

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Д. А. Афанасенко¹, В. П. Савицкий², В. П. Зорин¹

¹ *Белорусский государственный университет, физический факультет, кафедра биофизики, пр. Независимости, 4, 220030 Минск, Беларусь, black_catd@mail.ru*

² *Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск, Беларусь*

В настоящее время метод фотодинамической терапии (ФДТ), в основе которого лежит комбинированное действие пигмента-фотосенсибилизатора (ФС) и видимого света, используется преимущественно для избирательного повреждения солидных опухолей. Однако в последние годы предпринимаются попытки применения техники ФДТ для лечения онкогематологических и иммунных заболеваний [1,2]. Результативность применения данного терапевтического подхода определяется избирательностью накопления ФС в патологических клетках, поэтому стратегия развития техники ФДТ в онкогематологии связана с поиском ФС, обладающих повышенным сродством к лейкоэмическим клеткам. В этой связи значительный интерес представляет изучение механизмов взаимодействия ФС с нормальными и опухолевыми клетками крови.

Целью нашей работы было исследование процессов распределения хлорина е6 (Хл е6) и его диметилового эфира (ДМЭ) в смешанной суспензии клеток костного мозга пациентов с острым лейкозом. Методом проточной цитометрии были определены уровни накопления хлоринов нормальными и лейкозными клетками, исследованы параметры фотосенсибилизированного повреждения клеток, а также проведена сравнительная оценка возможности избирательного повреждения опухолевых клеток в препаратах костного мозга пациентов с различными видами лейкоза. В работе использовали суспензии клеток, полученные из костного мозга пациентов с острым лимфолейкозом (ОЛЛ) и острым миелолейкозом (ОМЛ).

Для дифференцирования отдельных клеточных фракций использовали стандартные методы проточной цитометрии. Характеристики процессов накопления ФС клетками определяли на основании измерений интенсивности флуоресценции единичных клеток в пороге испускания хлоринов на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, USA). Фенотипирование клеток костного мозга осуществляли путем обработки клеток моноклональными антителами (МКА) CD45, конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом. Контроль за изменением числа жизнеспособных клеток в исследуемых образцах

проводили на основании анализа характеристик светорассеяния и определения степени окраски исследуемых клеток пропидиум йодидом (PI). Фотооблучение образцов клеток проводили диодным лазером ($\lambda=660\text{нм}$, 100мВт/см^2) при комнатной температуре и при постоянном перемешивании.

Было установлено, что интенсивность флуоресценции лейкозных клеток в смешанной суспензии клеток костного мозга пациентов с острым лейкозом значительно выше в сравнении с нормальными клетками как для Хл е6, так и для ДМЭ. Однако уровень внутриклеточного накопления ДМЭ значительно превышает уровень накопления Хл е6. Численные значения уровней накопления ФС клетками представлены в таблице.

Табл. Накопление хлоринов в нормальных и лейкозных клетках крови

Измеряемый параметр	Хл е6 (ОЛЛ)		ДМЭ (ОЛЛ)		Хл е6 (ОМЛ)		ДМЭ (ОМЛ)	
	норма	лейкоз	норма	лейкоз	норма	лейкоз	норма	лейкоз
Интенсивность флуоресценции, отн.ед.	576±25	1380±42	682±30	1662±45	570±23	2650±78	456±20	2860±83

Различия в уровнях накопления ФС клетками, как было показано ранее [3,4], связаны с особенностями физико-химических свойств ФС, обуславливающих их способность проникать в клетки и накапливаться в составе внутриклеточных органелл. Следует отметить, что относительный уровень накопления в составе трансформированных клеток зависит не только от свойств ФС, но и от типа лейкоза. Полученные нами результаты показывают, что контрастность окрашивания миелолейкозных клеток в 2-3 раза выше в сравнении с лимфолейкозными клетками.

Воздействие излучения диодного лазера на образцы окрашенных хлоринами клеток костного мозга пациентов приводит к их повреждению, что было зафиксировано в тесте с PI (рис. 1). Поврежденные клетки характеризуются высоким значением интенсивности флуоресценции PI – увеличивается относительный вес фракции клеток, сильно окрашивающихся зондом. Необходимо отметить, что данный эффект обусловлен именно фотосенсибилизированным воздействием на клетки. Инкубирование клеток с хлоринами без воздействия видимого света, а также фотооблучение клеток без предварительной окраски ФС не приводит к гибели клеток.

