

УДК 577.3443; 577.3.08

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ ЛОКАЛИЗАЦИИ ХЛОРИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ И СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ИМИ РЕАКЦИИ ГЕМОСТАЗА

И.И. ХЛУДЕЕВ, И.Е. КРАВЧЕНКО, В.П. ЗОРИН

*Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4а, 220030, Беларусь*

Поступила в редакцию 10 марта 2011

Исследованы особенности процессов связывания в стенке кровеносного сосуда и выведения из нее фотосенсибилизаторов хлоринового ряда, имеющих различия в химической структуре. Изучены процессы фотосенсибилизированного повреждения клеток крови и нарушений микроциркуляции и проанализирована взаимосвязь этих процессов с физико-химическими характеристиками фотосенсибилизаторов. Показано, что при фотодинамическом воздействии наиболее эффективно клетки крови и васкулярная система повреждаются при использовании в качестве фотосенсибилизатора диметилового эфира хлорина еб.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, кровеносная система, эндотелий, лимфоциты, фотодинамическое воздействие.

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) используется в клинической практике как метод лечения некоторых видов онкологических заболеваний, а также ряда других патологий, в том числе связанных с неконтролируемой неоваскуляризацией тканей [1]. Среди механизмов, лежащих в основе терапевтического действия метода ФДТ, важную роль играет фотосенсибилизированное повреждение васкулярной системы. Кровеносная система опухолевых и нормальных тканей является одной из основных мишеней при проведении ФДТ. В результате ее повреждения происходит нарушение снабжения ткани-мишени питательными веществами и кислородом, приводящее к гибели клеток. Поскольку эффективность фотодинамического воздействия в значительной степени определяется локальной концентрацией фотосенсибилизатора (ФС) в зоне светового облучения, очень важными для разработки протоколов ФДТ, целью которой является васкулярная система, являются характеристики накопления ФС в кровеносных сосудах [2]. Отбор и использование ФС, отличающихся высокой селективностью накопления в клетках крови и кровеносных сосудов, является решающим фактором в дальнейшем развитии методов ФДТ. Известно, что физико-химические характеристики сенсibilизаторов (амфифильность, величина и асимметрия распределения заряда молекулы и др.) оказывают влияние на параметры накопления в клетках и тканях животных *in vivo* и *in vitro* [3]. В то же время параметры накопления ФС в кровеносных сосудах исследованы недостаточно. В значительной степени это обусловлено отсутствием методов, позволяющих осуществлять контроль процессов локализации ФС в компонентах кровеносной системы.

В данной работе представлены результаты исследования с помощью оптических методов особенностей локализации в кровеносных сосудах трех ФС, относящихся к производным Хл еб, и процессов сенсibilизации ими фотоповреждения форменных элементов крови и васкулярной системы тканей.

Экспериментальная часть

Для оценки влияния физико-химических свойств ФС на характеристики его накопления в стенке кровеносного сосуда использовали группу производных хлорина еб (Хл еб), включающую Хл еб и диметилловый (ДМЭ) и триметилловый (ТМЭ) эфиры Хл еб, которые имеют сходные спектральные характеристики, но существенно различаются между собой величиной заряда и полярностью молекул. В зависимости от степени полярности производные Хл еб можно условно отнести к умеренно-полярным (Хл еб), умеренно-неполярным (ДМЭ) и неполярным (ТМЭ) соединениям.

Процесс локализации ФС в стенке кровеносного сосуда исследовали с помощью разработанного нами на базе спектрофлуориметра LSF 1211A (СОЛАР, Беларусь) устройства [4], которое позволяет регистрировать изменение интенсивности флуоресценции ФС в образце сонной артерии кролика в условиях *ex vivo*. Накопление ФС в клетках стенки сосуда при ее контакте с окрашенной пигментом сывороткой, а также выведение ФС из клеток стенки сосуда при взаимодействии с неокрашенной сывороткой оценивали в режиме реального времени.

Фотосенсибилизированное повреждение клеток крови исследовали с помощью метода проточной цитофлуориметрии, оценивая жизнеспособность форменных элементов крови (по тесту с пропидиум иодидом) при различной длительности фотодинамического воздействия.

