[6] Ляшко О. М., Куцак А. А.//Журн. прикл. спектр. 1981. 34. С. 1001. [7] Капралова О. Н., Капцов Л. Н.//Квант. электроника. 1984. 11. С. 1674. [8] Ханин Я. И. Динамика квантовых генераторов. М., 1975. [9] Голяев Ю. Д., Лантратов С. В.//Квант. электроника. 1974. 1. С. 2187.

Поступила в редакцию 06.07.88

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 3, ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ. 1989. Т. 30, № 6

УДК 577.3+535.372

МЕХАНИЗМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА Порфиринового типа с липидным бислоем клеточной мембраны: математическая модель и флуоресцентная спектроскопия

Н. В. Степанова, Е. Б. Черняева

(кафедра общей физики и волновых процессов)

Исследована модель динамики внутриклеточного накопления гематопорфирина (ГП) — фотосенсибилизатора, используемого в фотодинамической терапии рака. Предложен метод определения константы взаимодействия ГП с липидами с помощью анализа спектров флуоресценции ГП в суспензии липосом.

Проблемы фотодинамического воздействия на биологические объекты вызывают в последние годы повышенный интерес у широкого круга специалистов в связи с интенсивно развивающимся методом леонкологических заболеваний — фотодинамической чения терапией $(\Phi Д T)$ [1-4]. Суть метода состоит во введении в организм фотосенсибилизатора, обладающего способностью селективно накапливаться в тканях опухоли. Последующее световое облучение пораженных участков вызывает в клетках фотохимическую реакцию, приводящую к инактивации преимущественно опухолевых клеток. Исследования показывают, что наиболее часто используемые в ФДТ сенсибилизаторы гематопорфирин (ГП) и его производные — локализуются главным образом в плазматической мембране клеток и мембранах внутриклеточных органелл. В данной работе предложена и исследована гипотетическая физическая модель, позволяющая оценить скорость и интенсивность накопления гидрофобного фотосенсибилизатора в живых клетках, а также предложен неразрушающий метод изучения распределения ГП между водной и липидной фазами, основанный на численном анализе спектра флуоресценции ГП в суспензии липосом.

Рассмотрим механизм накопления ГП в клетках. Для проникновения внутрь живой клетки молекулы гидрофобного красителя должны прежде всего преодолеть внешнюю цитоплазматическую мембрану. представляющую собой липидный бислой, в который включены отдельные молекулы белка (рис. 1, а). Наружные части мембраны — полярные «головки» липидов — гидрофильны, внутренняя часть, состоящая из длинных углеводородных цепей жирных кислот, гидрофобна. ГП хорошо растворим во внутреннем слое мембраны, однако для преодоления слоя липидных головок и их гидратных оболочек молекулы красителя должны обладать определенной энергией активации AG^* (рис. 1, б). Внутри мембраны молекулы ГП попадают в «потенциальную яму», глубина которой ΔG_m зависит от различия растворимостей красителя в водной и липидной фазах и может быть оценена из условия равновесия химических потенциалов на границе двух фаз [5]: $\Delta G_m = RT \ln (C_l/C_a) = RT \ln b$, где C_l и C_a — концентрации вещества в липидной и водной фазах, а их отношение *b* — коэффициент распределения ГП между липидом и водой. Отметим здесь, что в модели внешняя среда и цитоплазма клетки считаются водной фазой, т. е. энергетически идентичны.





Рис. 2

Рис. 1. Цитоплазматическая клеточная мембрана: а — схематическое изображение липидного бислоя, б — энергетические потенциалы на границах мембраны: 1 — внешняя среда, 2 — мембрана, 3 — цитоплазма клетки, 4 — липидные головки, 5 — цепи жирных кислот, 6 — белки

Рис. 2. Схематическая компартментальная модель культивируемых клеток. Объем среды $V_1 = 10^{-6}$ м³, объем мембраны одной клетки $V_2 = 10^{-18}$ м³, объем цитоплазмы клетки $V_3 = 2,5 \cdot 10^{-16}$ м³, число культивируемых клеток в объеме $V_1 - n \approx \approx 10^5$



