

Литература

1. Оценка фото- и цитотоксичности этерифицированных производных хлорина e_6 и их липосомальных форм / Т.Е. Зорина [и др.] // Биофизика. – 2015. – Т. 60, вып. 5. – С. 922-930.