

A 03.00.14
Г- 939

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄԻԿՐՈԲԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՂՈՒԿԱՍՅԱՆ ՎԱԿԻՄԻՐ ՎԱՐԴԱՆԻ

ԵՐԿՐՈՐԴ ՍԵՐՆԴԻ ՖՈՏՈՍԵՆՍԻԲԻԼԻԶԱՏՈՐՆԵՐԻ ԷՖԵԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ
ՈՒՄՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ IN VITRO ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Գ.00.14. - «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ

Կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

Արույան-2001

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

ГУКАСЯН ВЛАДИМИР ВАРТАНОВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ
ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ IN VITRO

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности
03.00.14 – «Биотехнология»

Абовян - 2001

Առեմախտության բեման հաստատվել է ՀՀ Արդյունաբերության և առևտրի նախարարության «Կենսատեխնոլոգիայի ԳՀԻ» ՓԲԸ-ում:

Գիտական ղեկավար Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
Գ. Վ. Գյուլստանյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ ԳՀ ԳԱԱ քղրակից-անդամ,
քիմիական գիտությունների դոկտոր,
ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների դոկտոր,
պրոֆեսոր Ա.Ա. Շահինյան
Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու
Տ.Կ. Պակյան

Առաջատար կազմակերպություն Երևանի պետական համալսարանի կենսաֆիզիկայի ամբիոն

Պաշտպանությունը կայանալու է «3» շեկտեմբեր 2001 թ. ԳՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի 018 Մասնագիտական խորհրդում, ՀՀ ԳԱԱ նախագահության շենքում (Բնական գիտությունների բաժանմունք), հասցեն՝ 375019, ՀՀ, Երևան, Մարշալ Բաղրամյանի փող. 24:

Առեմախտությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի գրադարանում, հասցեն՝ 378510, ՀՀ, ք. Արմավիր, Արգուն խճուղի, հեռ./ֆաքս (37422) 23240, է-փոստ՝ microbio@pnas.sci.am

Սեղմագիրը առաքված է «1» սեպտեմբեր 2001թ.

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար Կենսաբանական գիտությունների թեկնածու՝
 Ա.Վ. Գասպարյան

Тема диссертации утверждена в АОЗТ «НИИ Биотехнологии» Министерства промышленности и торговли РА.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Г.В. Гюльхандяня

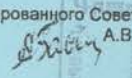
Официальные оппоненты: член-корреспондент Академии наук РА,
доктор химических наук,
доктор физико-математических наук,
профессор А.А. Шаинян
кандидат биологических наук
Т.К. Давтян

Ведущая организация: Кафедра биофизики Ереванского государственного университета.

Защита диссертации состоится «3» септември 2001 г. в 13⁰⁰ часов на заседании Специализированного Совета 018 Института микробиологии НАН РА в здании Президиума НАН РА (Отделение естественных наук), по адресу: 375019, РА, Ереван, пр. Маршала Баграмяна 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института микробиологии НАН РА: 378510, РА, г. Абовян, Арзнинское шоссе, тел/факс: (374 22) 23240, э-почта: microbio@pnas.sci.am

Автореферат разослан «1» септември 2001г.

Ученый секретарь Специализированного Совета, кандидат биологических наук
 А.В. Гаспарян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема получения эффективных фотосенсибилизаторов (ФС) и изучение механизмов их действия при фотодинамической терапии (ФДТ) рака является одной из актуальных для медицинской биотехнологии. Изучением метода лечения опухолей занимаются более 100 исследовательских и клинических центров в различных странах мира. Метод был апробирован в лечении десятков тысяч больных злокачественными новообразованиями различных стадий и локализаций. Доказана высокая терапевтическая эффективность ФДТ: положительный эффект удается получить у 70-90% больных, а показатель пятилетней выживаемости при некоторых локализациях опухоли у больных, прошедших лечение методом ФДТ, достигает 70% (Иванов, 1997).

В настоящее время все большее распространение в методике ФДТ получают так называемые фотосенсибилизаторы второго поколения, обладающие рядом преимуществ по сравнению с гематопорфирином и его производными (фотосенсибилизаторами первого поколения). Так, в России уже начаты клинические испытания фталоцианинов (Странадоко с соавт., 1996), а в Белоруссии заключительную стадию клинических испытаний проходит препарат, созданный группой профессора Г.П. Гуриновича на основе хлорина e_6 (Хл) (Костенич с соавт., 1991). Предметом интереса специалистов является также исследование фотодинамической эффективности производных бактериохлорина ввиду большего смещения их пика поглощения света относительно основной полосы примерно на 100 нм в инфракрасную область, где проницаемость тканей организма для лучей выше.

Исследование эффективности этих и некоторых других фотосенсибилизаторов для оптимизации метода ФДТ является актуальной проблемой.

В процессе фотодинамической терапии фотосенсибилизаторы поглощают свет и переносят энергию электронного возбуждения на молекулы кислорода с образованием синглетного кислорода, а также других

реакционных форм кислорода — супероксидного радикала, пероксида водорода и гидроксильного радикала, которые в совокупности с синглетным кислородом приводят к деструкции клетки. Несмотря на столь важную роль реакционных форм кислорода в процессе ФДТ, систематических исследований роли ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы) в процессе ФДТ до настоящего времени предпринято не было, и ее выявление является актуальным моментом для выявления основ эффективности фотосенсибилизатора.

