

## БИОФИЗИКА

УДК 616—006.6—073.621.375.826

МИКРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ  
НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ПОРФИРИНОВОГО ТИПА В  
НОРМАЛЬНЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ

З. А. Хуршилова, М. И. Лейкина, Л. Л. Литинская, Е. Б. Черняева

*(кафедра общей физики и волновых процессов)*

В последние годы в терапии рака все большее распространение получают методы фотоннактивации раковых клеток при сенсбилизации красителями порфиринового типа [1—3]. Поскольку цитотоксический эффект после фотоактивации зависит от внутриклеточной концентрации сенсбилизатора, решающим фактором при таком подходе становится преимущественное накопление порфиринов в раковых клетках. Так, отношение концентраций одного из наиболее распространенных сенсбилизаторов — производной гематопорфирина — в нормальной и опухолевой тканях организма через сутки после инъекции составляет 1:5 [4]. Причины преимущественного концентрирования порфиринов в опухолевых тканях до сих пор не выяснены.

Целью данной работы является флуориметрическое исследование накопления одного из порфиринов — гематопорфирина (ГП) — в единичных интактных клетках нормальных и раковых культивируемых линий при одновременном контроле физиологического состояния клеток по их морфологии и флуоресцентно определяемой величине внутриклеточного рН ( $pH_k$ ).

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования были выбраны монослойные культуры клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ и опухоли шейки матки *HeLa*, культивировавшиеся на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах по стандартной методике [5].

Сенсбилизатором служил ГП фирмы «Serva», который растворяли в 1%-ном NaOH с последующей нейтрализацией 1%-ной HCl до рН=7,2. Добавлением дистиллированной воды раствор доводили до исходной концентрации  $10^{-2}$  М. Концентрация ГП при работе с клетками составляла  $10^{-4}$  М и достигалась разведением исходного раствора в среде 199 (без добавления сыворотки). О количестве накопленного клетками ГП судили по интенсивности его флуоресценции внутри клеток (по сравнению со свечением фона).

Интенсивность свечения клеток измерялась на установке, состоящей из люминесцентного микроскопа МЛ-2 с микрофотометрической насадкой ФМЭЛ-1 и цифровым вольтметром Ф2000/1 [6]. Возбуждение флуоресценции производилось лампой КГМ-9-70 в области 340—450 нм. Свет флуоресценции ГП регистрировался в области 620 нм с участка препарата диаметром 16,5 мкм. Клетки, предварительно отмывые от сыворотки, инкубировались в среде 199 с ГП при комнатной температуре в темноте. Через определенное время клетки отмывали от ГП и измеряли интенсивность флуоресценции не менее чем 20 окрашенных клеток.

Для определения  $pH_k$  использовали флуоресцендиацетат, добавляя его в среду культивирования клеток в концентрации  $10^{-6}$  М. Продукт внутриклеточного гидролиза флуоресцендиацетата представляет собой рН-индикатор флуоресценции. Величину  $pH_k$  определяли по отношению интенсивностей свечения флуоресценции на двух длинах волн (518 и 570 нм) при возбуждении в области 460 нм. Методика измерения  $pH_k$  и конструкция измерительной камеры подробно описаны в работе [6].

Измерение  $pH_k$  в условиях данного эксперимента производили после оценки интенсивности свечения клеток, нагруженных ГП. Однако наличие в клетках ГП не влияло на точность рН-метрии, так как предварительно было установлено, что флуоресценция ГП в используемых для флуоресценции длинах волн возбуждения и регистрации свечения практически отсутствует.

Для оценки влияния ГП на морфологию клеток препараты после предварительной инкубации с ГП фиксировались в 96%-ном этаноле и окрашивались гематоксилином Караччи. Структуру клеток наблюдали визуально в световом микроскопе при освещении препарата в условиях, аналогичных регистрации свечения клеток с ГП.

**Результаты и обсуждение.** Динамика накопления ГП клетками культур СПЭВ и *HeLa* представлена на рис. 1. Поскольку клетки этих линий не принадлежат одному организму и органу, то эти данные, безусловно, не могут дать величины се-

лективности накопления ГП в раковых и нормальных клетках. Однако значительно большая скорость накопления и конечная концентрация внутриклеточного ГП в клетках *HeLa* обусловлены, по-видимому, раковым происхождением последних. Наибольший интерес представляет соотношение стадии накопления ГП с его пространственным распределением в клетке. Забегая вперед, отметим, что никакого качественного различия внутриклеточного распределения ГП для клеток СПЭВ и *HeLa* обнаружено не было.

