

Список литературы / References:

1. Сидорова А.Э., Твердислов В.А. Самоорганизация в иерархии активных сред как движущая сила эволюции биосферы. *ВМУ. Серия 3. Физика. Астрономия*, 2012, № 2, с. 65-69. [Sidorova A.E., Tverdislov V.A. Self-Organization as the Driving Force for the Evolution of the Biosphere. *Moscow University Physics Bulletin*, 2012, vol. 68, no. 5, pp. 405-410. (In Russ.)]
2. Kondepudi D., Prigogin I. *Modern Thermodynamics: From Heat Engines to Dissipative Structures*. Wiley, 1998, 508 p.
3. Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Яковенко Л.В. *Биофизическая экология*. Монография. М.: УРСС, 2011, 544 с. [Tverdislov V.A., Sidorova A.E., Yakovenko L.V. *Biophysical ecology*. Monograph. M.: URSS, 2011, 544 p. (In Russ.)]
4. Koonin E.V., Makarova K.S., Arvind L. *Annual Rev. Micbiol.*, 2001, vol. 55, pp. 709-742.
5. Richardspn A.O., Palmer J.D. Horizontal gene transfer in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol. 58, pp. 1-9.
6. Kjelldbjerg A.L., Villsen P., Aagaard L., Pederen F.S. Gene conversion and purifying of a placenta-specific ERV-V envelope gene during simian evolution. *BMS Evolutionary Biology*, 2008, vol. 8, p. 266.
7. Шестаков С.В. Роль горизонтального переноса генов в эволюции. *Доклад на теоретическом семинаре геологов и биологов «Происхождение живых систем»*. 15-20 августа 2003 г. Горный Алтай. [Shestakov S.V. The role of horizontal gene transfer in evolution. *Report on the theoretical seminar of geologists and biologists "The origin of living systems."* August 15-20, 2003 Mountainous Altai. (In Russ.)]
8. Эйген М., Шустер П. *Гиперцикл. Принципы самоорганизации макромолекул*. М.: Мир, 1982, 270 с. [Eigen M., Schuster P. *Hypersycle. Principles of self-organization of macromolecules*. M.: 1982, 270 p. (In Russ.)]
9. Марков А.В., Анисимов В.А., Коротаев А.В. Взаимосвязь размера генома и сложности организма в эволюционном ряду от прокариот к млекопитающим. *Палеонтологический журнал*, 2010, № 4, с. 3-14. [Markov A.V., Anisimov V.A., Korotaev A.V. Interrelation of the size of the genome and the complexity of the organism in the evolutionary series from prokaryotes to mammals. *Paleontological Journal*, 2010, no. 4, pp. 3-14 (In Russ.)]
10. Whitney K.D., Garland T. Jr. Did Genetic Drift Drive Increases in Genome Complexity. *PLoS Genetics*, 2010, vol. 6, no. 8, p. e1001080.
11. Пер Бак. *Как работает природа: теория самоорганизованной критичности*. Пер. с англ. Москва: УРСС: Librocom, 2013, 269 с. [Per Buck. *How nature works: the theory of self-organized criticality*. Moscow: URSS: Librocom, 2013, 269 p. (In Russ.)]

**ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАЗВУКА И СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА
ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК**

Колосов М.С., Арефьев Р.А., Лапухина В.В., Яценко В.К.

Южный федеральный университет

ул. Зорге, 5, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ

e-mail: msk@sfedu.ru

Аннотация. В литературе имеются сведения о том, что низкоинтенсивный ультразвук может усиливать свое повреждающее действие на живые клетки в присутствии некоторых веществ – сенсibilизаторов. Такими веществами в большинстве имеющихся работ выступали фотосенсibilизаторы – соединения способные генерировать под действием света цитотоксические продукты, в частности синглетный кислород. Физико-химические механизмы сенсibilизации клеток к ультразвуку, то есть так называемого «сонодинамического эффекта», не ясны. Есть некоторые свидетельства в пользу гипотезы об участии в этом процессе активных форм кислорода. Целью настоящей работы было воспроизведение сонодинамического эффекта, а также выяснение его возможных клеточно-молекулярных механизмов. В качестве сенсibilизирующих клетки к действию ультразвука (2,53 МГц или 44 кГц) веществ использовали два фотосенсibilизатора – метиленовый синий и алюмофталоцианин Фотосенс, а также наночастицы Fe₃O₄. Ультразвук с частотой 2,53 МГц, не вызывавший кавитационных явлений в экспериментальной кювете, не приводил к образованию пероксида водорода, синглетного кислорода, и не обладал повреждающим эффектом на клетки ни сам по себе, ни в сочетании с использованными фотосенсibilизаторами. Ультразвук с частотой 44 кГц, вызывавший выраженные кавитационные явления, приводил к росту процента некротических клеток, и продуцировал пероксид водорода. Добавление наночастиц Fe₃O₄, но не фотосенсibilизаторов, на треть усиливало УЗ-индуцированный некроз клеток. При этом не наблюдалось усиления продукции пероксида водорода, но происходило образование синглетного кислорода.