Ввиду того, что основным путем введения ФС в организм пациента при фотодинамической терапии является внутривенная инъекция и их перенос в организме осуществляется кровью, многочисленными исследователями изучалось действие ФС на эритроциты и тромбоциты (Кочубеев с соавт., 1988; Гуринович с соавт., 1988; Самаль с соавт., 1991). При этом, однако, влияние Хл на эритроциты и роль ферментов-антиоксидантов при этом практически не исследовано. В этой связи в наших исследованиях наряду с модельной культурой клеток QOS лимфобластомы человека эффективность фотосенсибилизаторов второго поколения, в частности Хл, исследовалась также на эритроцитах. Принимая во внимание тот факт, что основным местом накопления хлорина в клетке является мембрана, в качестве показателя функциональной активности клеток была принята проницаемость плазматической мембраны эритроцитов для ионов K^+ .

В качестве показателя эффективности большой интерес представляет также определение пути уничтожения раковых клеток при фотодинамической терапии. Известно, что существуют два вида гибели клеток: апоптоз и некроз, причем апоптоз является более оптимальным для организма, т.к. при некрозе происходит набухание клетки, разрыв цитоплазмы и, как следствие, выброс содержимого клетки в окружающую среду, что приводит к воспалительной реакции (Cohen, 1993). При апоптозе же клетка распадается на ограниченные мембраной тельца, которые поглощаются фагоцитами или окружающими клетками. Многочисленными работами был продемонстрирован апоптотический ответ на действие ФДТ

различными фотосенсибилизаторами (Agarwal et al., 1991; Luo, Kessel, 1997). Тем не менее, исследование эффективности хлорина с точки зрения уничтожения опухолей безвредным для организма апоптозом проведено не было и является актуальным.

Цели исследования. Основной целью настоящей работы являлось исследование эффективности действия современных фотосенсибилизаторов *in vitro*. Основное внимание было уделено выявлению количественных аспектов эффективности фотосенсибилизаторов на культуре клеток QOS лимфобластомы человека и эритроцитов, роли ферментов-антиоксидантов при фотодинамической деструкции клеток, а также выявлению эффективности хлорина e_6 с точки зрения уничтожения опухолей путем апоптоза.

Задачи исследования. Для выполнения этих целей были поставлены следующие основные задачи:

- Исследование сравнительной эффективности фотосенсибилизаторов первого и второго поколения *in vitro*.
- Изучение токсичности перспективных фотосенсибилизаторов второго поколения на культуре клеток QOS лимфобластомы человека.
- Анализ роли ферментов-антиоксидантов (СОД и каталазы) в фоторазрушении клеток.
- Исследование действия фотосенсибилизатора хлорина e_6 на ионные потоки (K^+ - каналы) эритроцитов и выявление роли активных форм кислорода на их гемолиз, а также влияния ферментов-антиоксидантов эритроцитов на действие хлорина.
- Исследование наличия апоптотического ответа при действии фотосенсибилизатора хлорина e_6 .

Основные положения, выносимые на защиту.

- эффективность действия исследуемых фотосенсибилизаторов второго поколения (Хл, бактериохлорофиллин, алюминия фталоцианин) намного выше производных гематопорфирина;
- деструкция клеток при действии исследуемых фотосенсибилизаторов второго поколения обусловлена как

синглетным кислородом, так и радикалами кислорода (супероксидного радикала, пероксида водорода, гидроксильного радикала);

- эффективность действия ферментов-антиоксидантов наиболее выражена при малых дозах фотосенсибилизатора Хл (1-2 мкг/мл), а при больших его концентрациях СОД и смесь СОД+каталаза на действие фотосенсибилизатора не влияют;
- в нарушении функции мембран, индуцируемом фотосенсибилизатором Хл, важную роль играют синглетный кислород и пероксид водорода;
- при облучении Хл индуцирует K^+ -проницаемость эритроцитов человека;
- часть клеток при действии Хл погибают путем апоптоза.

Научная новизна работы. На модельной системе QOS лимфобласты человека впервые определены количественные характеристики эффективности действия (фототоксичности) одного из перспективных фотосенсибилизаторов второго поколения - хлорина e_6 . Показана роль СОД и каталазы в фотодинамической деструкции клеток QOS лимфобласты человека и эритроцитов. Выявлена динамика K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов при действии хлорина и показано, что фермент СОД оказывает незначительный эффект на ее изменение, тогда как каталаза сильно подавляет выход K^+ и уменьшает степень гемолиза эритроцитов.

Выявлено, что хлорин e_6 вызывает определенную степень апоптического ответа при применении его в ФДТ.

Практическая значимость работы. Полученные данные могут быть использованы в медицинской биотехнологии при разработке новых фотосенсибилизаторов с целью применения их в клинике, а также для уточнения эффективной дозы уже применяемого в Белоруссии фотосенсибилизатора хлорин e_6 .