Рис. 1

Для расчета кинетики накопления фотосенсибилизатора в мембране и цитоплазме клетки оценим сначала характерные диффузионные времена для ГП в этих объектах. В таблице приведены коэффи-

Компартмент	η, H∙c/м²	D, м²/с	х, м	$\tau_D = \frac{x^2}{D}, c$	т _{эксп} , с
Мембрана Цитоплазма	$3 \cdot 10^{-1}$ 10^{-3}	${}^{0,8\cdot10^{-12}}_{2,5\cdot10^{-10}}$	10-8 10-5	0,6·10 ⁻⁴ 2·10 ⁻¹	$10-100 \\ 10^3$

Коэффициенты диффузии для ГП рассчитаны по формуле Стокса по известным коэффициентам вязкости для воды (цитоплазма) и оливкового масла (мембрана).

циенты вязкости η и диффузии *D*, характерные размеры *x* и время $\tau_D = x^2/D$. В последней графе помещены экспериментально измеренные нами ранее времена накопления ГП в культурах клеток *HeLa* и СПЭВ [6]. Из данных таблицы следует, что диффузионные времена на несколько порядков меньше экспериментально наблюдаемых, т. е. можно предположить, что определяющую роль в динамике накопления нейтрального красителя в клетке играют не процессы диффузии.

а скорость преодоления активационных барьеров на границах липидного бислоя.

Рассмотрим конкретную задачу накопления ГП в культивируемых клетках. В наших экспериментах [6] клетки находились на покровном стекле в виде монослоя и омывались питательной средой, объем которой во много раз превышал суммарный объем клеток. В этом случае можно рассматривать среду (1), плазматическую мембрану (2) и цитоплазму клеток (3) в виде отдельных компартментов с объемами V_i (i=1, 2, 3) и решать задачу перехода молекул красителя через границы областей в условиях полного перемешивания в пределах каждого компартмента (рис. 2).

Пусть N_i — число молекул ГП в компартментах, $C_i = N_i/V_i$ — соответствующие концентрации, n — общее число клеток в среде. Уравнения баланса для молекул ГП можно записать тогда в следующем виде:

$$\frac{dN_1}{dt} = -nk_1N_1 + nk_2N_2, \qquad k_1 = \frac{A}{V_1} \exp\left\{-\frac{\Delta G^*}{RT}\right\},$$

$$\frac{dN_2}{dt} = -2k_2N_2 + k_1N_1 + k_3N_3, \qquad k_2 = k_1\frac{V_1}{V_2} \exp\left\{-\frac{\Delta G_m}{RT}\right\}, \qquad (1)$$

$$\frac{dN_3}{dt} = -k_3N_3 + k_2N_2, \qquad k_3 = k_1\frac{V_1}{V_3}, \quad A = \text{const.}$$

В системе (1) учтено, что скорость убыли молекул из *i*-го компартмента пропорциональна концентрации C_i , а константа k_i определяется высотой соответствующего барьера (см. рис. 1). Перейдем от N_i к концентрациям и запишем начальные условия задачи:

$$\frac{dC_1}{dt} = -k\left(C_1 - \frac{C_2}{b}\right), \qquad k = k_1 n, \qquad C_1(0) = C_0,$$

$$\varepsilon_2 \frac{dC_2}{dt} = -k\left(2\frac{C_2}{b} - C_1 - C_3\right), \qquad \varepsilon_2 = \frac{nV_2}{V_1}, \qquad C_2(0) = 0, \qquad (2)$$

$$\varepsilon_3 \frac{dC_3}{dt} = -k\left(C_3 - \frac{C_2}{b}\right), \qquad \varepsilon_3 = \frac{nV_3}{V_1}, \qquad C_3(0) = 0.$$

Множители ε_i представляют собой отношения суммарных объемов наружных мембран всех клеток и цитоплазмы к объему сосуда, в котором происходит культивирование, V_1 . В нашем случае (см. рис. 2) $\varepsilon_2 \simeq 10^{-7}$, $\varepsilon_3 \simeq 10^{-5}$.

