

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ВЯЗКОСТНЫХ СВОЙСТВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Сороко С.С.¹, Юдинцев А.В.¹, Костюк А.Б.¹, Лермонтова С.А.^{1,2}, Плеханов В.И.³, Клапшина Л.Г.^{1,2}, Балалаева И.В.¹, Шилягина Н.Ю.¹

¹ Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ

² Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН
ул. Троицына, 49, г. Нижний Новгород, 603137, РФ

³ Институт прикладной физики РАН
ул. Ульянова 46, Нижний Новгород, 603155, РФ; e-mail: kastarashan@gmail.com

Аннотация. Фотодинамическая терапия – это интенсивно развивающийся метод лечения онкологических заболеваний, основанный на избирательном накоплении в опухоли фотосенсибилизатора и последующей его локальной активации видимым светом в присутствии кислорода тканей, приводящей к образованию свободных радикалов, токсичных для окружающих клеток. В настоящее время метод фотодинамической терапии имеет ряд нерешенных задач, среди которых можно выделить проблему отсутствия раннего контроля эффективности лечения и эмпирический характер подбора доз облучения. Известно, что фотодинамическая гибель клеток сопровождается значительным увеличением внутриклеточной вязкости. Одним из способов оценки внутриклеточной вязкости является использование флуоресцентных молекулярных роторов – соединений квантовый выход и время жизни флуоресценции которых увеличиваются с ростом вязкости. Ранее было показано, что тетраакис(4-фторфенил)тетрацианопорфиразин является флуоресцентным молекулярным ротором и агентом для фотодинамической терапии. В настоящей работе нами была проведена оценка дозозависимых изменений вязкостных свойств опухолевых клеток при фотодинамической терапии с порфиразином методом время-разрешенной микроскопии. Нами было показано, что фотодинамический ответ опухолевых клеток, индуцированный порфиразином, носит дозозависимый характер, который проявляется во временной задержке увеличения внутриклеточной вязкости с момента облучения. В свою очередь увеличение вязкости коррелирует с деструктивными морфологическими изменениями клеток.

Ключевые слова: порфиразин, фотодинамическая терапия, молекулярный ротор, вязкость, FLIM.

ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – интенсивно развивающийся метод лечения онкологических заболеваний, основанный на избирательном накоплении в опухоли красителя-флуорофора (фотосенсибилизатора) и последующей его локальной активации видимым светом в присутствии кислорода тканей, приводящей к образованию свободных радикалов, токсичных для окружающих клеток [1]. В сравнении с классическими методами лечения онкологических заболеваний ФДТ обладает рядом преимуществ: минимальная токсичность препарата для здоровых тканей, отсутствие механизмов приобретения резистентности к используемым препаратам, возможность амбулаторного проведения процедуры [2]. Однако метод ФДТ не лишен недостатков, среди которых можно выделить проблему эмпирического характера подбора режимов светового воздействия и отсутствие раннего контроля эффективности лечения [3].

Известно, что при фотодинамическом воздействии гибель опухолевых клеток сопровождается значительным увеличением внутриклеточной вязкости [4]. На сегодняшний день одним из подходов к оценке внутриклеточной вязкости является использование флуоресцентных молекулярных роторов. Молекулярные роторы – это соединения, состоящие из двух или более групп, способных вращаться друг относительно друга. Вращение группировок осуществляется за счет передачи энергии извне, к примеру, в результате механического воздействия или кванта света. Квантовый выход и время жизни флуоресценции молекулярных роторов существенным образом зависят от вязкости среды, что математически выражается в уравнениях Ферстера-Хоффмана (уравнения 1, 2) [5].

$$\lg(\varphi) = z + \alpha \lg(\eta), \quad (1)$$

где φ – квантовый выход флуоресценции; z и α – константы; η – вязкость.

$$\lg(\tau) = \lg(z/k_r) + \alpha \lg(\eta), \quad (2)$$

где τ – время жизни флуоресценции; η – вязкость; z и α – константы; k_r – константа скорости излучательного перехода.