Разработанный новый методологический подход на культуре клеток QOS лимфобласты человека может найти применение в качестве скрининговой системы для определения эффективности новых фотосенсибилизаторов.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертации были представлены на 7^м Международном

конгрессе Фотодинамической ассоциации (7-9 июля 1998г., Нант, Франция), на Международном симпозиуме ОРТО Northeast (10-11 апреля 2001г., Рочестер, США), на 8^м Международном конгрессе по фотодинамической медицине (5-10 июня 2001г., Ванкувер, Канада), на семинарах в Ереванском государственном университете, а также на заседании ученого совета АОЗТ "НИИ Биотехнологии" 8 августа 2001 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Место выполнения. АОЗТ "НИИ Биотехнологии" Министерства промышленности и торговли РА, лаборатория ферментных препаратов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 101 странице и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 189 источников. Работа содержит 12 рисунков и 3 таблицы.

Обзор литературы обобщает современные представления о фотодинамической терапии, фотосенсибилизаторах, ферментах-антиоксидантах и активных формах кислорода, а также о программируемой смерти клетки (апоптозе).

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований. Объектами исследований являлись фотосенсибилизатор первого поколения гематопорфирин и ряд фотосенсибилизаторов второго поколения - хлорин e_6 , бактериохлорофиллин и алюминия фталоцианин. Бактериохлорофиллин был получен по методу (Oster, 1964) в АОЗТ "НИИ Биотехнологии" из бактериохлорофилла а, выделенного из фотосинтезирующих микроорганизмов *Rhodospseudomonas palustris* методом (Jacobs, 1954).

Исследования проводились на культуре клеток человеческой лимфобласты QOS, эритроцитах человека, а также на культуре клеток крысиного эмбриона.

Выращивание культур клеток. Для выращивания культуры клеток QOS использовали среду DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащую все необходимые для роста клеток аминокислоты. В среду добавляли 7.5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (НПО "Виктор", г. Новосибирск). Для пересева клеточные культуры разбавляли 0.25%-ным раствором трипсина. Клетки выращивали в стеклянных флаконах Ру (125 мл) и плашках Фалькона объемом 25 см³ до достижения конfluence состояния.

Культуры клеток лимфобластомы хранились в жидком азоте (-196°C). Для наилучшего выживания клеток использовалось медленное замораживание и быстрое оттаивание клеток.

Концентрацию клеток в среде подсчитывали, окрашивая клетки трипановым синим и подсчитывая окрашенные клетки в гемоцитометре.

Часть экспериментов была выполнена на культуре клеток крысиного эмбриона. Ткани эмбриона крысы механически измельчали, трипсинизировали и высевали в культуральные стеклянные матрацы в концентрации 0.5-0.7x10⁶ клеток/мл среды DMEM (Sigma Co., USA) с 5%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (fetal bovine serum (FBS), Sigma Co., USA). Через двое суток клетки трипсинизировали и пересевали в среде того же состава. Еще через двое суток (культура в логарифмической фазе роста) клетки пересевали в пластиковые культуральные платы (Costar, USA) с кусочком покровного стекла на дне в концентрации 0.1x10⁶ клеток мл/среды. Для пересева клеток использовали стеклянные культуральные матрацы.

Эритроциты выделяли из свежей гепаринизированной крови доноров. Клетки промывали раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 10 мМ трис-HCl (pH 7,4) с повторной последующей промывкой той же средой без буфера.

Инкубация. В экспериментах с культурами клеток QOS фотосенсибилизаторы растворяли в среде DMEM без FBS в концентрации, равной 200 мкг/мл, затем очищали пропусканием через фильтр Millipore® (0.22 микрон) и

добавляли в суспензию клеток в концентрациях от 0.1 мкг/мл до 100 мкг/мл. В зависимости от поставленных задач использовалась различная продолжительность инкубации: от 1 мин. до 3 часов.

Ферменты перед добавлением очищали пропусканием через фильтр Millipore® (0.22 микрон).

При проведении экспериментов на эритроцитах, их инкубацию с Хл проводили двумя способами. При I способе инкубации 1 мл плотно отцентрифугированных клеток суспендировали в 3 мл 0,15 М NaCl и вносили 80 мкг или 4 мкг Хл (в виде водного раствора), затем инкубировали при непрерывном встряхивании 30 мин в темноте при комнатной температуре. После этого суспензию два раза промывали в растворе 0,15 М NaCl. Для опыта 0,1 мл отцентрифугированных клеток вносили в подэлектродную ячейку с 1,9 мл среды инкубации и размещивали на магнитной мешалке.

При II способе инкубации Хл непосредственно добавляли в подэлектродную ячейку, в которой инкубировались 0,1 мл эритроцитов и 1,9 мл среды. В этих опытах количество вносимого Хл варьировало от 8 мкг/0,1 мл до 40 мкг/0,1 мл эритроцитов.

Стандартная среда инкубации содержала 0,15 мМ холинхлорида и 0,1 мМ KCl. В некоторых опытах в среде инкубации присутствовало 4 мМ NaCl или 1 мМ CaCl₂.

В экспериментах на клетках эмбриона крысы в каждую ячейку культуральной платы добавляли Хл в концентрациях от 0.1 мкг/мл до 1.0 мкг/мл и инкубировали 30 мин. в темноте при 37°C. После облучения клетки инкубировали в термостате при 37°C на протяжении 20 часов и затем фиксировали.

Фиксация. В качестве фиксатора применяли смесь этанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Фиксированные клетки высушивали на воздухе.

