

Генина Э.А.

**МЕТОДЫ БИОФОТОНИКИ:
ФОТОТЕРАПИЯ**

Учебное пособие

САРАТОВ
«НОВЫЙ ВЕТЕР»
2012

УДК [577.345:615.831](075.8)
ББК 28.707.1я73
Г34

Г34 Генина Э.А. **Методы биофотоники: Фототерапия.** – Саратов: Новый ветер,
2012. – 119 с.: ил.
ISBN 978-5-98116-149-0

Настоящее учебное пособие предназначено для расширения и углубления знаний студентов по вопросам действия света на биологические системы; изучения фундаментальных основ фотобиологических процессов и механизма фотодинамических реакций в биологических системах и разработанных на их основе методов фототерапии.

Для студентов, обучающихся по специальностям «Медицинская физика», профилям «Биофизика» и «Медицинская фотоника» направления 011200 «Физика».

Рекомендуют к печати:

Кафедра оптики и биофотоники
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»;
доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»,
научный сотрудник НОЦ фундаментальной медицины и нанотехнологий ГБОУ ВПО
«Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Г.С. Терентюк;
кандидат медицинских наук, доцент кафедры ботаники и экологии ФГБОУ ВПО «Сара-
товский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»
О.В. Ульянова

**Издание осуществлено при поддержке
федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры
инновационной России на 2009-2013 годы»
(государственный контракт № 02.740.11.0879)**

УДК [577.345:615.831](075.8)
ББК 28.707.1я73

ISBN 978-5-98116-149-0

© Генина Э.А., 2012

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ФОТОМЕДИЦИНЫ.....	5
2. ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ.....	11
2.1. Понятие фотобиологического процесса.....	11
2.2. Внутримолекулярные и межмолекулярные процессы переноса энергии	15
2.3. Спектр фотобиологического действия.....	19
3. МЕХАНИЗМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ РЕАКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ.....	27
3.1. Понятие фотосенсибилизатора.....	27
3.2. Кислороднезависимые фотосенсибилизированные реакции.....	28
3.3. Кислородзависимые фотосенсибилизированные реакции.....	31
3.4. Синглетный кислород и другие активные формы кислорода.....	32
3.5. Кинетический анализ реакций фотосенсибилизированного окисления..	39
3.6. Классификация реакций фотосенсибилизированного окисления.....	41
4. ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КОЖЕ.....	43
4.1. Эритема.....	43
4.2. Пигментация кожи.....	44
4.2.1. Непрямая пигментация (загар).....	44
4.2.2. Прямая (немедленная) пигментация.....	46
4.3. Синтез витамина D ₃	47
4.4. Фотоканцерогенез.....	51
4.5. Фотоаллергия и фотоиммуносупрессия.....	52
5. МЕТОДЫ ФОТОТЕРАПИИ.....	55
5.1. Псораленовая фотохимиотерапия (ПУФА-терапия).....	55
5.2. Фототерапия желтухи новорожденных.....	60
5.3. Низкоинтенсивная лазерная терапия.....	64
5.3.1. Особенности взаимодействия лазерного излучения с биотканями...	64
5.3.2. Возможные механизмы биологического действия низкоинтенсивных лазеров.....	65
5.4. Другие методы фототерапии.....	73
6. ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ.....	75
6.1. Основы фотодинамической терапии.....	75

6.2.	Фотосенсибилизаторы.....	80
6.2.1.	<i>Свойства фотосенсибилизаторов.....</i>	80
6.2.2.	<i>Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов.....</i>	96
6.2.3.	<i>Направленная доставка фотосенсибилизаторов.....</i>	100
6.3.	Клеточные механизмы фотодинамической терапии.....	105
6.3.1.	<i>Фотодинамическое воздействие на клеточные структуры.....</i>	105
6.3.2.	<i>Реакции клеток на внешние воздействия.....</i>	108
6.3.3.	<i>Смерть клеток при фотодинамическом воздействии.....</i>	114
7.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
8.	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

1. ВВЕДЕНИЕ. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ФОТОМЕДИЦИНЫ

Традиционно считается, что фотомедицина начала развиваться только в последнее десятилетие 20 века. Между тем, это не так. Просто бурный всплеск в других медицинских областях в начале 20 века отвлек внимание ученых от фотомедицины. А ведь еще издревле, как простые люди, так и великие доктора, — Гиппократ (Hippocrates), Авиценна (Avicenna), Гален (Galenus) — прекрасно знали о целебных свойствах солнечного цвета. Знали и противопоказания: “на слишком высоком солнце нельзя долго находиться”.

Фототерапия зародилась примерно 4 тыс. лет назад в Египте и Индии. В те времена, как и сейчас, люди страдали от витилиго – кожного заболевания, при котором на некоторых участках кожи деградируют и исчезают меланоциты. Древние врачи для лечения витилиго начали использовать экстракты, получаемые при кипячении семян растений семейства Зонтичные (*Ammi majus*) или Бобовые (*Psoralea corylifolia*). Экстракты либо наносили на поверхность кожи, либо принимали внутрь, после чего больные подвергались действию яркого в этих странах солнечного света. Лечение приводило к постепенному восстановлению пигментации. Без света экстракты не действовали. Дозировки света и содержавшегося в экстрактах фотосенсибилизатора в то время не могли контролироваться: при заниженных дозах фотосенсибилизатора и освещения снижался терапевтический эффект, а при их передозировке возникали ожоги. Так или иначе, уже древние египтяне и индусы практически применяли фотохимиотерапию.