Ключевые слова: сонодинамический эффект, кавитация, активные формы кислорода.

INFLUENCE OF COMBINED ACTION OF ULTRASOUND AND SENSITIZERS ON FORMATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND CELL SURVIVAL

Kolosov M.S., Aref'ev R.A., Lapukhina V.V., Yatsenko V.K.

Southern Fedral University

Zorge St., 5, Rostov-on-Don, 344090, Russia

e-mail: msk@sfedu.ru

Abstract. There are literary evidences that low-intensity ultrasound can enhance its damaging effect on living cells in presence of certain substances - sensitizers. Such substances in the most works were photosensitizers – the compounds that capable for light-depending generation of cytotoxic products, in particular singlet oxygen. The physicochemical mechanisms of cell sensitization to ultrasound, that is, mechanisms of so-called "sonodynamic effect," are not clear. There are some evidences in favor of the hypothesis that reactive oxygen species participate in this process. The purpose of this work was to reproduce the sonodynamic effect, as well as to elucidate its possible cellular-molecular mechanisms. As the cell-sensitizing substances for ultrasound of 2.53 MHz or 44 kHz two photosensitizers - methylene blue and aluminophthalocyanine Photosens, as well as Fe₃O₄ nanoparticles were used. Ultrasound of 2.53 MHz, which did not cause cavitation phenomena in the experimental chamber, did not lead to the formation of hydrogen peroxide, singlet oxygen, and did not affect cells survival, either alone or in combination with the photosensitizers. Ultrasound of 44 kHz itself, causing pronounced cavitation phenomena, raised the percentage of necrotic cells, and produced hydrogen peroxide. The addition of Fe₃O₄ nanoparticles, but not photosensitizers, had increased ultrasound-induced necrosis of cells by one-third. Herewith, there was no increase in the production of hydrogen peroxide, but the formation of singlet oxygen was observed.

Key words: sonodynamic effect, cavitation, reactive oxygen species.

Фотодинамический эффект, физико-химические механизмы которого хорошо изучены [1], успешно используется в медицине для терапии злокачественных опухолей [2]. В виду сильного ослабления оптического излучения живыми тканями, применимость метода ограничена преимущественно поверхностно расположенными формами опухолей. В литературе имеются сообщения о наблюдении усиления повреждающего действия низкоинтенсивного ультразвука на живые клетки в присутствии некоторых веществ [3,4]. По аналогии с явлением сенсбилизации к свету эффект сенсбилизации к ультразвуку получил название: «сонодинамический эффект». Любопытно, что в большинстве работ для сенсбилизации клеток к ультразвуку использовали фотосенсбилизаторы. Преимущество сонодинамического эффекта перед фотодинамическим для повреждения злокачественных клеток связано с лучшей, по сравнению со светом, проникаемостью ультразвука в биоткани. Однако, для применения сонодинамического эффекта в медицине необходимо четкое понимание физико-химических механизмов лежащих в его основе, которое на данный момент отсутствует. В литературе есть некоторые данные в пользу генерации активных форм кислорода (АФК). Однако конкретные пути соносенсбилизированного образования АФК остаются невыясненными. Целью настоящей работы было воспроизведение сонодинамического эффекта, а также выяснение его возможных клеточно-молекулярных механизмов. Поскольку в имеющейся по сонодинамике литературе отсутствуют четкие сведения о том, существенен ли для протекания соносенсбилизированных реакций кавитационный режим ультразвукового воздействия, в работе мы использовали два режима – сопровождавшийся и не сопровождавшийся коллапсирующей кавитацией.