Наличие малых параметров перед производными позволяет решать систему (2) приближенно, пользуясь теоремой Тихонова (см. [7]):

$$C_1 \approx C_0, \quad C_3(t) \approx C_0(1 - \exp\{-\lambda_3 t\}), \quad \lambda_3 = k/2\varepsilon_3,$$

$$C_2(t) \approx C_0 b \left(1 - (1/2) \left(\exp\{-\lambda_3 t\} + \exp\{-\lambda_2 t\}\right)\right), \quad \lambda_2 = 2k/\varepsilon_2.$$
(3)

Таким образом, в исследуемой динамической задаче мы получили два характерных времени накопления красителя: $\tau_3 = \lambda_3^{-1}$ — в клетке и $\tau_2 = \lambda_2^{-1}$ — в наружной мембране. Отношение $\tau_2/\tau_3 = \varepsilon_2 b/4\varepsilon_3$ мало, если b — константа распределения ГП между липидной и водной фазами — не превышает нескольких десятков (см. ниже). Отметим, что кинетика накопления красителя в мембране $C_2(t)$ носит ярко выраженный двухфазный характер: сначала идет быстрое увеличение концентрации до половины максимального значения, затем накопление

красителя в мембране идет с той же скоростью, что и в клетке. Такая двухфазная кинетика была замечена и экспериментально [8].

Оценим теперь стационарные значения внутриклеточных концентраций ГП. Согласно решениям (3), при $t \rightarrow \infty$ в наружной мембране клетки установится концентрация красителя $C_2 = bC_0$, а в цитоплазме $C_3 = C_0$, при этом в исследованной модели предполагалось, что цитоплазма является однородной водной фазой. Однако внутри клетки имеется также и липидная фаза, например в виде мембран различных органелл, с которой будет стремиться соединиться гидрофобный краситель. Это приведет к обеднению водной фазы цитоплазмы и, следовательно, к добавочному потоку красителя из внешней среды внутры клетки. Таким образом, при $t\gg\tau_3$ внутри клетки установится значение концентрации ГП в водной фазе $C_a = C_0$ и в липидной фазе $C_1 = bC_0$. Так как объемная доля липида в клетке $\gamma \ll 1^*$, то средняя концентрация красителя в клетке составит

$$\overline{C} = C_1(1-\gamma) + C_a \gamma = C_0((1-\gamma) + b\gamma) \approx C_0(1+b\gamma).$$
(4)

Для численных оценок концентрации ГП в клетке необходимо определить константу b — коэффициент распределения ГП между водной и липидной фазами, например из исследований взаимодействия ГП с липосомами. Так, авторам работы [9] удалось измерить константу связывания ГП с однослойными липосомами из фосфатидилхолина (ФХ). Однако предложенная ими методика определения константы представляет собой трудоемкую процедуру, требующую разрушения объекта исследования.

Ниже предлагается метод неразрушающего контроля распределения ГП между водной и липидной фазами в режиме реального времени. Метод основан на численном разложении спектра флуоресценции ГП в суспензии липосом на отдельные компоненты с помощью ЭВМ.

Суспензии однослойных липосом в 0,1 М растворе трис-буфера изготавливались по стандартной методике с помощью обработки ультразвуком водно-липидной смеси из ФХ. Использовался ГП фирмы Serva 85%-ной чистоты. Штоковый раствор ГП (10⁻² М) приготавливался растворением в 1% NaOH с последующей нейтрализацией 1% HCl до рН 7,2. Спектры испускания и возбуждения флуоресценции измерялись на спектрофлуориметре Aminco—Bowman.

Спектры флуоресценции ГП в водных растворах характеризуются полосами с максимумами на 613—615 и 675—677 нм, а в органических растворителях, например в метаноле, положение полос сдвигается на 620—625 и 690—695 нм. Аналогичные изменения наблюдаются и при переходе ГП в липидное окружение [10].