В дальнейшем резкий всплеск интереса к фотомедицине произошел в конце 19-го века и связан в числе прочих со значительными техническими достижениями того времени. Образуется раздел медицины, названный гелиотерапией (в буквальном переводе — лечение солнечным светом). В это время выявлено огромное значение солнечного света при лечении цинги, различных заболеваний суставов, многих кожных болезней. Проводились также работы по изучению влияния света на ускорение заживления ран (сейчас такое влияние полностью научно доказано и ниже мы поговорим более детально о механизме ранозаживления под воздействием света).

Большой вклад в развитие фотомедицины внес известный датский врач Нильс Рюберг Финсен (Niels Ryberg Finsen), который экспериментально доказал применение красной части спектра (“красного солнца”) для лечения оспы. Расширив границы своих исследований, Р. Финсен начал экспериментировать с источниками искусственного света, в особенности с дуговыми угольными лампами. Он хотел выяснить, окажутся ли они эффективными для лечения обыкновенной волчанки – почти не поддающейся терапии кожной болезни, вызываемой микобактерией туберкулеза и часто настолько обезображивающей внешность своих жертв, что они становились изгоями обще-

ства. Р. Финсен подвергал пациентов двухчасовому ежедневному воздействию ультрафиолетовых лучей от дуговой угольной лампы постоянного тока силой 25 А. Через много месяцев пораженные участки кожи стали уменьшаться и появились явные признаки выздоровления больных. В 1896 г. в Копенгагене был основан Финсеновский институт светолечения, директором которого стал Р. Финсен. В институте были разработаны способы лечения с помощью финсеновских дуговых ванн, а также терапевтические методы, позволившие увеличить лечебную дозу ультрафиолетового излучения при минимальном повреждении тканей. В последующие пять лет 800 больных волчанкой прошли курс лечения в Финсеновском институте; 50% полностью выздоровели, у 45% отмечалось значительное улучшение. За эти работы Р. Финсен был удостоен в 1903 году Нобелевской премии по физиологии и медицине «в знак признания его заслуг в деле лечения болезней – особенно волчанки – с помощью концентрированного светового излучения, что открыло перед медицинской наукой новые широкие горизонты».

Примерно в то же время американские ученые Е. Кнотт (E. Knott) и В. Хэнкок (V. Hancock) использовали бактерицидное свойство УФ-излучения для лечения больных сепсисом¹.

Открытие фотодинамического эффекта связано с именем Оскара Рааба (Oscar Raab) – студента профессора Херманна фон Таппайнера (Hermann von Tarpeiner) в Мюнхенском Фармакологическом институте. О. Рааб начал активные исследования во время зимнего семестра 1887-1888 гг. В своей диссертации он писал: «В это время года яркость солнечного света постоянно менялась, и именно этот факт привел меня к тем результатам, которые мне удалось получить». Суть открытия О. Рааба состояла в том, что когда интенсивность света в поле микроскопа была достаточно большой, окрашенные акридином или другими флуоресцирующими красителями, как например, хинин, метил фосфин и эозин, клетки *Paramecia* (инфузории туфельки) прекращали движение и погибали, причем спектр действия этого эффекта соответствовал спектру поглощения красителей. Явление было описано в статьях О. Рааба и Х. Таппайнера в 1900 г. Х. Таппайнер назвал это явление «фотодинамическим действием».

Вслед за этим было показано, что для наблюдения фотодинамического лизиса эритроцитов и повреждения клеток инфузорий необходим кислород.

Параллельные исследования растворов биологически важных соединений привели к заключению, что освещение в присутствии красителей приводит к окислению этих субстратов кислородом. Это позволило У. Штраубу (W. Straub) в 1904 г. предположить, что в основе фотоокисления органических соединений и фотоповреждения клеток лежит один и тот же процесс – фотосенсибилизированное окисление кислородом. С этого времени термин «фотодинамическое действие» стали применять для обозначения фотосенси-

¹ Этот метод, названный первоначально по имени его создателей (метод Кнотта-Хэнхука) впоследствии стал более широко известен под названием метод УФ-облучения крови с последующей реинфузией.

билизованных реакций окисления органических соединений в биологических системах и в растворах. Иными словами, *фотодинамическими* стали называть такие *реакции* окисления субстратов кислородом, которые не идут в темноте, но осуществляются при добавлении красителя и его освещении. Красители, фотосенсибилизирующие такие реакции или фотобиологические эффекты, стали называть *фотодинамическими красителями*. При этом краситель не расходуется, его роль состоит в том, что он делает реакцию окисления чувствительной к свету.

В естественных условиях фотодинамическое действие является причиной многообразных биологических эффектов. Известны фотодинамические болезни человека и животных, как например, вызванные солнцем поражения кожи домашних животных, связанные с потреблением в пищу зверобоя (*Hipericum*). Это заболевание, названное гиперидизмом, возникает благодаря накоплению в крови пигмента зверобоя – гиперидина. Аналогичное заболевание (фагопиризм) возникает при избыточном потреблении гречихи (*Fagopirum*), благодаря накоплению фагопирина – пигмента, близкого по химической структуре к гиперидину. Генетические нарушения могут вызвать фотодинамические поражения, вызванные порфирией – избыточным содержанием порфиринов. Известны фотодинамические повреждения кожи, вызванные косметическими средствами, лекарствами, моющими средствами и многими другими факторами. Фотосенсибилизирующее действие смога и органических загрязнений воздуха и воды является одним из факторов, усиливающих их вредное биологическое действие.

Фотодинамическое действие может быть причиной биологических и терапевтических эффектов, вызванных красным и инфракрасным лазерным излучением, причем некоторые из этих эффектов, возможно, обусловлены прямым поглощением лазерного излучения кислородом.

Применение фотодинамического эффекта в онкологии берет свое начало в 1924 г. с работы А. Поликард (A. Policard), в которой было показано, что при облучении ультрафиолетом некоторые злокачественные опухоли человека флуоресцируют в оранжево-красной области спектра. Данное явление объясняли наличием в опухолях эндогенных порфиринов. Позднее это было подтверждено на экспериментальных опухолях, которые начинают флуоресцировать в красной области спектра, если животным предварительно ввести гематопорфирин.