Окрашивание. Для окраски клеток обычно применяли краситель Гимза (Merk, Германия). Препараты помещали в раствор красителя на 10-30 минут при периодическом контроле степени окраски препаратов под

микроскопом. Окрашенные препараты промывали и высушивали на воздухе.

Измерение скорости выхода K^+ и H^+ . Концентрации K^+ и H^+ в растворе измеряли с помощью K^+ (стекло марки NAS-2704)- и H^+ ("Radiometer", Дания)-селективных электродов, подсоединенных вместе через общий электрод сравнения и выведенных с помощью милливольтметров к самописцам.

Скорость выхода K^+ под действием Хл определяли, градуируя электрод стандартными добавками KCl.

Облучение проводили лампой с вольфрамовой нитью. Использовали стеклянный фильтр с полосой пропускания в интервале 630-800 нм. Интенсивность облучения составляла 30 мВт/см². Сфокусированный луч света попадал на кювету с суспензией или культурой клеток с расстояния в 20-25 см. В зависимости от поставленных задач длительность облучения варьировала от 30 сек. до 30 мин.

Определение степени гемолиза эритроцитов. Степень гемолиза эритроцитов по отношению к полному гемолизу, вызываемому сапонином (100% гемолиза), измеряли спектрофотометрически при 540 нм, используя супернатант быстро отцентрифугированной после определенного времени суспензии эритроцитов. В качестве контроля брали супернатант эритроцитов, инкубируемых 30 мин в отсутствие каких-либо добавок.

Статистическая обработка данных проводилась методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование токсичности и фототоксичности перспективных фотосенсибилизаторов второго поколения на культуре клеток QOS лимфобластомы человека.

В результате экспериментов по исследованию токсичности Хл было выявлено, что при концентрациях 20

и 100 мкг/мл количество выживших клеток в темновом эксперименте составляет 45 и 10% соответственно.

Проведенные аналогичные исследования на культуре клеток лимфобластомы указывают на то, что в случае препарата "Фотосенс" (алюминия фталоцианин) темновая токсичность выявляется уже при 5 мкг/мл; количество выживших клеток при этом составляет 48%.

Дозозависимая фототоксичность Хл составляла 63%, 79% и 90% для концентраций хлорина 1, 2 и 20 мкг/мл соответственно. Последующее увеличение концентрации Хл практически не отражалось на показателях смертности смеси клеток (Рис. 1).

Таким образом, продемонстрировано, что:

а) темновая токсичность для Хл существенно ниже таковой препарата "Фотосенс".

б) наряду с низкой темновой токсичностью Хл обладает высоким уровнем фототоксичности, обуславливающим перспективность использования в ФДТ.

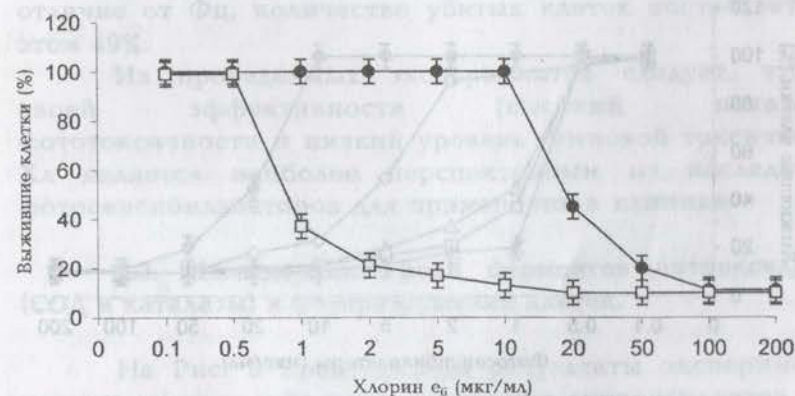


Рис. 1. Эффективность действия хлорина e_6 на клетки QOS лимфобластомы человека в темноте (●) и при воздействии света (□) (630-800 нм, 30 мВт/см²). Результаты приведены в процентном отношении к числу интактных (контрольных) клеток.

Значения по оси абсцисс приведены в логарифмической шкале.

3.2. Исследование сравнительной эффективности фотосенсибилизаторов первого и второго поколения *in vitro*.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что наиболее активным по своей антиопухолевой активности являлся алюминия фталоцианин (Ал-Фц), фототоксичность которого уже при концентрации 1 мкг/мл составила 80% (у хлорина для той же концентрации фототоксичность составила 63%, у бактериохлорофиллина (БХл) 57%). Фототоксичность гематопорфирина (ГП) при этой же концентрации была значительно ниже — порядка 5%. Такой же порядок (Ал-Фц > Хл > БХл > ГП) сохраняется и для больших концентраций вплоть до 20 мкг/мл, при которой фототоксичность у всех фотосенсибилизаторов составляет 90%.