Для изучения фотосенсибилизированного повреждения васкулярной системы было изготовлено устройство, которое состоит из термостатируемой площадки, снабженной фиксаторами для закрепления наркотизированных животных, держателями для световода и инструментария, и системы визуализации. В качестве последней использовался люминесцентный микроскоп ЛЮАМ-ИЗ (ЛМО, Россия), снабженный специализированной цифровой видеокамерой DCM35 (SCORPTEK, China). Объектом исследований служила мышца cremaster muscle самцов крыс – плоская сумкообразная мышца, отличающаяся малой толщиной и развитой системой кровоснабжения. Животное с предварительно препарированной мышцей закрепляли на площадке, установленной на предметном столике микроскопа. Наблюдение проводили в отраженном или в проходящем свете. Изменения интенсивности кровотока в сосудистой системе мышцы при различных дозах светового воздействия анализировали визуально методом интравитальной микроскопии [5].

Результаты и их обсуждение

В экспериментах по исследованию связывания производных Хл еб со стенкой кровеносного сосуда *ex vivo* в режиме реального времени использовалось разработанное нами устройство, позволяющее измерять интенсивность флуоресценции ФС в образце артерии при последовательном прохождении через него порций окрашенной ФС и неокрашенной сыворотки крови. На рис. 1 представлены типичные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции образца сонной артерии в процессе перфузии сыворотки. Анализ данных зависимостей позволяет выделить этап связывания ФС со стенкой артерии (сектор А), который начинается при поступлении в артерию пробы окрашенной сыворотки, сопровождающимся резким увеличением интенсивности флуоресценции образца. Длительность этапа связывания определяется временем прохождения пробы окрашенной сыворотки и пропорциональна ее объему. Затем следует этап вымывания ФС из стенки сосуда (сектор В), во время которого интенсивность флуоресценции падает из-за снижения концентрации сенсibilизатора в образце при прохождении через него большого объема неокрашенной сыворотки. Уровень интенсивности флуоресценции и скорость ее снижения позволяют судить об изменении содержания ФС в стенке артерии. Из представленных данных видно, что при одинаковых условиях эксперимента параметры накопления ФС в стенке артерии сильно зависят от его физико-химических свойств. Так, на этапе связывания интенсивность флуоресценции ДМЭ растет непрерывно и достигает значительно более высокого уровня в сравнении Хл еб, величина сигнала флуоресценции которого после быстрого возрастания в момент поступления окрашенной сыворотки в образец артерии в дальнейшем почти не меняется.

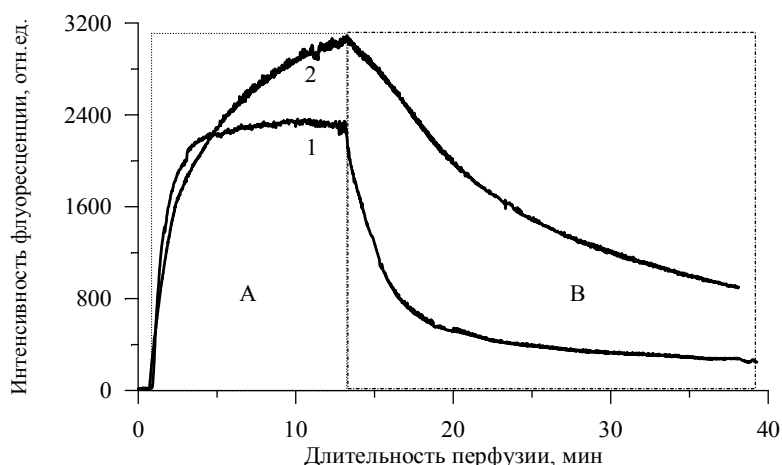


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции Хл еб (1) и ДМЭ (2) в образце артерии при прохождении через него окрашенной (сектор А) и неокрашенной (сектор В) сыворотки

При прохождении через артерию неокрашенной сыворотки (этап вымывания) скорость снижения интенсивности флуоресценции Хл еб в образце артерии существенно выше в сравнении с ДМЭ. Для неполярного пигмента – ТМЭ (данные не приведены) связывание со стенкой артерии при выбранных условиях эксперимента практически отсутствует. Таким образом, умеренно-неполярный ДМЭ по уровню накопления в сосудистой стенке превосходит как неполярный ТМЭ, так и умеренно-полярный Хл еб.