Фотодинамическое уничтожение раковых опухолей и лечение заболеваний, вызванных патологической микрофлорой, являются в настоящее время интенсивно развивающимися направлениями фотомедицины.

Широкое распространение и важное прикладное значение фотодинамического действия делают это явление одним из главных фотобиологических явлений в природе, а изучение его механизмов – одной из фундаментальных фотобиологических проблем.

Фотодинамическая терапия, при которой используются активируемые светом лекарства для избирательного уничтожения раковых клеток, впервые

была применена в 1903 г., когда для лечения рака кожи прибегли к эозину и свету. Однако хорошо аргументированные данные о «фотонекрозе» опухолей были получены только в 1942 г. Животным с опухолью вводили гематопорфирин, одновременно облучая их кварцевой лампой. Наряду с известными в тот период симптомами, такими как световая эритема и отек, у экспериментальных животных развивались некроз и отторжение опухолевых тканей. После этого началось интенсивное исследование и расширение представлений о первом поколении фотосенсибилизаторов, представленном производными гематопорфирина, благодаря чему появились новые возможности лечения, а также сведения о механизмах действия. На данном этапе была продемонстрирована способность малигнизированных тканей поглощать гематопорфирин и его цинкопорфириновые комплексы, и высказано предположение о возможности проведения фототерапии рака с использованием порфиринов.

Современная эпоха применения ФДТ в онкологии началась с публикаций Р. Липсон (R. Lipson) в 60-х годах XX столетия, в которых было показано, что после внутривенной инъекции смеси производных гематопорфирина (HrD) злокачественные опухоли визуализируются за счет характерного флуоресцентного излучения избирательно накопленных порфиринов. В 1966 г. было проведено флуоресцентное детектирование и первое фотодинамическое лечение пациентки с раком молочной железы. В 1976 г. HrD был впервые успешно применен в США для лечения рака мочевого пузыря. В 1978 г. Т. Дж. Догерти и др. (T.J. Dougherty) при лечении методом ФДТ 113 кожных и подкожных злокачественных опухолей описали развитие частичного или полного некроза в 111 наблюдениях. И если для проведения ФДТ в данной работе был использован ламповый источник света с системой фильтров, то уже в 1980 г. впервые было применено воздействие лазерным излучением длиной волны 630 нм. С начала 80-х гг. ФДТ стали применять в лечении эндобронхиального рака, опухолей головы и шеи, пищевода и др.

Современные технические возможности позволили светотерапии, а затем и лазеротерапии сделать значительный шаг вперед. В настоящее время фотомедицина включает не только фототерапию, но и фотохирургию и фотодиагностику. Лазеры и светосинтезирующие аппараты заняли прочное место и в эстетической медицине. Специальные исследования позволили определить дозы воздействия света на организм человека, стимулирующие способность организма к регенерации и самовосстановлению.

*Фототерапия*² (другими словами светолечение или светотерапия) - это вид лечения, состоящий в том, что пациент подвергается воздействию солнечного света, или света с определенными длинами волн от искусственных источников, таких, как лазеры, светоизлучающие диоды, флуоресцентные

² Термином «фототерапия» в настоящее время обозначают также один из методов арт-терапии. Под ним понимают набор психотехник, связанных с лечебно-коррекционным применением фотографии, её использования для решения психологических проблем, а также развития и гармонизации личности.

лампы, дихроичные лампы, или же очень яркого света, имеющего полный спектр дневного света, в течение определённого, предписанного врачом, времени, а иногда также и в строго определённое время суток. Современная фототерапия берет начало в 1923 г., когда для лечения псориаза стали применять ртутно-кварцевые лампы.

Определенная степень желтушности достаточно часто встречается у новорожденных и наблюдается почти у 50 % младенцев между 2-м и 4-м днями жизни. До рождения билирубин связывается и экскретируется преимущественно плацентой, однако после рождения эту функцию выполняет печень новорожденного. Транзиторная гипербилирубинемия является результатом недостаточной активности связывающего фермента печени – глюкуронилтрансферазы. Фототерапия на длине волны ~450 нм – весьма эффективное средство профилактики гипербилирубинемии, способствующее образованию так называемого фотобилирубина, который нетоксичен.

Для ускорения заживления ран, улучшения микроциркуляции крови применяется *лазерная терапия*, заключающаяся в облучении ран и крови больного красным светом низкоинтенсивных лазеров.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является результатом комбинированного действия трех компонентов – фотосенсибилизатора, света и кислорода. ФДТ представляет собой двухступенчатый процесс: фотосенсибилизирующий препарат применяется местно или системно, после чего производится облучение светом соответствующей длины волны. При фотодинамической терапии наиболее часто используются порфирины в сочетании с красным светом (600 - 700 нм), а также сенсибилизаторы - фталоцианины, хлорины, пурпурины, порфины, различные красители, обладающие фотодинамическими свойствами, сочетания красителей и наночастиц и другие.

Противоопухолевые эффекты данного вида лечения обусловлены комбинацией прямого фотоповреждения клеток, разрушения сосудистой сети опухоли и активации иммунного ответа. Антибактериальное применение ФДТ основано на фотосенсибилизированном повреждении стенки бактериальной клетки с последующей ее гибелью. Таким образом, в основе ФДТ лежит фототоксическое действие света.