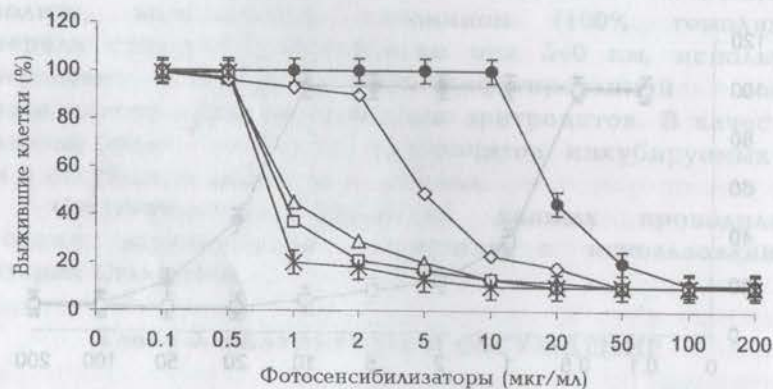


Рис. 2. Сравнительная эффективность действия хлорина e₆ (—□—), бактериохлорофиллина (—△—) гематопорфирина (—◇—), и алюминия фталоцианина (—✱—) на культуру клеток лимфобластомы при освещении (630-800 нм, 30 мВт/см²) и хлорина e₆ (—●—) в темноте. Результаты приведены в процентном отношении к количеству интактных (контрольных клеток).

Значения оси абсцисс приведены в логарифмической шкале.

На Рис. 2 представлены данные по фототоксичности исследованных фотосенсибилизаторов. Очевидно, что группа фотосенсибилизаторов второго поколения значительно эффективнее по сравнению с ГП. Эти результаты также совпадают с данными работы (Orenstein et al., 1996), где показано, что по противоопухолевой активности Хл более эффективен по сравнению с протопорфирином IX и гематопорфирином.

Несмотря на большую антиопухолевую активность Ал-Фц, следует, однако, отметить высокую темновую токсичность этого препарата, результаты исследования которой приведены выше. Эта особенность препарата может негативно сказаться при введении больших (терапевтических) доз на практике.

Помимо этого, следует также отметить и высокую темновую токсичность ГП, также исследованную нами. При отсутствии освещения токсичность ГП для клеток проявляется уже при концентрации 5 мкг/мл. Однако в отличие от Фц, количество убитых клеток составляет при этом 49%.

Из проведенных экспериментов следует, что по своей эффективности (высокий показатель фототоксичности и низкий уровень темновой токсичности) Хл является наиболее перспективным из исследуемых фотосенсибилизаторов для применения в клинике.

3.3. Исследование роли ферментов антиоксидантов (СОД и каталазы) в фоторазрушении клеток.

На Рис. 3 представлены результаты экспериментов по изучению действия ферментов-антиоксидантов при фотодинамической деструкции клеток хлорином e₆. При концентрациях Хл 1, 2 и 20 мкг/мл фототоксичность смеси составляла 51, 69 и 90% соответственно.

В случае смеси Хл(20 мкг/мл)-СОД (10⁻⁵М)-каталаза (10⁻⁵М) фототоксичность смеси еще ниже: 50%, 59% и 80%

для концентраций Хл в смеси 1, 2 и 20 мкг/мл соответственно.

Из рисунка видно, что при больших концентрациях Хл (20 мкг/мл и более) супероксиддисмутаза, а также смесь СОД-каталаза на выживаемость клеток не влияет, т.е. при больших дозах фотосенсибилизатора гибель клеток происходит под действием синглетного кислорода и вклад радикальных форм кислорода незначителен.

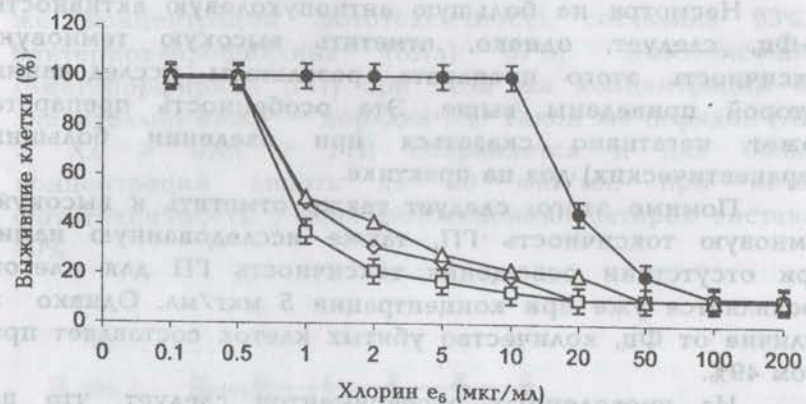


Рис. 3. Сравнительная эффективность хлорина e_6 (—□—), смеси хлорина e_6 и супероксиддисмутазы (10^{-5} М) (—◇—), смеси хлорина e_6 , супероксиддисмутазы (10^{-5} М) и каталазы (10^{-5} М) (—△—) на культуру клеток лимфобластомы QOS при воздействии света (630-800 нм, 30 Вт/см²), а также хлорина e_6 (—●—) в темноте. Результаты приведены в процентном отношении к числу интактных (контрольных) клеток.

Значения оси абсцисс приведены в логарифмической шкале.

В соответствии с реакцией Габера-Вейса взаимодействие супероксидного радикала с пероксидом водорода приводит к возникновению гидроксильного радикала. Из Рис. 3 можно сделать вывод о том, что, по-видимому, именно действию этого радикала можно приписать тот факт, что при малых концентрациях Хл действие только СОД приводит к повышению

выживаемости клеток на 10-12%, а в случае действия смеси СОД-каталаза выживаемость клеток увеличивается на 20-22%, (т.е. происходит ингибирование реакции Габера-Вейса каталазой).