Визуальные наблюдения показали, что в течение первого часа инкубации окрашены только плазматические мембраны клеток. С увеличением времени инкубации интенсивность свечения мембран увеличивается и через 2–3 ч на препарате видны ярко светящиеся

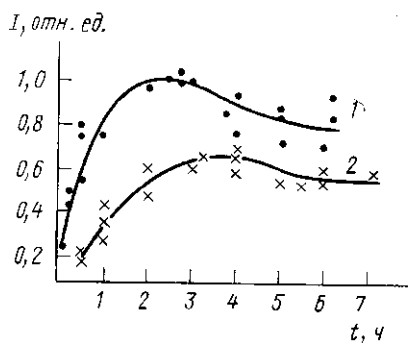


Рис. 1. Зависимость средней интенсивности флуоресценции насыщенных ГП клеток от времени инкубации: для культуры *HeLa* (1) и для культуры СПЭВ (2)

островки клеток с интенсивно окрашенными плазматическими мембранами. В то же время, однако, уже появляются клетки, у которых прокрашена и цитоплазма (рис. 2). В этом случае ядро остается темным, а мембрана и цитоплазма по яркости оказываются неразличимыми. Число таких клеток увеличивается со временем инкубации.

Морфологическая оценка влияния накопления ГП на состояние клеток показала, что инкубация в среде 199 с ГП в темноте не вызывает структурных изменений клеток для всех выбранных времен инкубации. В то же время даже кратковременное световое воздействие после инкубации с ГП приводит к просветлению и сильной вакуолизации периферии клеток, цитоплазма располагается преимущественно вокруг ядра, клетки плотно контактируют друг с другом, плазматическая мембрана четко прокрашивается. Величина  $pH_K$  для клеток СПЭВ в норме составляла в среднем  $6,9 \pm 0,21$  ед., а для клеток *HeLa*  $6,55 \pm 0,15$  ед. Добавление в среду инкубации ГП приводило к быстрому снижению  $pH_K$  в среднем на 0,21 ед. как для клеток СПЭВ, так и для клеток *HeLa*. Инкубация клеток обоих типов с ГП в темноте вплоть до 7 ч не вызывала дальнейшего изменения величины  $pH_K$ .

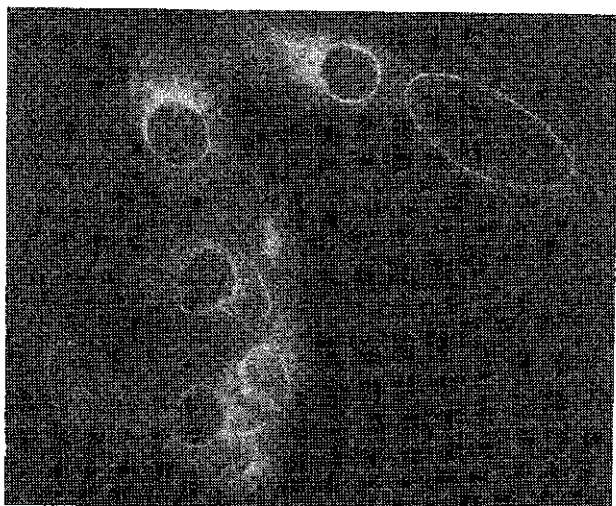


Рис. 2. Микрофотография флуоресценции клеток культуры СПЭВ после инкубации в ГП в течение 3 ч

Для выяснения возможного влияния  $pH_K$  на накопление клетками ГП измеряли уровень накопления ГП в клетках культуры СПЭВ при уменьшении  $pH_K$  до  $6,1 \pm 0,19$  ед. с помощью 0,1 М фосфат-фосфатного буфера соответствующего рН. В этих условиях после 1 ч инкубации с ГП интенсивность флуоресценции клеток в 3 раза превышала таковую для обычных препаратов. Если учесть, что квантовый выход флуоресценции ГП в кислой области существенно меньше, чем в щелочной [7], то различие концентрации ГП в клетках при разных  $pH_K$  окажется, по-видимому, еще значительнее. Это позволяет предположить, что одной из возможных причин преимущественного накопления порфиринов опухолевыми клетками является более низкая величина внутриклеточного рН в этих клетках по сравнению с нор-

мальными [8]. Поэтому совместное воздействие ГП с агентами, вызывающими локальное закисление клеток опухоли, вероятно, позволит повысить эффективность фотодинамической терапии.