Фототоксические эффекты возникают под действием оптического излучения, поглощенного эндогенным хромофором или экзогенным фотосенсибилизатором. Они наблюдаются у всех испытуемых и характеризуются наличием пороговой дозы; эффекты усиливаются с увеличением дозы или концентрации вещества. К фототоксическим соединениям относятся псоралены, порфирины, тетрациклины, фенотиазины, сульфаниламиды, хлорпромазин и др. Клинически фототоксические эффекты проявляются в форме эритемы, отека, пигментации и т.д. Многие виды фототерапии основаны именно на фототоксическом действии света.

От фототоксических эффектов следует отличать *фотоаллергические эффекты*, которые также возникают после поглощения света химическим

соединением в коже, но для их возникновения необходима первичная иммунологическая сенсibilизация.

Фотоаллергию от фототоксичности отличают по двум критериям:

1) фотоаллергия перед проявлением эффекта требует нескольких сенсibilизирующих воздействий, тогда как для индукции фототоксического эффекта достаточно одного облучения;

2) только у малой доли испытуемых проявляется чувствительность к данному фотоаллергену, тогда как фототоксический эффект наблюдается у всех экспонировавшихся. Важно отметить, что некоторые вещества обеспечивают фототоксический эффект лишь в высоких дозах, в то время как фотоаллергию вызывают после нескольких малых доз.

Целями учебного пособия являются: расширение и углубление знаний студентов по вопросам действия света на биологические системы; изучение фундаментальных основ фотобиологических процессов и механизма фотодинамических реакций в биологических системах и разработанных на их основе методов фототерапии; знакомство с последними достижениями в области создания фотосенсibilизаторов.

2. ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

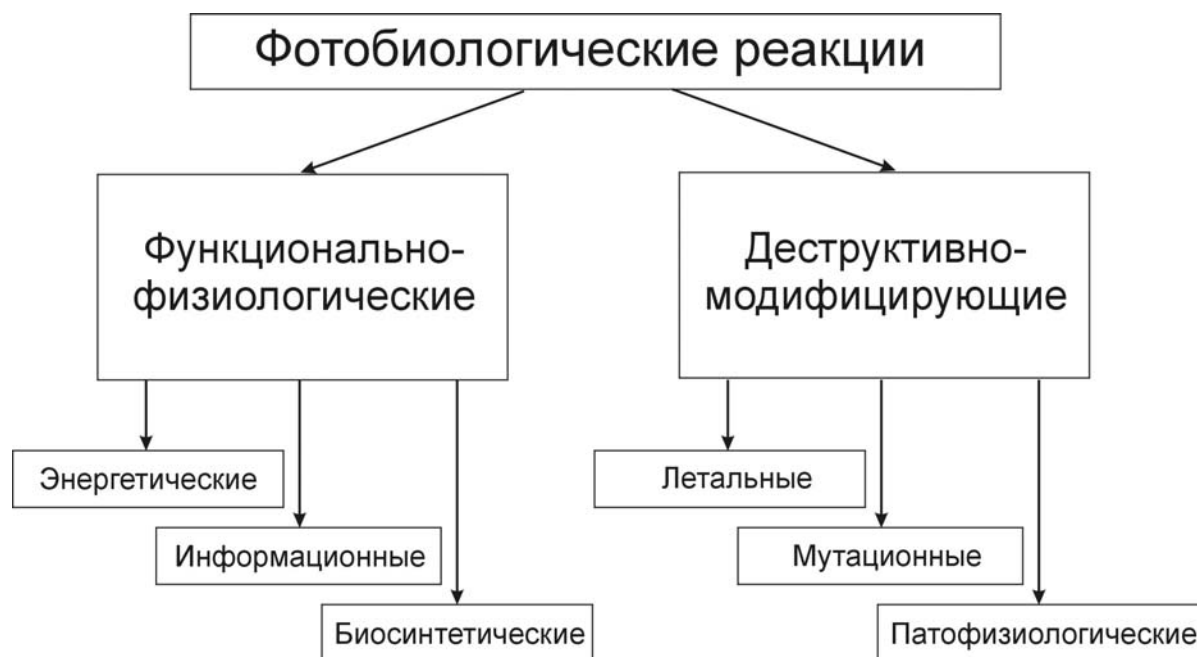
2.1. Понятие фотобиологического процесса

К *фотобиологическим* относятся процессы, начинающиеся с поглощения кванта света биологически важной молекулой и заканчивающиеся какой-либо физиологической реакцией (позитивной или негативной) на уровне организма.

К фотобиологическим процессам относятся фотосинтез, зрение, загар и эритема кожи, фотопериодизм и многие другие.

Огромное число фотобиологических реакций подразделяют на два типа: функционально-физиологические реакции и деструктивно-модифицирующие (схема 2.1). Если с помощью света запускаются реакции, в которых образуются продукты, необходимые для выполнения естественных функций клеток или организмов, то они относятся к *функционально-физиологическим* фотобиологическим реакциям. Если же под действием света происходит повреждение биологических молекул, что приводит к химическим реакциям, не свойственным организму в норме, то такие реакции относятся к *деструктивно-модифицирующим*.

Схема 2.1. Фотобиологические реакции



Каждый тип реакций подразделяется на три класса. Характеристики разных классов фотобиологических реакций приведены в табл. 2.1.