Ультразвуковое воздействие с частотой 2,53 МГц (10 мин, 3 Вт/см²) или 44 кГц (30 сек, амплитуда колебаний концентратора терапевтического аппарата Лора-Дон – 7 мкм) оказывали на препарат нервной ткани беспозвоночного – изолированный рецептор растяжения речного рака *Astacus Astacus*. За время озвучивания физраствор в экспериментальной кювете нагревался примерно на 3 °С. В отдельных экспериментах осуществлялась внеклеточная регистрация импульсной активности механорецепторного нейрона входящего в состав препарата. Наличие коллапсирующей кавитации в озвучиваемой экспериментальной кювете с физиологическим раствором оценивали с помощью гидрофона, подключенного к анализатору спектра - по появлению гармоник с половинной частотой. Потенциальные сенсбилизаторы – метиленовый синий (4 мкМ), алюмофталоцианин Фотосенс (4 мкМ) или наночастицы Fe₃O₄ (средний размер 40 нм, 50 мкг/мл) добавляли в экспериментальную кювету с препаратом механорецептора за 30 минут до озвучивания. Выживаемость клеток определяли спустя 6 часов после УЗ воздействия путем двойного флуорохромирования препаратов иодидом пропидия (окрашивает ядра некротических клеток с поврежденной плазматической мембраной) и Hoechst 33342 (окрашивает ядра живых клеток) с последующим изучением на флуоресцентном микроскопе. Образование АФК в физиологическом растворе оценивали спектрофотометрически с использованием стандартных тест-систем для детекции пероксида водорода и синглетного кислорода – 2,2'-азино-ди(3-этил-2,3-дигидробензотиазолин-6-сульфонат) аммония (ABTS) с пероксидазой хрена (HRP), и пара-нитрозодиметиланилин (RNO) с гистидином (His), соответственно. За время озвучивания использованные объемы растворов этих тест-систем нагревались примерно на 10 °С. Исходная температура всех растворов была равна комнатной температуре (24 °С).

Воздействие ультразвука с частотой 2,53 МГц, не вызывавшего коллапсирующей кавитации, само по себе не приводило к образованию ни перекиси водорода, ни синглетного кислорода в физиологическом растворе. Добавление фотосенсбилизаторов – метиленового синего или Фотосенса также не вызывало детектируемой продукции H₂O₂ или ¹O₂. УЗ воздействие этой модальности на изолированный механорецептор не приводило к

изменению уровня некроза нервных и глиальных клеток, оцениваемого через 6 часов после воздействия – ни само по себе, ни в сочетании с метиленовым синим. Пролонгированное воздействие УЗ с частотой 2,53 МГц в присутствии Фотосенса на протяжении 2 часов не изменяло частоту импульсации механорецепторного нейрона (физраствор в экспериментальной кювете при этом нагрелся на 5 °С).

Ультразвуковое воздействие с частотой 44 кГц, порождавшее коллапсирующую кавитацию, вызывало в физрастворе образование пероксида водорода (см. рис. 1). Это хорошо согласуется с известными литературными данными о сонохимической продукции H_2O_2 [5]. При этом ни фотосенсибилизаторы, ни наночастицы Fe_3O_4 не усиливали эффективность УЗ-индуцированного образования перекиси водорода (см. рис. 1). Увеличение оптической плотности озвученного раствора наночастиц Fe_3O_4 , вероятно, было связано с диспергированием агрегировавших частиц изначально присутствовавших в растворе. На фоне такого повышения оптической плотности раствора наночастиц мы наблюдали существенное (в 5 раз) УЗ-индуцированное уменьшение оптической плотности тест-системы для детекции синглетного кислорода (RNO + гистидин) в присутствии наночастиц Fe_3O_4 (см. рис. 2), что указывало на образование в системе 1O_2 . Озвучивание растворов фотосенсибилизаторов не приводило к образованию синглетного кислорода. Ультразвук с частотой 44 кГц увеличивал процент некротических клеток с 15 до 45 % (см. рис. 3). Ни метиленовый синий, ни Фотосенс не сенсибилизировали усиление повреждающего действия ультразвука этой модальности. Однако, в присутствии наночастиц Fe_3O_4 , которые сами по себе не обладали цитотоксичностью в концентрации 50 мкг/мл, мы наблюдали усиление УЗ-индуцированного некроза клеток (см. рис. 3), который возрастал на треть по сравнению с действием ультразвука самого по себе. Любопытно, что такое совместное действие коллапсирующей кавитации и наночастиц вызывало морфологические изменения ядер клеток, не наблюдавшиеся ранее ни в наших экспериментах, ни в известной нам литературе. Это были специфическая «скомканность» ядер некротических клеток, а также «треки» хроматина (см. рис. 4). Можно предположить, что оба этих явления – следствие попадания в клеточное ядро наночастиц, получивших импульс при схлопывании кавитационных пузырьков, и мигрирующих впоследствии внутри клетки под действием ультразвукового поля.