В случае, когда вращение группировок молекулярного ротора относительно друг друга невозможно, вследствие стерических затруднений или высокой вязкости раствора, возрастает квантовый выход флуоресценции и время жизни флуоресценции молекулярного ротора [6]. Степень вязкостной чувствительности молекулярных роторов выражается коэффициентом α (уравнения 1-2), который может находиться в диапазоне 0,33-0,69.

Ранее нами было синтезировано ряд соединений, включая тетраakis(4-фторфенил)тетрацианопорфиразин (Pz), сочетающих свойства фотосенсибилизатора и молекулярного ротора [7, 8]. В предыдущих экспериментах на культурах опухолевых клеток нами было показано, что при фотодинамической гибели клеток, индуцированной Pz, происходит увеличение квантового выхода и времени жизни флуоресценции Pz, вследствие, как мы полагаем, увеличения внутриклеточной вязкости или возникновения иных стерических затруднений [7].

Целью данной работы стало исследование дозовой зависимости индуцированного фотодинамическим воздействием изменения вязкости опухолевых клеток, оцениваемой по времени жизни возбужденного состояния Pz.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое соединение. В работе исследовали соединение порфиразиновой природы – тетраakis(4-фторфенил)тетрацианопорфиразин, синтезированное в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН методом темплатной сборки [7]. Структурная формула Pz представлена на рисунке 1.

Ранее нами было показано, что Pz поглощает в диапазоне 560-650 нм, флуоресцирует в диапазоне 640-700 нм, накапливается в опухолевых клетках и проявляет фотодинамическую активность [9].

Исследование зависимости времени жизни Pz от вязкости среды. На первом этапе исследования для построения калибровочных кривых зависимости времени жизни флуоресценции Pz от вязкости среды (рис. 2) использовали спиртоглицериновые растворы с различным процентным содержанием глицерина с известными значениями вязкости [10]. В приготовленные растворы добавляли Pz (5 мкМ) и регистрировали средневзвешенное время жизни флуоресценции с помощью метода время-разрешенного флуоресцентного имиджинга (fluorescence lifetime imaging, FLI) на установке для время-коррелированного счета одиночных фотонов (ИПФ РАН, Россия) на основе платы SPC-150 (Becker & Hickel, Германия). Измерения проводили при комнатной температуре. Полученные данные аппроксимировали биэкспоненциальной зависимостью. Аппроксимация биэкспоненциальной зависимостью была выбрана на основании наименьшего значения коэффициента детерминации. Биэкспоненциальная зависимость свидетельствует о наличии двух типов излучательных центров у Pz. В результате оценивалось средневзвешенное время жизни флуоресценции Pz:

$$\tau_i = \frac{a_1\tau_1^2 + a_2\tau_2^2}{a_1\tau_1 + a_2\tau_2}, \quad (3)$$

где a_1 – доля 1-компоненты, a_2 – доля 2-компоненты, τ_1 – время жизни возбужденного состояния 1-компоненты, τ_2 – время жизни возбужденного состояния 2-компоненты.

Клеточная культура. Эксперименты проводили с использованием клеточной линии эпидермоидной карциномы кожи человека A431. Клетки культивировали в 25 см²-культуральных флаконах (Corning, США) при температуре 37 °С и содержании CO₂ в воздухе 5%. В качестве питательной среды использовали DMEM (HyClone, США), с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Для снятия клеток с культурального флакона использовали раствор трипсин:ЭДТА (1:1) (ПанЭко, Россия), для промывки клеток использовали 10 мМ фосфатно-солевой буфер (PBS).

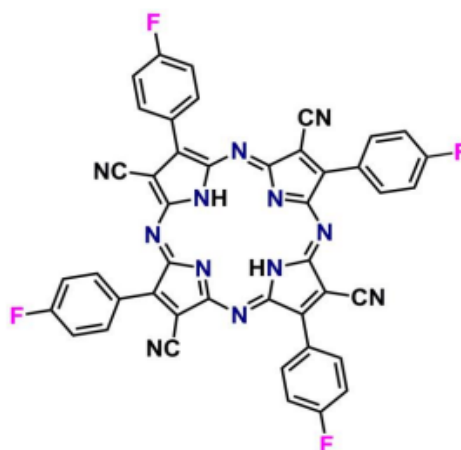


Рисунок 1. Структурная формула тетраakis(4-фторфенил)тетрацианопорфиразина (Pz)