На рис. 3, *а* приведены полученные нами спектры флуоресценции ГП в суспензии однослойных ФХ липосом при изменении молярного отношения липид/порфирин *p*. Видно появление полосы на 630 нм, интенсивность которой растет с увеличением *p*, при этом интенсивность полосы на 613 нм уменьшается. Аналогичная картина наблюдается и в области длин волн 675—690 нм. При связывании с липидом изменяется также спектр возбуждения флуоресценции ГП (рис. 3, б). Поэтому, варьируя длину волны возбуждения, можно изменять относительные вклады флуоресценции ГП, находящегося в водной и липидной фазах. Количественное определение относительных вкладов можно получить, разложив спектры флуоресценции ГП в суспензии липосом на

^{*} Согласно [5], липиды составляют 5% объема клетки.



Рис. 3. Спектры флуоресценции ГП в суспензии липосом: a — спектры испускания при различных молярных отношениях липид/порфирин: p=3 (1), 15 (2) и 80 (3); δ — спектры возбуждения ГП: 1 — в водном растворе, λ_{Φ} =612 нм, 2 — в суспензии липосом, λ_{Φ} =620 нм



Рис. 4. Разложение спектра флуоресценции ГП в суспензии липосом на две составляющие при концентрации ГП в водной фазе $\sim 10^{-6}$ М, p=100 и длине волны возбуждения $\lambda_{\rm B}$ =400 (a) и 420 нм (б): суммарный спектр (1), компонента, соответствующая ГП в водной (2) и липидной (3) фазах

отдельные компоненты по методу Аленцева [11], основанному на следующих предположениях: 1) спектр представляет собой сумму непересекающихся полос, 2) для одного и того же объекта возможно получение спектров с различными вкладами отдельных компонент.

На рис. 4 приведены примеры разложения спектров флуоресценции ГП в суспензии липосом при концентрации ГП в растворе ~ 10^{-6} М и p=100. В результате разложения выделены две полосы. Одна полоса имеет максимум на длине волны 612 ± 1 нм. Это соответствует положению максимума флуоресценции ГП в водном растворе. Вторая полоса (629 ± 1 нм) соответствует флуоресценции ГП в липидной фазе. Используем результаты этого разложения для оценки константы распределения ГП между водной и липидной фазами.

Интенсивность флуоресценции раствора некоторого вещества на длине волны λ_φ при возбуждении на λ_в в условиях малой оптической плотности раствора можно выразить следующим образом:

$$I_{\lambda_{\rm B}}^{\lambda_{\rm \Phi}} = \widetilde{I}_{\lambda_{\rm B}} \beta^{\lambda_{\rm \Phi}} \sigma_{\lambda_{\rm B}} C \cdot d \, \frac{\lambda_{\rm B}}{\lambda_{\rm \Phi}} \,, \tag{5}$$

где $\tilde{I}_{\lambda_{\rm B}}$ — интенсивность \tilde{z} возбуждающего излучения на $\lambda_{\rm B}$, $\beta^{\lambda_{\rm B}}$ — квантовый выход флуоресценции, σ — сечение поглощения, C — концентрация молекул вещества, d — оптический путь в растворе.

В условиях эксперимента ГП распределен между водной фазой и липосомами. Обозначив, как и ранее, величины, входящие в формулу (5), соответствующими индексами: «l» — для ГП в липидной фазе и: «a» — для ГП, находящегося в водной фазе, найдем отношение интенсивностей флуоресценции на длине волны λ_{Φ} =612 нм (максимум излучения водного раствора) к флуоресценции на длине волны λ_{Φ} =629 нм (максимум излучения ГП, растворенного в липиде) при возбуждении, например, на λ_{B} =400 нм:

$$a_{400} = \frac{I_{400}^{612}}{I_{400}^{629}} = \frac{\beta_a^{612} \sigma_{a,400} d_a C_\sigma}{\beta_l^{629} \sigma_{l,400} d_l C_l} \quad \frac{629}{612} \approx 2.$$
(6)