Таблица 2.1. Основные характеристики фотобиологических реакций

№	Класс реакции	Что происходит в организме?	Примеры
<i>Функционально-физиологические реакции</i>			
1	Энергетические	Синтез новых органических молекул со свободной энергией большей, чем у исходных реагентов. Таким образом, происходит запасание энергии	Фотосинтез
2	Информационные	Образуются фотопродукты, запускающие специализированные усиленные механизмы, в результате чего организм получает информацию о ситуации в окружающей среде	Зрение, фототаксис, фототропизм
3	Биосинтетические	В организмах существуют сложные цепочки последовательных этапов синтеза органических молекул, в которых есть запускаемые светом стадии	Биосинтез хлорофилла, витамина D, меланина
<i>Деструктивно-модифицирующие реакции</i>			
4	Летальные	Повреждаются биологически важные молекулы (прежде всего ДНК), что приводит к гибели организма. Характерно для вирусов, микроорганизмов, простейших	Бактериостатический и бактерицидный эффекты
5	Мутационные	Замена или выпадение основания в ДНК, т.е. возникновение мутации. Организм при этом не гибнет	Фотодинамический эффект
6	Патофизиологические	Временное нарушение метаболизма и физиологического состояния клеток и организмов. Не происходит повреждения критически важных структур	Эритема, канцерогенез

Условно всякий фотобиологический процесс можно разделить на несколько стадий:

- 1) поглощение кванта света молекулой;
- 2) внутримолекулярные процессы обмена энергией (фотофизические процессы);
- 3) межмолекулярные процессы переноса энергии возбужденного состояния;
- 4) первичный фотохимический акт, сопровождающийся образованием короткоживущих, нестабильных фотопродуктов;
- 5) темновые реакции, заканчивающиеся образованием стабильных продуктов;
- 6) биохимические реакции с участием фотопродуктов;
- 7) общефизиологический ответ на действие света.

Следовательно, фотобиологическая реакция имеет в начале чисто физический, а в конце – чисто биологический характер.

Первые три стадии фотобиологического процесса одинаковы для фотобиологии и люминесценции, поэтому законы фотобиологии имеют аналогии с законами люминесценции.

При поглощении фотона электрон переходит с заполненного уровня (S_0) на один из незаполненных уровней, и молекула оказывается в синглетном (S_1 , S_2) электронно-возбужденном состоянии (рис. 2.1). На рисунке прямые стрелки между уровнями, направленные вверх соответствуют поглощательным переходам.

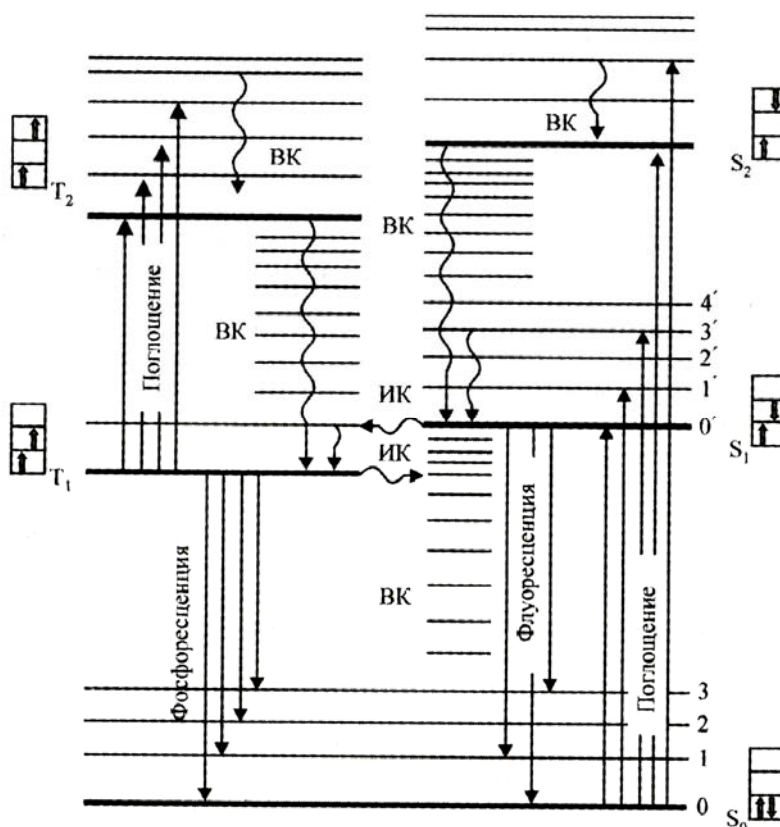


Рис. 2.1. Схема Яблонского энергетических уровней молекул с сопряженными связями: S_0 – основное (невозбужденное состояние); S_1 , S_2 и T_1 , T_2 – возбужденные соответственно синглетные и триплетные состояния; около каждого уровня показано направление спина возбужденного электрона по отношению к спину оставшегося электрона; жирные горизонтальные линии – электронные уровни энергии, тонкие (0, 1, 2 ... или 0', 1', 2' ...) - колебательные уровни; прямые стрелки – поглощательные и излучательные переходы, волнистые – безизлучательные переходы; ВК – внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИК – интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина) (Артюхов В.Г., 2009).

Поглощение энергии фотона биомолекулой осуществляется с помощью хромофорной группы при выполнении ряда условий:

- 1) энергетическое – длина поглощаемого излучения соответствует разности энергий между основным и возбужденным состояниями ($E_2 - E_1 = hc/\lambda$, где E_1 – энергия основного состояния молекулы; E_2 – энергия возбужденного ее состояния; h – постоянная Планка, равная

$6.6256 \cdot 10^{-27}$ эрг/с; c – скорость распространения света в вакууме; λ – длина волны света);

- 2) содержание в падающем пучке света таких фотонов, которые имели бы возможность взаимодействовать с осциллятором или ротатором молекулы (ротатор – компонент молекулы, связанный с вращением, а осциллятор – связанный с колебанием групп молекулы). Наиболее важным типом взаимодействия является взаимодействие электрического поля световых колебаний E и дипольного момента молекулы. Чтобы осциллятор (хромофорная группа: $>C=C<$, $>C=O$, $>C=S$, $-OH$, $-SO_3H$, $-NH_2$, $-COOH$, $-NH$) поглощал энергию, электрическое поле падающего света должно иметь составляющую, параллельную его дипольному моменту. Аналогичное условие ротатора состоит в том, чтобы падающий свет имел составляющую, перпендикулярную оси вращения молекулы;
- 3) необходимость учета правил отбора – вероятность поглощения кванта света зависит от разрешенности перехода. Наиболее вероятны (интенсивны) только те переходы, которые происходят между состояниями одинаковой мультиплетности, т.е. синглет-синглетные или триплет-триплетные.