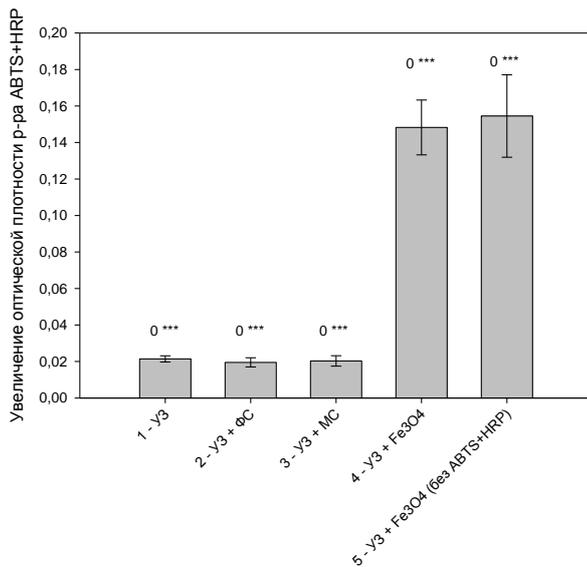


Рисунок 1 – Влияние ультразвука 44 кГц и сенсибилизаторов на образование пероксида водорода в физиологическом растворе (УЗ – ультразвук, МС – метиленовый синий, ФС – Фотосенс, Fe_3O_4 – наночастицы оксида железа)

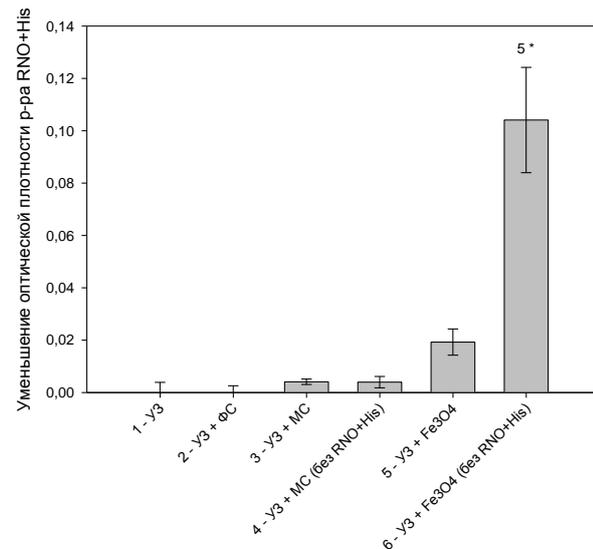


Рисунок 2 – Влияние ультразвука 44 кГц и сенсибилизаторов на образование пероксида водорода в физиологическом растворе (УЗ – ультразвук, МС – метиленовый синий, ФС – Фотосенс, Fe_3O_4 – наночастицы оксида железа)

Таким образом использованные нами фотосенсибилизаторы в концентрации 4 мкМ не продемонстрировали никакой сонодинамической эффективности – они не вызывали образования таких цитотоксических продуктов как перекись водорода или синглетный кислород, и не сенсибилизировали повреждения клеток ни при кавитационном, ни при безкавитационном УЗ воздействии. Отсутствие в наших экспериментах описанного в литературе сонодинамического эффекта фотосенсибилизаторов указывает, по-видимому, на неполное воспроизведение нами необходимых экспериментальных условий. Наночастицы Fe_3O_4 со средним размером 40 нм при кавитационном режиме УЗ воздействия продуцировали синглетный кислород, который является цитотоксическим фактором. На соносенсибилизированное наночастицами Fe_3O_4 повреждение клеток указывает рост процента некроза клеток, что свидетельствует о принципиальном воспроизведении в условиях нашего эксперимента сонодинамического эффекта. Вопрос об основном действующем механизме наблюдавшегося эффекта остается открытым. Вполне возможно, что имело место комбинированное действие синглетного

кислорода и механического повреждения клеточных мембран наночастицами, получавшими импульс от схлопывающихся пузырьков. Для медицинского применения наблюдавшегося эффекта, в частности для терапии злокачественных клеток, очевидно, необходимо исследовать режим сонодинамического воздействия, порождаемого ультразвуком, который сам по себе обладал бы меньшей цитотоксичностью, а также более детально изучить вклад в повреждение клеток различных имеющих место при соносенсибилизации факторов.