На основе полученных результатов можно предположить, что в случае малых доз фотосенсибилизатора имеющаяся в клетках антиоксидантная система предохраняет клетки от повреждений, к которым приводят генерируемые при ФДТ синглетный кислород и активные формы кислорода. Эксперименты со смесями Хл-СОД и Хл-СОД-каталаза показывают, из всех АФК наибольшую роль при фотодеструкции играет гидроксильный радикал.

3.4. Исследование K^+ -проницаемости мембраны эритроцитов при действии фотосенсибилизаторов.

На Рис. 4 показано действие двух разных количеств Хл (инкубация I способом) на изменение концентрации K^+ и pH суспензии эритроцитов.

Как видно из рисунка, в отсутствие облучения инкубация эритроцитов с 8 мкг Хл /0,1 мл клеток не приводит к сколь-нибудь существенному изменению выхода K^+ и pH в течение наблюдаемого времени (штриховые кривые). Включение облучения уже через 2-3 мин приводит к заметному выходу K^+ , хотя pH среды при этом практически не меняется (сплошные кривые). Однако через несколько минут начинается постепенный вход H^+ внутрь эритроцитов (pH в среде инкубации увеличивается). Выход K^+ на 6-7 мин совпадает с увеличением входа H^+ в клетки. Средняя скорость выхода K^+ из эритроцитов, наблюдаемая в течение 10 мин (до замедления движения K^+) составляла 3,6 ммоль/мин. л клеток. Пик всплеска pH совпадает с сильным уменьшением выхода K^+ . Очевидно после выхода на плато основная часть ионов K^+ уже вышла из клеток (добавление сапонины, разрывающего мембрану эритроцитов, дает лишь небольшой дополнительный выход K^+). В момент выхода динамики ионов K^+ на плато

происходит выход H^+ из эритроцитов (уменьшение pH среды).

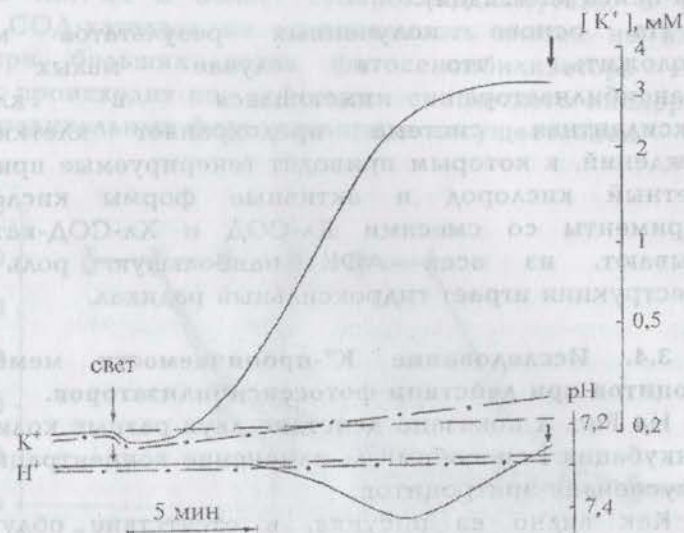


Рис. 4. Фотодинамическое действие хлорина e_6 (Хл) на пассивный выход K^+ и изменение pH суспензии эритроцитов. 0,1 мл клеток, суспендируемых с Хл I способом, вносились в 1,9 мл среды, содержащей 150 мМ холинхлорида и 0,1 мМ KCl. Сплошные линии — 8 мкг Хл/0,1 мл клеток, штриховые линии — 8 мкг Хл/0,1 мл клеток в отсутствие облучения, штрих-пунктирные линии — 0,4 мкг Хл/0,1 мл клеток. Выделенными стрелками здесь и на остальных рисунках показан момент забора проб для определения степени гемолиза.

В случае инкубации I способом эритроцитов с количеством Хл, равным 0,4 мкг/0,1 мл клеток, скорость фотосенсибилизированного выхода K^+ гораздо ниже и изменения pH не наблюдается (Рис. 4, штрих-пунктирные кривые).

Измерение гемолиза клеток, взятых через 5 мин после пика всплеска pH, показали, что процент гемолиза при 8 мкг

Хл/0,1 мл клеток составляет около 4,3% (Табл. 1). При использовании 0,4 мкг Хл/0,1 мл клеток заметного отличия от контроля не наблюдалось. Для сравнения гемолиза пробы забирали через одинаковое время после включения облучения. Отметим, что фотогемолиз эритроцитов начинается тогда, когда скорость выхода K^+ уже заметно уменьшается, а pH достигает максимума (пик всплеска). При этом, чем меньше время от начала включения освещения до пика всплеска pH, тем больше степень гемолиза эритроцитов.

Таблица 1. Влияние различных соединений на фотогемолиз эритроцитов, вызываемый Хл. В скобках указан % гемолиза, вызываемый только Хл.