Энергия возбуждения, приобретенная молекулой при поглощении кванта света, реализуется различными путями. На рис. 2.1 схематически изображены все возможные процессы фотофизической дезактивации электронно-возбужденной молекулы. Прямые стрелки между уровнями, направленные вниз – излучательные переходы, волнистые – безызлучательные.

Время жизни молекул в состоянии S_1 составляет $10^{-8} - 10^{-9}$ с. За время порядка $10^{-11} - 10^{-12}$ с возбужденная молекула безизлучательным путем отдает избыток электронной и колебательной энергии окружающей среде. Этот процесс называется *внутренней конверсией* (ВК). В результате ВК все молекулы вещества независимо от того, в какое электронно-колебательное состояние они были переведены поглощенным фотоном, переходят на низший колебательный подуровень первого синглетного возбужденного состояния (S_1). От этого состояния берут начало все последующие фотофизические процессы, в конечном итоге приводящие к дезактивации возбужденной молекулы.

С определенной вероятностью могут реализоваться следующие пути превращения энергии возбужденного состояния S_1 :

- 1) в тепло (тепловая диссипация вследствие безизлучательного перехода $S_1 \rightarrow S_0$);
- 2) испускание кванта флуоресценции: $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фл}}$;
- 3) фотохимическая реакция: $S_1 \rightarrow$ фотопродукт;
- 4) передача (миграция) энергии возбуждения другой молекуле;
- 5) переход молекулы в триплетное электронно-возбужденное состояние T_1 с обращением спина электрона: $S_1 \rightarrow T_1$. Переход из триплетного состояния в основное запрещен, т.к. спины электронов одинаковы

(параллельны). Поэтому в состоянии T_1 молекула находится значительно дольше ($10^{-4} - 10$ с), чем в состоянии S_1 .

Известны несколько путей дезактивации триплетного возбужденного состояния молекулы:

- 1) безизлучательный переход в основное синглетное состояние с обращением спина электрона: $T_1 \rightarrow S_0$;
- 2) испускание кванта фосфоресценции в соответствии с переходом $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фос}}$;
- 3) фотохимическая реакция с образованием соответствующего фотопродукта;
- 4) передача энергии возбуждения другой молекуле.

2.2. Внутримолекулярные и межмолекулярные процессы переноса энергии

Все многообразие фотобиологических реакций электронно-возбужденных молекул сводится к фотоизомеризации или переносу электрона между возбужденной молекулой и субстратом.

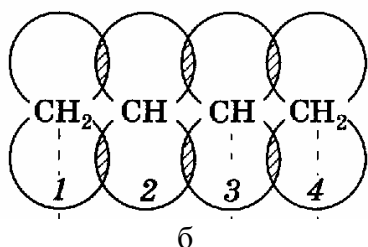
Фотоизомеризация – это изменение пространственной структуры молекул, осуществляющееся в электронно-возбужденном состоянии, в которое переходит молекула после поглощения кванта света. Известно, что у органических молекул, находящихся в основном состоянии, невозможно вращение их частей вокруг двойных связей. Такие молекулы имеют плоскую *цис*- или *транс*-конфигурацию (рис. 2.2, а). Это связано с особенностями перекрывания π -орбиталей при образовании второй связи³ (рис. 2.2, б).

Для того, чтобы повернуть две части молекулы вокруг двойной связи, нужно уменьшить области перекрывания π -орбиталей, для этого нужно затратить значительную энергию (кривая S_0 на рис. 2.2, в). Такой процесс самопроизвольно произойти не может. Наименьшую энергию молекула имеет при перекрывании π -орбиталей, поэтому π -орбитали называют *связывающими*. При поглощении фотона и переходе в возбужденное состояние молекула сразу после перехода сохраняет плоскую конфигурацию основного состояния. Но возбужденные π^* -орбитали (S_1 и T_1 состояния на рис. 2.2, в) являются *разрыхляющими*: наименьшую энергию имеет конфигурация, в которой π -связь разрывается и две части молекулы поворачиваются вокруг σ -связи на

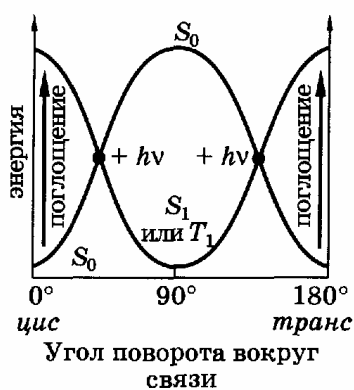
³ При возникновении между атомами углерода второй двойной связи происходит перекрывание орбиталей еще двух электронов (p -орбиталей) соседних углеродных атомов. Их электронные облака имеют в сечении вид восьмерки, ось которой перпендикулярна направлению σ -связи. Боковое перекрывание этих орбиталей в двух областях приводит к образованию молекулярной π -орбитали, соответственно электроны, формирующие π -орбиталь, называют π -электронами. Плотность образовавшегося облака π -электронов сосредоточена по обеим сторонам от линии σ -связи. Такие π -электроны делокализованы по всей цепочке и могут свободно по ней перемещаться подобно электронам проводимости в металле, но не могут ее покинуть.



а



б



в

Рис. 2.2. Схема фотоизомеризации молекулы (а). Образование молекулярной π -орбитали в молекуле бутадиена (б). Изменение энергии при переходе молекулы в возбужденное состояние (в) (Ремизов А.Н. и др., 2003).