Таким образом, показано, что длительная инкубация клеток с ГП не влияет на их морфологию и вызывает лишь незначительное снижение внутриклеточного рН. Цитотоксический эффект выражен только при совместном воздействии ГП и света. Скорость накопления ГП и его конечная концентрация в злокачественных клетках выше, чем в нормальных. Снижение величины внутриклеточного рН приводит к увеличению концентрации ГП в клетках, что, возможно, и является одной из причин селективного накопления порфиринов в злокачественных клетках.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Dougherty T. J. // CRC Crit. Rev. Oncol. Hematol. 1984. 2. P. 83—116.  
 [2] Kessel D. // Photochem. Photobiol. 1984. 39, N 6. P. 851—859. [3] Камалов В. Ф. и др. // Квант. электроника. 1985. 12, № 10. С. 1997—2023. [4] Dorschio F. et al. // Lasers in surgery and med. 1982. 2. P. 21. [5] Eidus et al. // Studia Biophysica. 1977. 62. P. 85. [6] Литинская Л. Л. и др. // Деп. ВИНТИ. 1984. № 5267—84. [7] Камалов В. Ф. и др. // Тез. докл. XII Всесоюз. конф. по когерент. и нелинейн. оптике. М. 1985. С. 78. [8] Осинский С. П., Бубновская Л. Н. // Онкология. 1979. № 4. С. 33—40.

Поступила в редакцию  
11.10.85

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1986. Т. 27, № 5

## ФИЗИКА ТВЕРДОГО ТЕЛА

УДК 621.315.592

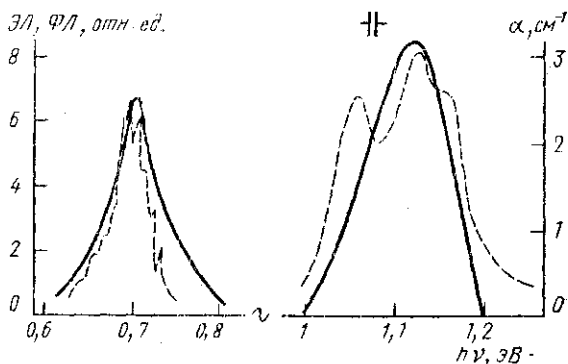
### ПРИМЕСНАЯ ЭЛЕКТРОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ GaAs, ЛЕГИРОВАННОГО V

В. С. Вавилов, В. А. Морозова, О. В. Рычкова

(кафедра физики полупроводников)

При исследовании спектров электропоглощения полуизолирующего *n*-GaAs, легированного ванадием, в области температур 80—300 К обнаружена примесная электролюминесценция (ЭЛ) значительной амплитуды. Образцы формы параллелепипеда с размерами  $\sim 1 \times 2 \times 7$  мм помещались в переменное поле плоского конденсатора и были изолированы от его пластин диэлектрическими прокладками. Излучение, вышедшее из кристата (окна пропускали  $h\nu \geq 0,5$  эВ), регистрировалось с помощью PbS-фотосопротивления; для измерения использовалась обычная методика фазового детектирования. Излучение возникало при напряженности поля в образце  $E > 7 \cdot 10^3$  В/см, его интенсивность заметно возрастала с увеличением  $E$  и  $T$ . ЭЛ регистрируется на второй гармонике и в области 100—700 Гц не зависит от частоты. С помощью монохроматоров УМ-2 и ИКС-21 были записаны спектры ЭЛ. На рисунке приведен один из них для

$E = 2,3 \cdot 10^4$  В/см и 80 К (сплошные линии). Видно, что ЭЛ наблюдается в двух областях спектра:  $h\nu \sim 0,7$  и  $\sim 1,1$  эВ. Здесь же штриховыми линиями обозначены спектр поглощения  $\alpha(h\nu)$  данного образца при 80 К и спектр фотолюминесценции (ФЛ) ана-



Спектры ЭЛ GaAs:V при  $E = 2,3 \cdot 10^4$  В/см и 80 К (сплошные линии). Штриховые линии — спектр ФЛ при 6 К из [1] и спектр  $\alpha(h\nu)$  при 80 К

логичного материала при 6 К, взятый из работы [1]. Подобные спектры  $\alpha(h\nu)$  с характерной только для атомов V резонансной структурой, состоящей из трех сравнительно широких перекрывающихся полос, на-