Повреждение лейкемических клеток происходит при меньших концентрациях и меньших дозах светового воздействия в сравнении с нормальными клетками. Опухолевые клетки различной природы отличаются по своей чувствительности к фотосенсибилизиро-

ванному воздействию (рис. 2). Для трансформированных клеток при лимфолейкозе реакция на фотовоздействие развивается значительно медленнее в сравнении с лейкемическими клетками при миелолейкозе. Можно полагать, что данные отличия связаны с различным уровнем накопления фотосенсибилизаторов клетками при ОМЛ и ОЛЛ. Использование Хл-е6 и его производного в качестве фотосенсибилизаторов при облучении видимым светом образцов костного мозга обеспечивает избирательное повреждение опухолевых клеток. Согласно полученным результатам, при интенсивностях фотодинамического воздействия, приводящих к повреждению 25-30% нормальных клеток, число жизнеспособных лейкемических клеток в образцах снижается в 2,5-3,0 раза.

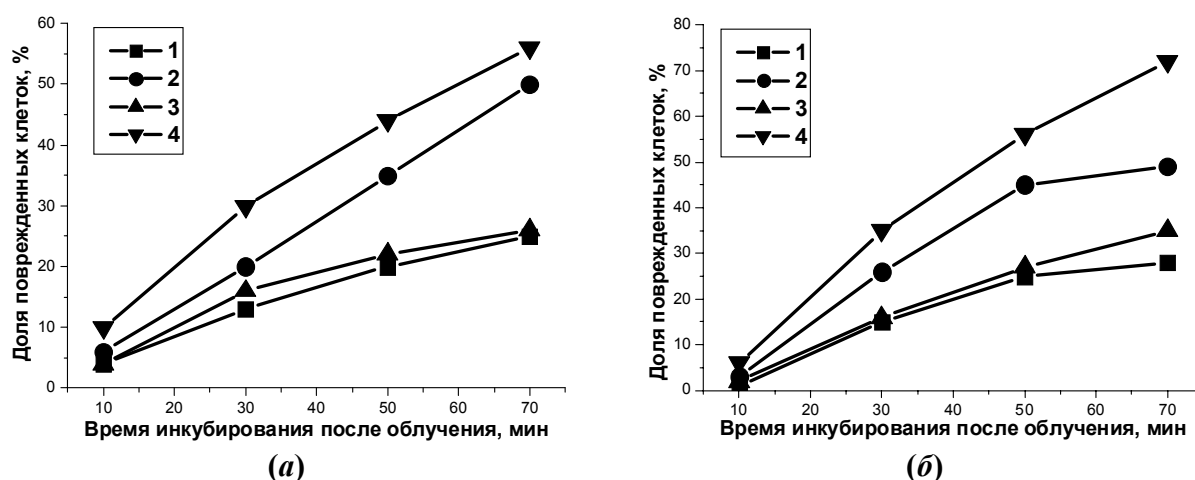


Рис. 1. Фотосенсибилизированное хлоринами повреждение клеток крови: а – ОЛЛ, б – ОМЛ; 1 – Хл е6 норма, 2 – Хл е6 лейкоз, 3 – ДМЭ норма, 4 – ДМЭ лейкоз.

Таким образом, использование Хл е6 и ДМЭ в качестве фотосенсибилизаторов при облучении видимым светом смешанной суспензии клеток костного мозга может обеспечивать избирательное повреждение опухолевых клеток. Полученные результаты подтверждают возможность применения техники ФДТ с Хл е6 и ДМЭ для элиминации малигнизированных клеток в образцах костного мозга пациентов с острыми лейкозами.

Литература

1. Hunt D.W., Chan A.H. Influence of photodynamic therapy on immunological aspects of disease – an update//Expert Opin. Investig. Drugs.-2000.-V.9.-P.807-817.
2. Plaetzer K., Kiesslich T., Verwanger T., Kramer B. The modes of cell death induced by PDT// Med. Lazer Appl.-2003. –V.18.–P.7-19.
3. Zorin V.P., Khludeyev I.I., Zorina T.E., et al. Kinetic characteristics of porphyrin distribution in the blood. In Proceedings SPIE//Laser Use in Oncology II.- 2000.-Vol.-4059.-P.139 - 147.
4. Savitskiy VP, Zorin VP, Potapnev MP. Selective phototoxicity of chlorin-e6 derivatives toward leukemic cells. Experimental oncology 2002.