вступает в реакции фотоокисления.

Перенос энергии электронного возбуждения между двумя молекулами можно представить в следующем виде:



В результате переноса энергии возбужденная молекула донора энергии D^* переходит в основное (невозбужденное) состояние D , а молекула акцептора энергии переходит из невозбужденного состояния A в возбужденное A^* . Донором и акцептором энергии не обязательно являются молекулы разных веществ, ими могут быть также и разные молекулы одного и того же вещества:



90°. При возвращении молекулы в основное состояние она может претерпеть *цис-транс-* или *транс-цис-*изомеризацию.

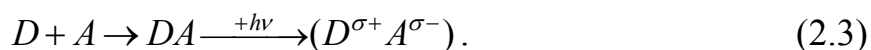
К фотохимическим превращениям молекулы, поглотившей фотон, приводят резкие изменения ее *донорно-акцепторных свойств*. В возбужденной молекуле освобождается электронная вакансия на верхней заполненной орбитали (S_0 на рис. 2.2), в результате чего молекула становится акцептором электрона, способным вступать в реакции фотовосстановления с подходящими донорами. Наряду с этим в возбужденной молекуле появляется электрон на сравнительно высоко расположенной нижней свободной орбитали (S_1 или T_1 на рис. 2.2). В результате этого молекула становится донором электрона и легко

Перенос энергии между одинаковыми молекулами (который может быть многократным) называют *миграцией энергии*. Один из возможных способов переноса энергии между молекулами донора и акцептора заключается в том, что молекула D^* излучает квант флуоресценции, а молекула A его поглощает. Такой перенос называют *излучательным*. При достаточно малых расстояниях между молекулами донора и акцептора перенос становится *безизлучательным*.

Безизлучательный перенос энергии может происходить в момент тесного контакта молекул при их кинетических соударениях. Но даже при отсутствии контакта перенос энергии, тем не менее, идет достаточно эффективно.

Для осуществления переноса энергии необходимо выполнение *условия резонанса*: разность энергий основного и возбужденного электронных уровней обеих молекул должна быть одинаковой и *условия индукции* – взаимодействие между молекулами должно быть достаточно сильным. Кроме того донор и акцептор должны быть удачно ориентированы друг относительно друга. Если дипольные моменты излучения донора и поглощения акцептора перпендикулярны друг другу, то перенос энергии осуществляться не будет. Если направление моментов совпадает с направлением радиус-вектора, соединяющего D^* и A , то вероятность переноса максимальна.

Надмолекулярные соединения, которые образуются при переносе электрона от молекулы, служащей донором электронов (D) к молекуле – акцептору (A) электронов, называют *комплексами с переносом заряда* (КПЗ). Эти две молекулы удерживаются вместе за счет электростатического притяжения и более слабых взаимодействий, таких как ван-дер-ваальсовы силы⁴, водородные связи⁵ и т.д. Как правило, перенос заряда в невозбужденном состоянии комплекса незначителен. Однако при поглощении фотонов таким донорно-акцепторным комплексом происходит электронный переход из S_0 состояния донора в S_1 состояние акцептора (рис. 2.3), что соответствует частичному или полному переносу электрона от D к A :



⁴ *Ван-дер-ваальсовы силы* — силы межмолекулярного взаимодействия с энергией 0.8 — 8.16 кДж/моль. К ван-дер-ваальсовым силам относятся взаимодействия между диполями (постоянными и индуцированными). Название связано с тем фактом, что эти силы являются причиной поправки на внутреннее давление в уравнении состояния реального газа Ван-дер-Ваальса. Эти взаимодействия в основном определяют силы, ответственные за формирование пространственной структуры биологических макромолекул.

⁵ *Водородная связь* — форма ассоциации между электроотрицательным атомом и атомом водорода H, связанным ковалентно с другим электроотрицательным атомом. Водородные связи могут быть межмолекулярными или внутримолекулярными. Часто водородную связь рассматривают как электростатическое взаимодействие, усиленное небольшим размером водорода, которое разрешает близость взаимодействующих диполей. Особенности водородной связи, по которым её выделяют в отдельный вид, является её не очень высокая прочность, распространенность и важность, особенно в органических соединениях.

Электронному переходу с переносом заряда принадлежит новая широкая и бесструктурная полоса поглощения, отсутствующая у отдельных компонентов. Образовавшийся при возбуждении комплекс растрчивает свою энергию в нескольких процессах. Возможны: обратный излучательный переход с переносом заряда из S_1 акцептора в S_0 донора (флуоресценция КПЗ), внутренняя конверсия в КПЗ, а также фотохимическое необратимое изменение молекул, входивших в КПЗ (см. рис. 2.3).

Если триплетный уровень донора имеет меньшую энергию, чем возбужденный синглетный уровень акцептора, то может произойти интеркомбинационная конверсия (ИК на рис. 2.3) с последующим излучением фосфоресценции донора. Электронный переход с переносом заряда заканчивается окислением органических молекул. Предполагается, что фотохимические реакции некоторых фотосенсибилизаторов протекают с участием КПЗ.

Донорно-акцепторные комплексы с переносом заряда между возбужденной и невозбужденной молекулами разных веществ называют *эксиплексами*.

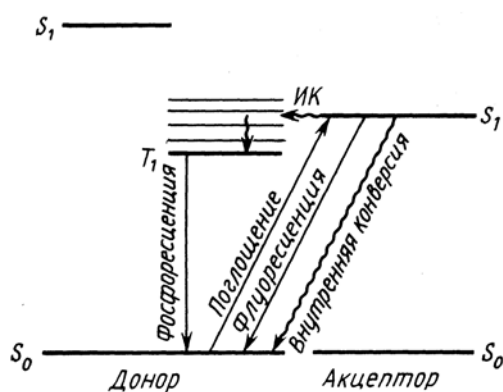


Рис. 2.3. Схема электронных переходов с переносом заряда (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

Первичный фотохимический акт – это процесс, в который вступает молекула из нижнего синглетного S_1 или триплетного T_1 возбужденных состояний. В ходе этой стадии образуется первичный *фотопродукт*, непосредственно участвующий в дальнейших химических или физико-химических превращениях.