С целью дополнительного сравнения процессов локализации ДМЭ или Хл еб в стенке кровеносного сосуда было проведено флуоресцентно-микроскопическое исследование образцов артерии кролика после контакта с окрашенной ФС сывороткой (рис. 2). Содержание сенсibilизаторов в стенке артерии кролика на различной глубине от внутренней поверхности стенки сосуда (1–0 мкм, 2–4 мкм, 3–8 мкм, 4–12 мкм, 5–16 мкм) оценивали по величине средней интенсивности флуоресценции в полосе 660 нм

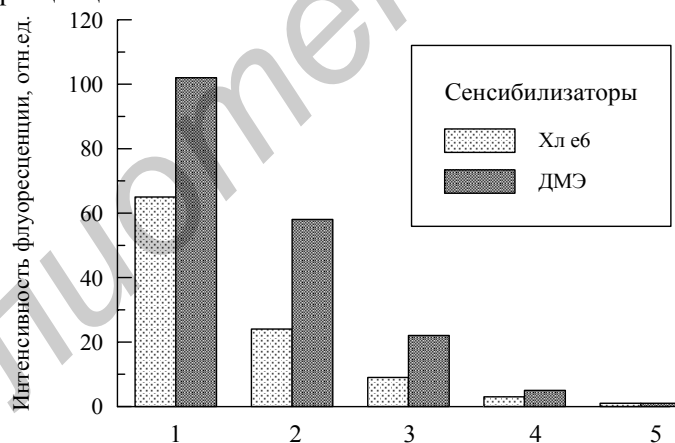


Рис. 2. Влияние структуры сенсibilизатора на его пространственное распределение в стенке артерии

Сканирование внутренней поверхности препарированного образца артерии с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа показало, что более 85 % связанных в стенке сосуда ФС находится в слое, толщина которого не превышает 4 мкм. Поскольку это пространство соответствует расположению монослоя эндотелиоцитов в структуре стенки артерии, можно сделать вывод о том, что исследуемые ФС локализуются преимущественно в эндотелии. Согласно данным флуоресцентной микроскопии, количество связанного в эндотелии ДМЭ почти в два раза превышает этот показатель для Хл еб. Следует отметить, что по характеру распределения в эндотелии исследуемые ФС также различаются, поскольку для Хл еб отмечается преимущественная локализация на поверхности эндотелиального слоя, тогда как значительная часть ДМЭ содержится внутри эндотелиоцитов.

Ранее было показано, что процессы связывания исследуемых ФС различными типами клеток существенно различаются. Производные Хл еб интенсивно окрашивают клетки, но при

малых временах окрашивания Хл еб локализуется в основном на цитоплазматической мембране, тогда как ДМЭ равномерно прокрашивает всю цитоплазму клетки [6]. Скорость диффузионного перераспределения с белков сыворотки на клетки может являться лимитирующим фактором в процессах связывания только для крайне неполярных соединений (ТМЭ), поскольку для Хл еб и ДМЭ характерны сравнительно высокие значения данного показателя. Можно предположить, что основная часть Хл еб связывается на поверхности клеток стенки сосуда, откуда затем может быстро мигрировать на белковые молекулы при прохождении неокрашенной сыворотки. Молекулы ДМЭ быстрее проникают в клетки артериальной стенки, в первую очередь – в эндотелиоциты, и накапливаются в них в значительных количествах. Таким образом, особенности процессов связывания и накопления производных Хл еб в клеточных структурах могут объяснять наблюдаемые отличия в кинетиках связывания-вымывания ФС в кровеносных сосудах.