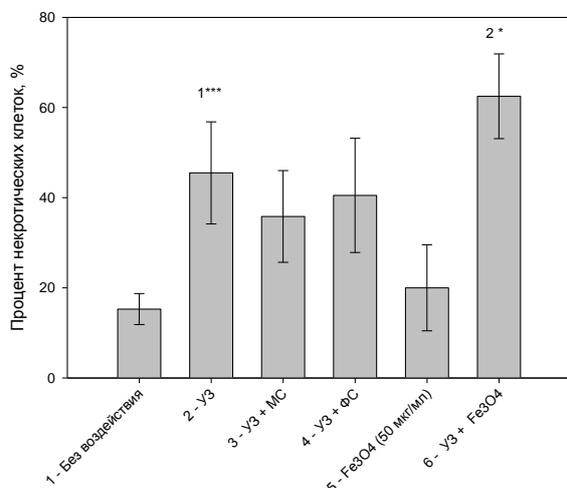


Рисунок 3 – Влияние ультразвука 44 кГц и сенситизаторов на выживаемость клеток (УЗ – ультразвук, МС - метиленовый синий, ФС – Фотосенс, Fe₃O₄ – наночастицы оксида железа)

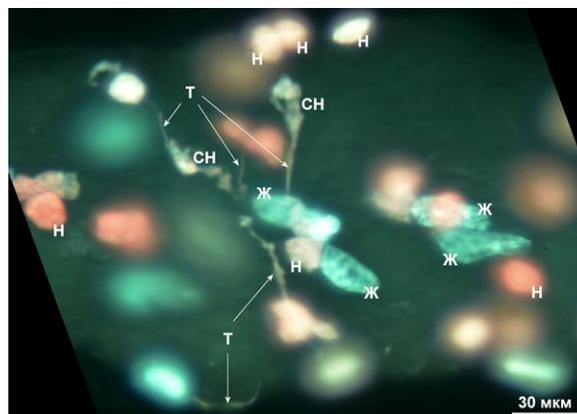


Рисунок 4 – ядра клеток рецептора растяжения речного рака после совместной обработки наночастицами оксида железа и ультразвуком 44 кГц (Ж – ядро живой клетки, Н – ядро некротической клетки, СН – «скомканное» ядро некротической клетки, Т – «треки» хроматина)

Авторы выражают благодарность сотруднику Международного исследовательского центра «Интеллектуальные материалы» Южного федерального университета Михаилу Солдатову за предоставленные наночастицы Fe₃O₄.

Список литературы / References:

1. Посудин Ю.И. *Лазерная фотобиология*. К.: Вища школа, 1989. [Posudin Yu.I. *Laser photobiology*. Kiev: Vishcha shkola, 1989. (In Russ.)]
2. 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, vol. 90, pp. 889-905.
3. Costley D., Mc Ewan C., Fowley C., McHale A. P., Atchison J., Nomikou N., Callan J. F. Treating cancer with sonodynamic therapy: A review. *International Journal of Hyperthermia*, 2015, vol. 31, pp. 107-117.
4. McHale A.P., Callan J.F., Nomikou N., Fowley C., Callan B. Sonodynamic Therapy: Concept, Mechanism and Application to Cancer Treatment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, vol. 880, pp. 429-450.
5. Маргулис М.А. *Основы звукохимии*, М.: Высш. шк., 1984. [Margulis M.A. *Fundamentals of sonochemistry*, Moskva, Vysshaya shkola, 1984. (In Russ.)]

ПРИНЦИПЫ БИОЛОГИИ КЛЕТКИ В ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ БИОФИЗИКЕ

Белобров П.И.

Институт биофизики СО РАН и Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

e-mail: peter.belobrov@gmail.com

Аннотация. В статье сделан анализ проблемы построения платформы для основных принципов биологии клетки, что дает возможность развивать теоретическую биологию в рамках физической теории живых систем. Предложен метод решения этой проблемы, основанный на введении нечисловых переменных. Этот подход позволяет создавать дополнительные принципы биологии клетки, как-то: постоянного беспокойства, принципы созидания и возникновения нового, измерения состояния клеткой другой клеткой биологическими мерами, зависимости клеточных сигналов от состояния измеряющей клетки. Такой путь представляется перспективным для необходимой формализации всех разделов биологии в единую теорию.

Ключевые слова: нечисловые переменные, фундаментальные биологические константы, состояние живой клетки, биологическое действие, молекулярная книга клетки, измерение клетки клеткой, биологические меры.