Анализ жизнеспособности клеток. Анализ жизнеспособности клеточной культуры A431 проводили при помощи МТТ-теста. Клетки инкубировали с Pz в культуральной среде без сыворотки в течение 4 часов в темноте. Для оценки световой токсичности Pz осуществляли световое воздействие в диапазоне длин волн 615-635 нм в дозе 20 Дж/см² с помощью светодиодной установки для создания равномерного светового потока в стандартных 96-луночных планшетах [4]. МТТ-реагент (Alfa Aesar, Великобритания) добавляли в ростовую среду в конечной концентрации 0,5 мг/мл и далее клетки инкубировали с МТТ-красителем в течение 4 часов. После чего инкубационную среду отбирали и растворяли образовавшийся окрашенный МТТ-формаза в мкл диметилсульфоксида. Жизнеспособность клеток оценивали по отношению значения оптической плотности раствора формаза в каждой пробе к контролю (без фотосенсибилизатора). Измерение проводили на планшетном спектрофотометре Synergy MX на длине волны 570 нм. Полученные зависимости доза-эффект использовали для расчета дозы приводящей к ингибированию роста культуры клеток на 50% (IC₅₀) (GraphPad Prism, США).

Время-разрешенная флуоресцентная микроскопия. Для исследования дозозависимого изменения вязкостных свойств опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии клетки A431 сажали в лунки тонкодонного 96-луночного планшета (Corning, США) в количестве 40 тыс. клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. Затем питательную среду заменяли на 200 мкл раствора Pz (5 мкМ) в среде DMEM без сыворотки. Клетки инкубировали с Pz 1,5 часа в CO₂-инкубаторе. Данное время инкубации с Pz было выбрано на основании предварительных экспериментов.

Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа AxioObserver Z1 LSM 710 Duo NLO (Carl Zeiss, Германия), оборудованного системой время-разрешенного флуоресцентного имиджинга FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) (Becker & Hickl, Германия). Флуоресценцию Pz возбуждали в двухфотонном режиме импульсным фемтосекундным лазером на длине волны 800 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 640-710 нм. Время жизни флуоресценции измеряли до и каждые 30 минут в течение 4 часов после фотодинамического воздействия. В результате получали псевдоцветные изображения клеток, на которых цветом закодировано время жизни флуоресценции Pz, и кривые затухания флуоресценции в каждой точке изображения, которые аппроксимировали биэкспоненциальной зависимостью. При анализе изображений получали усредненные значения времен жизни флуоресценции Pz в выбранных областях интереса с помощью программы SPCImage (Becker & Hickl, Германия).

Фотодинамическое воздействие осуществляли через объектив микроскопа лазером с длиной волны 594 нм в дозах 5-50 Дж/см². Облучению подвергалась половина поля зрения микроскопа, вторая половина поля зрения использовалась в качестве контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования для пересчета значений времен жизни флуоресценции (τ) Pz в клетке в значения внутриклеточной вязкости (η) были измерены времена жизни флуоресценции Pz в спиртоглицериновых растворах с различным процентным содержанием глицерина и получено уравнение прямой зависимости времени жизни флуоресценции Pz от вязкости в логарифмических координатах (рис. 2). Коэффициент вязкостной чувствительности α для Pz составил 0,62.

Следует отметить, что внутриклеточная вязкость не является величиной однозначной для целой клетки и отличается в различных ее точках. Цитоплазма является гетерогенной структурой, что влияет на вязкость в разных ее участках. Поэтому в случае внутриклеточной вязкости можно говорить о «кажущейся» вязкости или локальном микроокружении порфиразина и полученные рассчитанные значения вязкости позволяют лишь сделать условную оценку [11].

Оценка темновой и световой токсичности Pz в отношении клеток A431 в культуре показала, что IC₅₀ при инкубации в темноте и на свету составляет 8,4 мкМ и 0,74 мкМ, соответственно (рис. 3).