Контроль	Хл, инкубация I способом	Хл+азид	Хл+каталаза	Хл+NЭМ*
0,5±0,1	4,3±0,2	1,6±0,2 (2,9±0,3)	1,5±0,2 (2,9±0,3)	1,3±0,4 (3,6±0,4)

*Примечание: NЭМ — N-этил-малеимид

Хл индуцирует K^+ -проницаемость и изменение pH суспензии эритроцитов после включения облучения и при непосредственном добавлении его к суспензии эритроцитов (II способ инкубации). В этом случае, включение облучения через 3 мин инкубации приводит к картине, аналогичной показанной на Рис. 5 (сплошные кривые). В этих опытах для получения заметного эффекта мы использовали количества Хл, равные 16-20 мкг/0,1 мл клеток.

На Рис. 5 показано также влияние ловушки синглетного кислорода азида Na на индуцированный Хл выход K^+ из эритроцитов. Как видно из рисунка (штриховые кривые), инкубация с 2 мМ азидом приводит к ингибированию выхода K^+ из клеток, при этом всплеск pH очень слабо выражен. Почти в 2 раза уменьшается и степень гемолиза эритроцитов (Табл. 1).

Аналогично азиду действует и антиоксидантный фермент каталаза (1 мг/мл; Табл. 1).

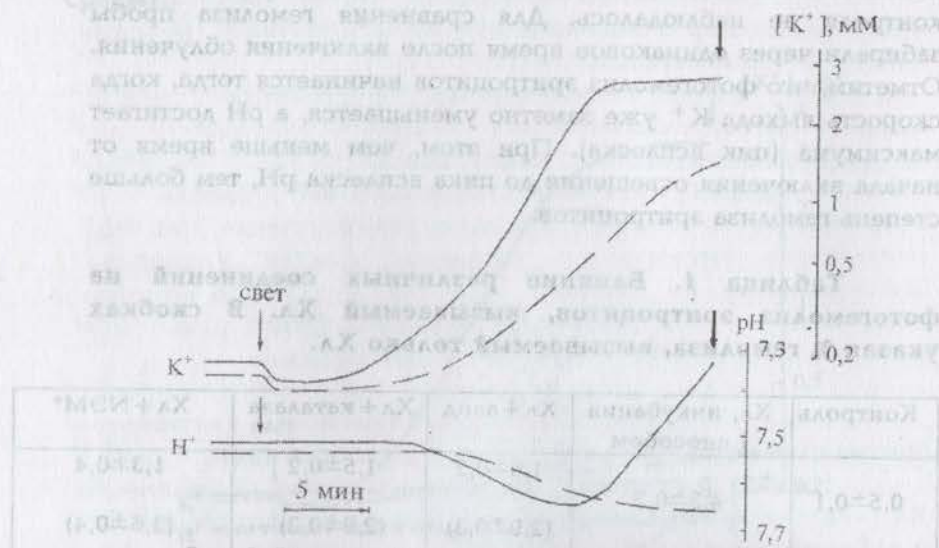


Рис. 5. Влияние азид-иона на фотоиндуцированный Хл выход K^+ и изменение pH суспензии эритроцитов. 0,1 мл клеток вносились в 1,9 мл среды, содержащей 150 мМ холинхлорида, 0,1 мМ KCl и 4 мМ NaCl. Хл добавлялся непосредственно в кювету с суспензией эритроцитов. Сплошные линии — добавлено 16 мкг Хл/0,1 мл клеток, пунктирные линии — до Хл предварительно внесено 4 мМ азид-иона.

Другой антиоксидантный фермент супероксиддисмутаза (СОД, 1 мг/мл) оказывал незначительный эффект (не представлено).

3.5. Исследование эффективности хлорина e_6 при деструкции клеток путем апоптоза.

Обнаружено, что с повышением концентрации Хл в числе подверженных фотодеструкции клеток увеличивается доля мертвых клеток с апоптозными тельцами (от 0,4 клеток при дозе Хл 0,1 мкг/мл до 2,4 клеток при дозе Хл 1,0 мкг/мл). Параллельно происходит уменьшение числа митотических клеток в культуре от максимального

значения при 0,1 мкг/мл Хл до полного их отсутствия при 1,0 мкг/мл Хл. Часть погибших клеток слущивается с субстрата в окружающую жидкую среду — об этом можно судить по уменьшению плотности клеточного слоя (с 103 клеток в поле зрения при дозе Хл 0,1 мкг/мл до 29,2 клетки при 1,0 мкг/мл Хл). Данными экспериментами убедительно показано, что фотодинамическое действие Хл наряду с некротическим уничтожением приводит к апоптозному пути деструкции клеток *in vitro*.

Выводы.