Относительно высокая скорость диффузионного перераспределения ДМЭ с белков сыворотки и высокая скорость проникновения через плазматическую мембрану позволяют данному ФС при попадании в васкулярную систему накапливаться значительно быстрее и в больших количествах в эндотелии кровеносных сосудов.

Характеристики накопления производных Хл еб в эндотелиоцитах коррелируют с результатами исследования процессов взаимодействия данных ФС с клетками периферической крови человека. В работе [7] показано, что ДМЭ обладает максимальной среди всех производных Хл еб скоростью и уровнем накопления в белых клетках крови.

Различия в параметрах накопления исследованных производных Хл еб могут влиять на эффективность сенсibilизированного ими фотоповреждения компонентов кровеносной системы.

Оценку влияния характеристик биораспределения ФС на фотосенсibilизированное повреждение кровеносных сосудов проводили с помощью разработанного нами устройства для интравитального контроля состояния васкулярной системы при ФДТ. Облучение исследуемого участка cremaster muscle с помощью полупроводникового лазерного модуля начинали через 1 мин после введения раствора Хл еб или ДМЭ в хвостовую вену крысы. Фотовоздействие вели либо на протяжении фиксированного промежутка времени, либо непрерывно до наступления гемостаза. Оценку состояния кровеносной системы проводили визуально, а также посредством анализа полученных видеоизображений. Регистрировали время облучения, необходимое для появления признаков фотоповреждения сосудистой системы различной тяжести: появление отдельных сгустков клеток (тромбов) в кровотоке, прекращение кровотока на отдельных участках кровеносных сосудов вследствие их закупорки, гемостаз облучаемого участка васкулярной системы.

В таблице представлены результаты измерений реакции васкулярной системы cremaster muscle на сенсibilизированное производными Хл еб фотооблучение. В контрольных опытах введение ФС без облучения и фотовоздействие в отсутствие ФС никак не отражалось на состоянии васкулярной системы. Минимальное время развития реакции сосудистой системы на фотодинамическое воздействие наблюдается при использовании в качестве сенсibilизатора ДМЭ. Скорость развития повреждений васкулярной системы при сенсibilизации Хл еб заметно ниже. ТМЭ при используемых условиях эксперимента не вызывал фотоиндуцированных повреждений кровеносной системы.

Дополнительно была проведена серия опытов по дозированному фотовоздействию. В ходе эксперимента световое облучение прекращали в момент времени, когда обнаруживали тромбирование отдельных участков кровеносных сосудов, приводящее к запустеванию примыкающих к ним участков васкулярной системы. Было показано, что динамика реакции кровеносной системы при данных режимах фотовоздействия также зависела от типа используемого ФС. В случае Хл еб прекращение фотовоздействия приводило к восстановлению нормального кровотока, тогда как для ДМЭ процесс развития гемостаза продолжался.

Динамика развития фотосенсибилизированных производными Хл еб повреждений кровеносной системы

Сенсибилизатор	Среднее время появления признаков фотоповреждения, мин		
	отдельные сгустки	тромбирование участков сосудов	гемостаз
Хл еб	21±3	41±4	90±11
ДМЭ	4±1	11±3	28±4
ТМЭ	–	–	–

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании ДМЭ скорость развития фотоиндуцированных нарушений микроциркуляции и степень повреждения васкулярной системы существенно выше в сравнении с Хл еб и ТМЭ.