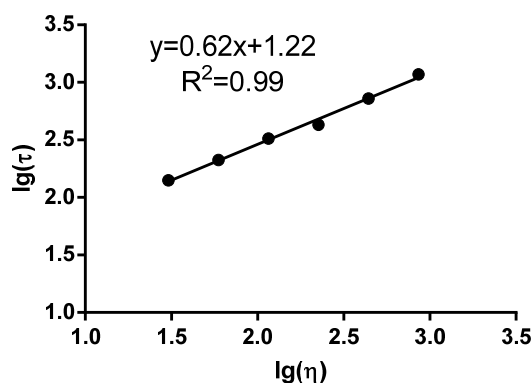


Рисунок 2. Зависимость времени жизни флуоресценции Pz от вязкости спиртоглицеринового раствора

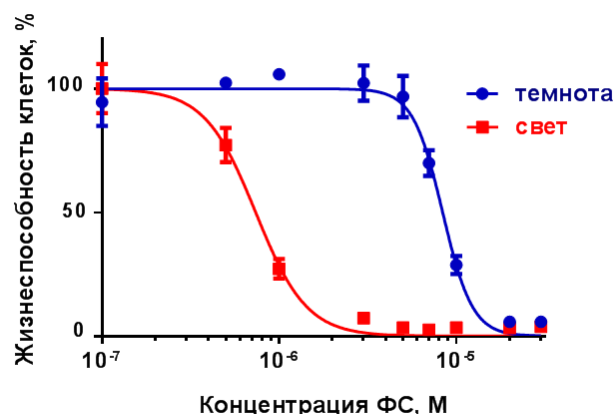


Рисунок 3. Кривая жизнеспособности клеток A431 в зависимости от концентрации Pz в темноте и при облучении светом 615-635 нм в дозе 20 Дж/см²

Для оценки дозозависимых изменений внутриклеточной вязкости опухолевых клеток при фотодинамическом воздействии методом время-разрешенной флуоресцентной микроскопии были получены изображения клеток, предынкубированных с Pz (5 мкМ, 1,5 часа). Изображения приведены в псевдоцветной палитре, где цветом в каждом пикселе закодировано средневзвешенное время жизни флуоресценции Pz (рис. 4). Хорошо видно, что в облученной области (левая часть изображения) после фотодинамического воздействия происходят значительные морфологические изменения клеток: сжатие, ошаривание и последующее открепление клеток от подложки культурального планшета. Данные изменения могут свидетельствовать о начавшейся гибели клеток в результате фотодинамического воздействия, индуцированного Pz. При дозе 5 Дж/см² эти изменения менее выражены, предположительно необходимо больше времени на развитие необратимых деструктивных реакций в клетках для наступления выраженных морфологических изменений. В необлученной области морфологических изменений клеток практически не наблюдается, небольшие изменения связаны с режимом сканирования клеток во время получения изображения. Кроме того, замечено значительное увеличение времени жизни флуоресценции Pz с 600 до 1100 пс (в 1,5-2 раза) в облученной области. По нашим предположениям эти изменения времен жизни флуоресценции в клетке связаны с изменением локального микроокружения Pz вследствие начавшихся процессов клеточной гибели, приводящих к увеличению микровязкости. В необлученной области значительного изменения времен жизни флуоресценции не было выявлено.

Полученные значения времен жизни флуоресценции Pz пересчитывали в значения «кажущейся» вязкости с помощью уравнения Ферстера-Хоффмана с использованием коэффициентов, полученных в экспериментах на средах известной вязкости. Зависимость изменения вязкости от дозы и времени после облучения представлена на рисунке 5.