Величина a_{400} оценена из результатов разложения спектра флуоресценции ГП в суспензии липосом на составляющие компоненты (рис. 4, *a*). Отношение оптических путей в липидной и водной фазах в условиях эксперимента при концентрации липида 10^{-4} M составляет $d_l/d_a \simeq 6 \cdot 10^{-5}$, отношения констант поглощения и квантовых выходов σ_a/σ_t и β_a/β_t необходимо определить из независимых экспериментов, после чего можно будет вычислить интересующее нас отношение

$$b = \frac{C_l}{C_a} = \frac{\beta_a^{612}}{\beta_l^{629}} \frac{\sigma_{a,400}}{\sigma_{l,400}} \cdot 0,5 \cdot 10^4.$$
(7)

Наличие большого множителя в числителе позволяет предположить, что константа b значительно превышает единицу. Возвращаясь к задаче нахождения концентрации красителя внутри живой клетки, можно, согласно формуле (4), ожидать существенного превышения концентрации ГП в клетке относительно окружающей среды за счет взаимодействия его с внутриклеточными липидами.

Отметим еще одну возможную причину концентрирования красителя в клетке, связанную с наличием в водном растворе различных ионных форм ГП, относительная концентрация которых определяется кислотностью раствора. Суммарную концентрацию ГП можно выразить «через концентрацию С⁰ нейтральной формы и концентрацию ионов [][H+]:

$$C_{\Sigma} = C^{0} \left(1 + \frac{K_{1}}{[H^{+}]} + \frac{K_{1}K_{2}}{[H^{+}]^{2}} \right); \quad pK_{1} = 5, \ pK_{2} = 5, 5.$$
(8)

Константы протонирования для ГП взяты из работы [12]. Из формулы (8) следует, что в предположении проникновения через заряженную мембрану только нейтральной формы внутриклеточная концентрация C_{Σ} будет выше, чем наружная, если рН клетки выше, чем рН среды.

Сформулируем итоги проведенного исследования взаимодействия ГП с липидными мембранами клетки и липосомами.

1. С помощью кинетической модели определено отношение времен знакопления ГП в клеточных мембранах и цитоплазме клетки, а также оценены стационарные концентрации ГП в этих структурах, зависязцие от относительной доли липидов в клетке, коэффициента распределения красителя между липидной и водной фазами и соотношения внутриклеточного и наружного pH.

2. Предложен метод неповреждающего определения распределения ГП между водной и липидной фазами, основанный на численном анализе спектров флуоресценции ГП в гетерогенных системах в режиме реального времени.

С точки зрения развиваемых в работе концепций преимущественное накопление красителя в опухолевых тканях может быть связано с изменением липидного состава и свойств мембран клеток при их малигнизации, а также с изменением соотношения внутри- и внеклетоного pH.

Авторы признательны сотрудникам МИХТ им. М. В. Ломоносова проф. А. Ф. Миронову и канд. хим. наук В. Д. Румянцевой за любезное предоставление суспензии липосом, а также И. В. Кокуевой за участие в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Dougherty T. J., Kaufman J. E., Goldfarb A. et al.//Cancer Res. 1978.
36. Р. 2628. [2] Dougherty T. J.//Photochem. Photobiol. 1987. 45. Р. 879. [3] Камалов В. Ф., Степанова Н. В., Черняева Е. Б., Чикишев А. Ю.//Квант. электроника. 1985. 12. С. 1997. [4] Кеѕѕеl D.//Photochem. Photobiol. 1984. 39. Р. 851. [5] Кагава Я. Биомембраны. М., 1985. [6] Хуршилова З. А., Лейкина М. И., Литинская Л. Л., Черняева Е. Б.//Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 1986. 27, № 5. С. 79. [7] Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическое моделирование в биофизике. М., 1975. [8] Во́пmer R. М., Morstin G.//Cancer Res. 1985. 45. Р. 5328. [9] Margalit R., Cohen S.//Biochim. et Biophys. Acta. 1983. 736, N 2. Р. 163. [10] Ehrenberg Br., Malik Z., Nitzan Y.//Photochem. Photobiol. 1985. 41. Р. 429. [11] Фок М. В.//Журн. прикл. спектр. 1969. 11, № 5. С. 926. [12] Brault D., Vever-Bizet Ch., Le Doan T.//Biochim. et Biophys. Acta. 1986. 857. Р. 238.

Поступила в редакцию 07.07.88