Реакция васкулярной системы тканей на фотосенсибилизированное воздействие может включать различные механизмы. С помощью электронной микроскопии показано, что кровеносные сосуды опухоли часто переполняются эритроцитами после ФДТ обработки [8]. Предполагается, что одним из механизмов, вызывающих формирование тромбов в кровеносном сосуде, может являться оголение базальной мембраны сосуда в результате сокращения эндотелиоцитов. Контакт с подэндотелиальным коллагеном вызывает адгезию тромбоцитов в месте нарушения целостности эндотелиального слоя. Происходит запуск процессов тромбообразования вследствие выброса тромбоксана из тромбоцитов [9]. Кроме того, при повреждении эндотелия происходит активация фактора Хагемана, выход фактора фон Виллебранда [10], высвобождение тканевых тромбопластинов, в результате чего активируются внутренний и внешний пути свертывания крови, а также выброс в кровь вазоконстрикторных факторов, что приводит к сужению сосудов и усилению тромбоза. Таким образом, скорость протекания процесса тромбообразования может зависеть от степени фотосенсибилизированного повреждения клеток эндотелия. В свою очередь интенсивность повреждения при ФДТ как эндотелиоцитов, так и других клеток крови зависит от физико-химических свойств ФС. В частности, ранее было показано, что ДМЭ характеризуется значительно более высокой фотогемолитической способностью в сравнении с Хл еб и ТМЭ [11]. Фотосенсибилизирующая активность ДМЭ в отношении предварительно выделенных белых клеток крови также значительно выше в сравнении с другими производными Хл еб [12]. Нами было исследовано влияние физико-химических свойств ФС на степень повреждения различных типов форменных элементов крови при фотодинамическом воздействии на цельную кровь. С этой целью с использованием проточного цитофлуориметра FACScan проводили идентификацию популяций лимфоцитов и гранулоцитов, а также определяли число поврежденных клеток по накоплению в них ДНК-специфичного красителя пропидиум йодида.

На рис. 3 приведены результаты исследования процесса фотосенсибилизированного повреждения белых клеток крови при облучении светом лазера образцов цельной крови, окрашенных производными Хл еб. 1, 3 – лимфоциты; 2, 4 – гранулоциты; 1, 2 – сенсибилизатор Хл еб; 3, 4 – сенсибилизатор ДМЭ. Темный фон – измерения сразу после 90 мин облучения лазером (660 нм, 75 мВт), светлый фон – измерения после дополнительной темновой инкубации при температуре 37 °С в течение 45 мин.

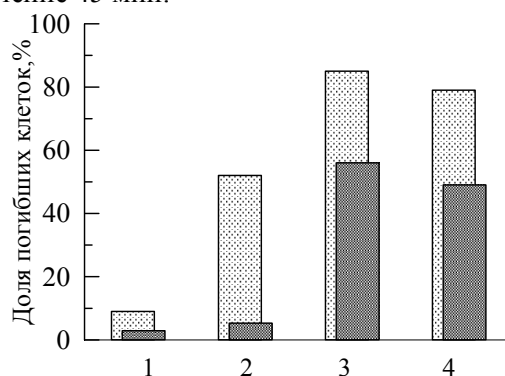


Рис. 3. Сравнение уровней инактивации лимфоцитов и гранулоцитов световым облучением в образцах цельной крови при фотосенсибилизации Хл еб и ДМЭ

Представленные данные показывают, что уровень инактивации как лимфоцитов, так и гранулоцитов был существенно выше при использовании в качестве ФС ДМЭ в сравнении с Хл е6. Причем различия в уровнях инактивации клеток наблюдались как по окончании фотооблучения, так и после дополнительной 45-минутной темновой инкубации. Поскольку, как было показано ранее, уровень накопления в клетках крови ДМЭ в сравнении с Хл е6 в 3-5 раз выше, можно утверждать, что фотосенсибилизированное повреждение клеток кровеносной системы зависит от содержания ФС в клетках. Данный показатель, вероятно, не является единственным фактором, определяющим фоточувствительность клеток, поскольку различия в показателях фотосенсибилизированной ДМЭ инактивации лимфоцитов и гранулоцитов, сильно различающихся уровнями накопления ДМЭ, невелики. Возможно, на летальность сенсибилизированного производными Хл е6 фотовоздействия на клетки влияет не только суммарное содержание ФС, но и места его локализации внутри клетки, подобно тому, как это показано для некоторых ФС [13, 14].

Таким образом, приведенные данные показывают, что повреждение популяций белых клеток в составе цельной крови при ФДТ в значительной мере определяется такими параметрами биораспределения ФС, как уровень накопления и, возможно, места локализации ФС в клетках-мишенях. Параметры биораспределения ФС, в свою очередь, в значительной степени зависят от физико-химических свойств сенсибилизатора.