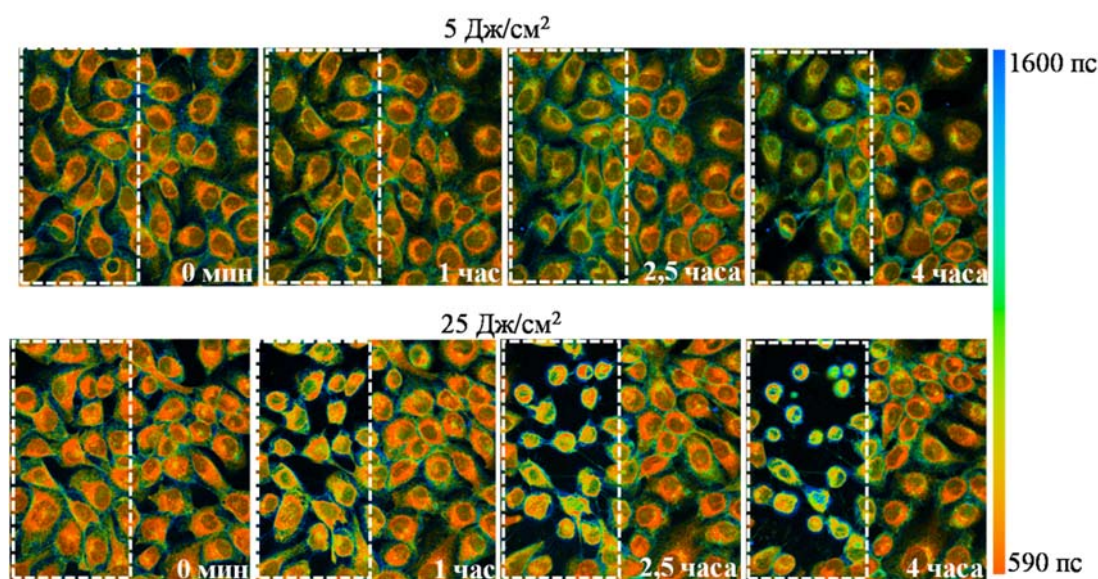


Рисунок 4. Псевдоцветные изображения клеток A-431 до и после проведения фотодинамического воздействия в дозах 5 Дж/см² и 25 Дж/см². Облучаемый участок выделен пунктиром. Инкубация Pz 1,5 часа (5 мкМ). Цветом закодировано средневзвешенное время жизни флуоресценции Pz. $\lambda_{ex} = 800$ нм, $\lambda_{em} = 640-710$ нм. Размер изображений 212x212 мкм

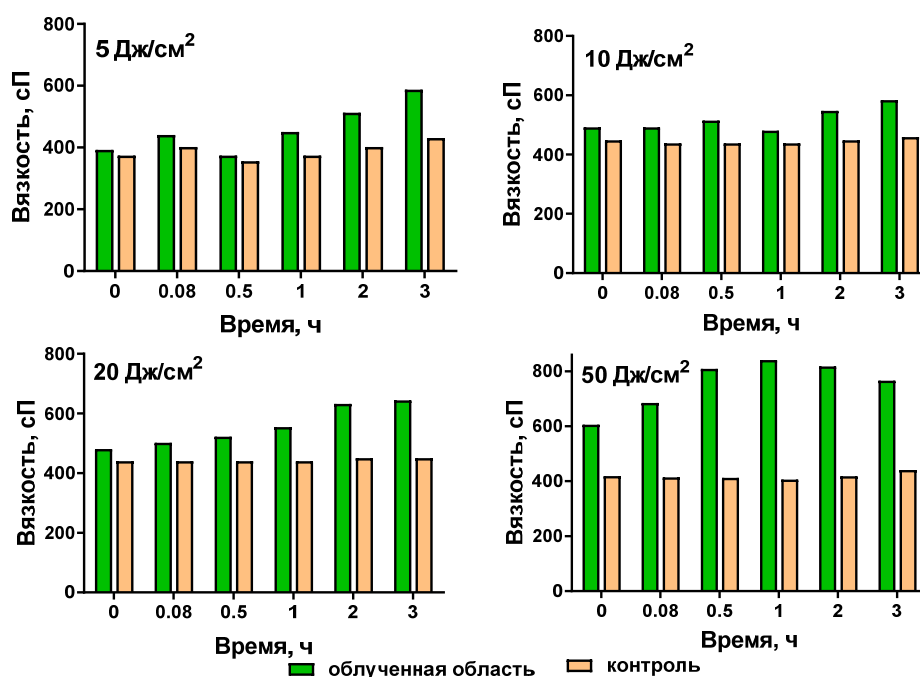


Рисунок 5. Зависимость внутриклеточной вязкости клеток A431 от времени после фотодинамического воздействия в облученной и необлученной области при различных световых дозах