1. Установлено, что эффективность действия фотосенсибилизаторов второго поколения (хлорин e_6 , бактериохлорофиллин и алюминия фталоцианин) намного выше эффективности действия производных гематопорфирина (HPD) *in vitro*.
2. Результаты экспериментов подтверждают гипотезу, что деструкция клеток при действии фотосенсибилизаторов идет под действием двух типов активных форм кислорода: синглетного кислорода и радикалов кислорода (супероксидный радикал, пероксид водорода, гидроксильный радикал и др.).
3. Показано, что фотодинамический эффект хлорина e_6 ингибируется ферментами-антиоксидантами при малых концентрациях фотосенсибилизатора (<20 мкг/мл).
4. При облучении светом (630-800 нм) хлорин e_6 индуцирует K^+ -проницаемость эритроцитов человека (средняя скорость выхода — 3,6 ммоль/мин.л); в этом механизме важную роль играют синглетный кислород и пероксид водорода.
5. Показано, что при действии хлорина e_6 часть клеток погибает путем апоптоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Gyulkhandanyan G.V., Movsisyan V.A., Dabaghyan E.A., Gukassyan V.V.* Study of QOS lymphoblastoma cells culture photodestruction by means of chlorin e6 // 7th biennial congress of International Photodynamic Association, Final program and abstracts. - Nantes, 1998. - P. 119.
2. *Gyulkhandanyan G., Gyulkhandanyan A., Gukassyan V.* Erythrocytes photodynamic damages caused by chlorin e6 // OPTO NorthEast and Imaging 2001., Abstracts book. - Rochester, New York, 2001. - P. 34.
3. *Gyulkhandanyan G.V., Gyulkhandanyan A.V., Ghukasyan V.V.* Chlorin e6-induced photosensitized increase of cells passive K⁺-permeability // International Photodynamic Association 8th World Congress of Photodynamic Medicine. - Vancouver, 2001. - P. 73.
4. *Гюльханганян Г.В., Мовсисян В.А., Дабагян Э.А., Гукасян В.В.* Исследование роли супероксиддисмутазы при фоторазрушении культуры клеток QOS лимфобластомы под действием хлорина е6 // Вестник МАНЭБ. - Ереван, 2001. - N6(42). - С. 101-108.
5. *Гукасян В.В.* Исследование фототоксичности фотосенсибилизаторов первого и второго поколения на культуру клеток и роль ферментов-антиоксидантов при фотодинамическом действии // Вестник МАНЭБ - Ереван, 2001. - N6(42). - С. 108-113.

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Էֆեկտիվ ֆոտոսենսիբիլիզատորների ստացումն և ուռուցքների ֆոտոդինամիկ թերապիայի /ՖԴ/ շրջանակներում դրանց ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրումը հանդիսանում է բժշկական կենսատեխնոլոգիայի կարևորագույն ուղղություններից մեկը: Ֆոտոդինամիկ թերապիայի մեթոդը կիրառվել է տարբեր աստիճանի և ծավալի չարորակ նորագոյացություններով հիվանդների բուժման մեջ: Ներկա ժամանակաշրջանում ՖԴ մեթոդաբանության մեջ առավել տարածում են ստանում այսպես կոչված երկրորդ սերնդի

ֆոտոսենսիբիլիզատորները, որոնք մի շարք հատկություններով գերազանցում են առաջին սերնդի սենսիբիլիզատորներին և գեմատոպորֆիրինին և նրա ածանցյալներին:

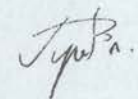
Մեր հետազոտության առարկա են հանդիսացել մի քանի երկրորդ սերնդի ֆոտոսենսիբիլիզատորների՝ քլորին e₆-ի, ալյումինիումի ֆթալոցիանինի և բակտերիոքլորոֆիրինի, էֆեկտիվության տարբեր բնութագրերը: Իրականացված է ֆոտոսենսիբիլիզատորների առաջին / հեմատոպորֆիրին / և երկրորդ / քլորին e₆, ալյումինիումի ֆթալոցիանին և բակտերիոքլորոֆիրին / սերունդների համեմատական հետազոտումը և հաստատված է, որ ըստ դրանց էֆեկտիվության երկրորդ սերնդի ֆոտոսենսիբիլիզատորները առավել գերադասելի են բժշկության մեջ օգտագործման համար:

Ուսումնասիրված է հետազոտվող ֆոտոսենսիբիլիզատորների տոքսիկությունը և ֆոտոտոքսիկությունը և հաստատված է, որ քլորին e₆-ը հանդիսանում է նվազագույն տոքսիկության ֆոտոսենսիբիլիզատոր, իսկ ալյումինիումի ֆթալոցիանինը դրսևորում է մյուս ֆոտոսենսիբիլիզատորների համեմատ առավել ֆոտոտոքսիկություն:

Ուսումնասիրված է հակաօքսիդանտային ֆերմենտների ազդեցությունը ֆոտոսենսիբիլիզատորների գործունեության վրա և հաստատված է, որ նրանք արգելակում են բջիջների ֆոտոքայքայման ընթացքը քլորին e₆-ի ցածր կոնցենտրացիայի դեպքում, իսկ բարձր կոնցենտրացիաների ժամանակ ֆերմենտները չեն ազդում:

Ցույց է տրված, որ քլորին e₆-ը խթանում է էրիթրոցիտների մեմբրանների կալիումական թափանցելիությունը, ընդ որում խթանումը պայմանավորված է սինգլետ թթվածնի և ջրածնի գերօքսիդի ազդեցությամբ:

Ուսումնասիրված է նաև քլորին e₆-ի ազդեցության տակ բջիջների ոչնչացման ճանապարհը և ցույց է տրված, որ ֆոտոքայքայմանը ենթարկվող բջիջների մի մասը ոչնչանում է ապոպտոզի ուղիով:



Տպագրված է «ԼԻՍՈՒՇ» ՍՊԸ-ի տպարանում:
Ֆորմատ 60x84 1/16, Թուղթ՝ օֆսեթ, Տպաքանակ՝ 70:
Ք. Երևան, Տեղյան 72 Հեռ. 58.22.99, 40.07.24
E-mail: print@netsys.am