Заключение

Представленные результаты исследования свидетельствуют о том, что имеется прямая взаимосвязь между характеристиками распределения ФС в кровеносной системе, которые зависят от физико-химических свойств пигментов, и эффективностью сенсибилизированного ими фотоповреждения кровеносных сосудов и клеток крови при ФДТ. Обнаруженные эффекты необходимо учитывать при прогнозировании фармакокинетического поведения ФС в ходе ФДТ.

Разработаны оригинальные методы, позволяющие проводить отбор ФС с заданными свойствами, а также разрабатывать или оптимизировать протоколы их использования для целенаправленного повреждения определенных биологических мишеней, например, сосудистой системы.

Умеренно-неполярный ДМЭ, для которого характерны высокие скорости накопления в компонентах кровеносной системы, демонстрирует максимальную среди исследованных производных Хл е6 эффективность фотоиндуцированного повреждения клеток крови и васкулярной системы. Полученные результаты позволяют утверждать, что ДМЭ может быть использован в качестве более эффективного фотосенсибилизатора для направленного воздействия на васкулярную систему опухоли или при использовании ФДТ для лечения заболеваний, обусловленных неконтролируемой неоваскуляризацией тканей (например, возрастной макулярной дистрофией).

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF PROCESSES OF CHLORINE PHOTOSENSITIZERS LOCALIZATION IN BLOOD VESSELS AND SENSITIZATIONS THEM OF HEMOSTASIS REACTION

I.I. KHLUDEYEV, I.E. KRAVCHENKO, V.P. ZORIN

Abstract

For research of influence of physical and chemical properties of photosensitizers on characteristics of their accumulation in components of blood system the group of chlorin e6 derivatives used. Influence of polarity of a photosensitizer on viability of blood cells at sensitized photodamage and on infringements of microcirculation at photodynamic therapy investigated. It is shown, that at photody-

namic action most effectively blood cells and vascular system are damaged when chlorin e6 dimethyl ether is used as a photosensitizer.

Литература

1. Аветисов С.Э., Будзинская М.В., Киселева Т.Н. и др. // Вестник Российской АМН. 2007. № 8. С.45–47.
2. Chen B., Pogue B.W., Luna J.M. et al. ,Hardman // Abstract Clin Cancer Res. 2006. Vol. 12(3). P. 917–923.
3. Boyle R.W., Dolphin D. // Photochem. Photobiol. 1996. Vol. 63. P. 469–485.
4. Хлудеев И.И., Зорин В.П. // Медэлектроника-2003. Сб. науч. тр. конф. 2003. С. 79–83.
5. Зорин В.П., Хлудеев И.И., Кравченко И.Е. и др. // Веснік ГрДУ імя Янкі Купалы. Сер. 2. 2008. №1(64). С. 25–29.
6. Хлудеев И.И., Савицкий В.П. // Медэлектроника-2008. Сб. науч. тр. конф. 2008. С. 175–180.
7. Савицкий В.П., Зорин В.П. // Биофизика. 2003. Т. 48. Вып. 1. С. 58–62.
8. Peng Q., Nesland J.M. // Ultrastruct Pathol. 2004. Vol. 28. P. 333–340.
9. Fingar V.H., Wieman T.J., Wiehle S.A. et al. // Cancer Res. 1992. Vol. 52. P. 4914–4921.
10. Foster T.H., Primavera M.C., Marder V.J. et al. // Cancer Res. 1991. Vol. 51. P. 3261–3266.
11. Гуринович Г.П., Зорина Т.Е., Зорин В.П. и др. // Биофизика. 1988. Т. 34. С. 314–317.
12. Хлудеев И.И., Савицкий В.П., Зорин В.П. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы междунар. науч. конф., Минск, 2004. С.134–136.
13. Ji Z., Yang G., Vasovic V. et. al. // J Photochem Photobiol B: Biology. 2006. Vol. 84. P. 213–220.
14. Machado A.H.A., Moraes K.C.M., Soares C.P. et al. // Photomedicine and Laser Surgery. 2010. Vol. 28, №1. P. 143–149.