По полученным данным хорошо видно, что при фотодинамическом воздействии проявляется дозозависимый эффект, который выражается во времени наступления фотодинамического ответа в виде увеличения внутриклеточной вязкости, коррелирующей с морфологическим состоянием клеток. При меньших дозах ответ наступает позднее, и он менее выражен, чем при больших дозах. К примеру, при облучении в дозах 20-50 Дж/см² происходит увеличение времени жизни флуоресценции Pz в 1,5-2 раза (от 800 пс до 1400 пс), и, при пересчете в вязкость, в 2 раза (от 400 сП до 850 сП) сразу после облучения. При дозах 5 и 10 Дж/см² изменения времени жизни флуоресценции и, соответственно, внутриклеточной вязкости менее выражены и наступают значительно позже: через час и 30 минут, соответственно. По нашим предположениям при больших дозах Pz получает достаточно энергии, чтобы запустить необратимые свободнорадикальные реакции, приводящие к значительным необратимым изменениям в клетках. Предположительно, при больших дозах синглетный кислород, действуя на молекулу-мишень, запускает множество деструктивных реакций (изменение жирнокислотного состава и упаковки мембран, образование оснований Шиффа, денатурация белков), приводящих к стремительному увеличению внутриклеточной вязкости [12, 13]. При меньших дозах, образовавшихся при фотодинамическом воздействии первичных радикалов недостаточно для развития деструктивных процессов в клетке, однако со временем они могут развиваться вследствие вырожденно-разветвленного характера свободнорадикальных реакций. Таким образом, по нашим предположениям, увеличение вязкости зависит от мощности оксидативного стресса, который регулируется дозой света.

Таким образом, нами показана дозовая зависимость ответа опухолевых клеток на фотодинамическое воздействие с Pz. Чем выше доза облучения, тем раньше возникает ответ, выражающийся в увеличении времени жизни флуоресценции Pz, а, следовательно, увеличении внутриклеточной вязкости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что вязкостной ответ клетки на фотодинамическое воздействие существенным образом зависит от дозы света. При небольших световых дозах ответ клетки, выраженный в увеличении внутриклеточной вязкости, коррелирующей с деструктивными морфологическими изменениями, развивается в течение длительного периода времени. Мы предполагаем, что необратимые морфологические изменения клеток, приводящие к гибели клетки, индуцированной высокими световыми дозами, наступают при достижении определенного порога увеличения вязкости. Полученные результаты дают основания полагать, что использование Pz в качестве вязкостного сенсора и одновременно фотодинамического агента позволит проводить дозиметрический контроль фотодинамической терапии с последующим прогнозом её эффективности в каждом конкретном случае.

Работа выполнена в рамках Госзадания №6.3099.2017/ПЧ.

Список литературы / References:

1. Hamblin M.R., Mroz P. *History of PDT: The first hundred years. In: Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical.* Norwood, MA: Artech House, Inc, 2008.
2. Celli J.P., Spring B.Q. [et al.] Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev*, 2010, vol. 110, no. 5, pp. 2795-2838.
3. Гамаюнов С.В., Шахова Н.М., Денисенко А.Н. [и др.] Фотодинамическая терапия – преимущества новой методики и особенности организации службы. *Тихоокеанский медицинский журнал*, 2014, № 2, с. 101-104. [Gamayunov S.V., Shakhova N.M., Denisenko A.N. and others. Photodynamic therapy - the advantages of a new technique and features of the organization of service. *Tihookeanskii medicinskii jurnal*, 2014, no. 2, pp. 101-104. (In Russ.)]
4. Kuimova M.K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, vol. 14, no. 37, pp. 12671-12686.
5. Haidekker M., Brady T., Wen K., Okada C., Stevens H., Snell J., Frangos J., Theodorakis E. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 33, no. 6, pp. 415-425.
6. Ужинов Б.М., Иванов В.Л., Мельников М.Я. Молекулярные роторы – люминесцентные сенсоры локальной вязкости и вязкого течения в растворах и биологических системах. *Успехи химии*, 2011, т. 80, № 12, с. 1231-1243. [Uzhinov B.M., Ivanov V.L., Melnikov M.Ya. Molecular rotors - luminescent sensors of local viscosity and viscous flow in solutions and biological systems. *Uspehi himii*, 2011, vol. 80, no. 12, pp. 1231-1243. (In Russ.)]
7. Izquierdo M. Angeles, Vyšniauskas Aurimas, Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Kuimova M.K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers during photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, no. 3, pp. 1089-1096.
8. Lermontova S., Grigorev I., Shilyagina N., Peskova N., Balalaeva I., Shirmanova M., Klapshina L. New Porphyrazine Macrocycles with High Viscosity-Sensitive Fluorescence Parameters. *Russian Journal of General Chemistry*, 2016. vol. 86, no. 6, pp. 1011-1018.
9. Shilyagina N.Y., Peskova N.N., Lermontova S.A. and others Effective delivery of porphyrazine photosensitizers to cancer cells by polymer brush nanocontainers. *J. Biophotonics*, 2016, vol. 10, no. 9, pp. 1189-1197.
10. *Glycerine Producers' Association Physical Properties of Glycerine and Its Solutions.* New York: Glycerine Producers' Association, 1963, 25 p.
11. Пучков Е.О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме. *Биологические мембраны*, 2014. т. 31, № 1, с. 3-13. [Puchkov E.O. Intracellular viscosity: methods of measurement and role in metabolism. *Biologicheskije membrany*, 2014, vol. 31, no. 1, pp. 3-13. (In Russ.)]
12. DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, vol. 233, pp. 351-371.
13. Krasnovskii A.A. Photodynamic activity and singlet oxygen. *Biofizika*, 2004, vol. 49, no. 2. pp. 305-21.

DOSE-DEPENDENT CHANGES OF TUMOR CELL VISCOSITY UNDER PHOTODINAMIC TREATMENT

Soroko S.S.¹, Yudintsev A.V.¹, Kostiuk A.B.¹, Lermontova S.A.^{1,2}, Plekhanov V.I.³, Klapshina L.G.^{1,2}, Balalaeva I.V.¹, Shilyagina N.Yu.¹

¹ Lobachevsky Nizhny Novgorod State University
Gagarin ave., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

² Razuvayev Institute of Organometallic Chemistry of RAS
Tropinin str., 49, Nizhny Novgorod, 603137, Russia

³ Institute of Applied Physics of RAS

Ulyanov str., 46, Nizhny Novgorod, 603155, Russia; e-mail: kastarashan@gmail.com

Abstract. Photodynamic therapy is an intensively developing method of treating oncological diseases based on selective accumulation of a photosensitizer in a tumor and its subsequent local activation with visible light in the presence of oxygen, leading to the formation of free radicals that are toxic to surrounding cells. Currently, the method of photodynamic therapy has a number of unsolved problems, among which we can highlight lack of tool for early assessment of the effectiveness of treatment and the empirical nature of the selection of light irradiation dose. It is known that photodynamically induced cell death is accompanied by a significant increase in intracellular viscosity. One way to assess intracellular viscosity is to use fluorescent molecular rotors – compounds whose quantum yield and fluorescence lifetime strongly depend on the medium viscosity. It has previously been shown that tetrakis(4-fluorophenyl)tetracyanoporphyrazine is a fluorescent molecular rotor and agent for photodynamic therapy. In the present work, we evaluated dose-dependent changes in the viscosity properties of tumor cells under photodynamic treatment with porphyrazine using the time-resolved microscopy method. We have shown that the response of tumor cells to porphyrazine-based photodynamic treatment is dose-dependent that is manifested in the time of onset and in the degree of increase in intracellular viscosity. In turn, the viscosity increase correlates with destructive changes in the cell morphology.

Key words: porphyrazine, photodynamic therapy, molecular rotor, viscosity, FLIM.