Первичные продукты фотобиологических реакций (молекулы в электронно-возбужденных состояниях и свободные радикалы) крайне неустойчивы и быстро переходят либо в исходные вещества, либо в более устойчивые фотопродукты (новые молекулы).

В результате темновой стадии после спонтанных химических превращений первичного фотопродукта образуется *стабильный* продукт. Стабильное соединение отличается устойчивостью в течение достаточно длительных промежутков времени.

Последующие превращения включают в себя цепь биохимических реакций или перестроек клеточных структур (чаще всего мембран).

Результат биохимических или структурных изменений проявляется на уровне организма: происходит синтез богатых энергией веществ, движение биообъекта, модификация генотипа и т.п.

2.3. Спектр фотобиологического действия

Солнце – главный источник излучения для нашей планеты, благодаря которому протекают фотобиологические реакции. Солнечный спектр распределен в диапазоне длин волн от нескольких долей нм (гамма-излучение) до метровых радиоволн. Наибольшую интенсивность непрерывный спектр Солнца имеет в области длин волн 430–500 нм (рис. 2.4). В видимой и инфракрасной областях спектр электромагнитного излучения Солнца близок к спектру излучения абсолютно черного тела с температурой около 6000 К. Около 9% энергии в солнечном спектре приходится на ультрафиолетовое (УФ) излучение с длинами волн от 100 до 400 нм. Остальная энергия разделена приблизительно поровну между видимой (400–750 нм) и инфракрасной (750–5000 нм) областями спектра.

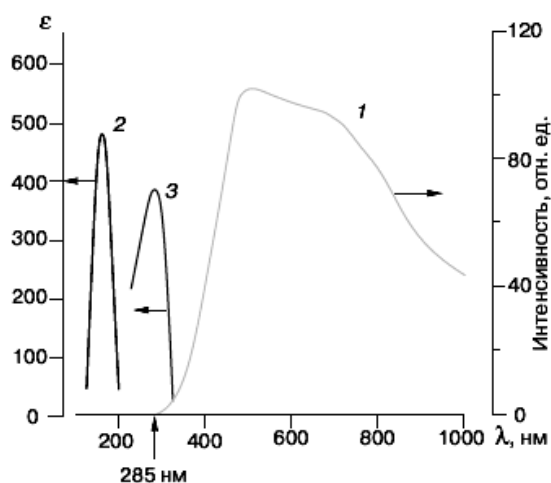


Рис. 2.4. Спектр солнечного излучения и спектры поглощения кислорода и озона: 1 – излучение Солнца у поверхности Земли; 2 – кислород; 3 – озон (Потапенко А.Я., 1996).

Биологически важным участком солнечного спектра является относительно небольшой диапазон от 200 до 1000 нм. УФ излучение с длинами волн менее 200 нм используется редко. Оно поглощается кислородом воздуха, поэтому его действие можно изучать только в специальных условиях, например, в вакууме, из-за этого УФ с $\lambda < 200$ нм называют вакуумным.

Коротковолновая граница солнечного спектра у поверхности Земли на уровне моря (на экваторе в безоблачный полдень) определяется длиной волны около 285 нм (рис. 2.4).

Особенно важная роль в фильтрации солнечного излучения принадлежит слою атмосферного озона, расположенному на высоте примерно 20 км от поверхности Земли и определяющему коротковолновую границу спектра. В северных и южных широтах коротковолновая граница сдвинута в область больших длин волн, т.к. угол падения солнечных лучей на поверхность Зем-

Плотность потока излучения Солнца в рентгеновской области (0.1–10 нм) весьма мала ($\sim 5 \cdot 10^{-4}$ Вт/м²) и сильно меняется с изменением уровня солнечной активности. В УФ области на длинах волн от 200 до 400 нм спектр Солнца также описывается законами излучения абсолютно черного тела. Коротковолновое УФ излучение Солнца возникает вблизи фотосферы. Рентгеновское излучение исходит из хромосферы ($T \sim 10^4$ К), расположенной над фотосферой, и короны ($T \sim 10^6$ К) – внешней оболочки Солнца. Радиоизлучение на метровых волнах возникает в короне, на сантиметровых – в хромосфере.

ли там больше, чем на экваторе, и свету приходится проходить больший путь в атмосфере.

Особенностью биологического действия УФ и видимого излучения является ярко выраженная зависимость биологического эффекта от длины волны излучения. Бактерицидные эффекты вызываются волнами в диапазоне 200 – 315 нм, покраснение (эритема) кожи наиболее эффективно вызывается излучением с длиной волн 280 – 315 нм, зрительный эффект – 400 – 750 нм (видимый диапазон), лечение желтухи новорожденных – фиолетовым светом (около 400 нм). При фотосинтезе растения и фотосинтезирующие бактерии используют весь диапазон солнечного УФ излучения, достигающего поверхности Земли, видимого света, и даже ближнего инфракрасного (ИК) излучения (иногда до 1000 нм).

Разные фотобиологические процессы начинаются с поглощения квантов света разными молекулами, в свою очередь положение полосы поглощения молекулы зависит от ее химической структуры. Меняя длину волны, можно избирательно инициировать те или иные фотобиологические процессы⁶.

Поглощение монохроматического света веществом описывается законом Бугера-Ламберта-Бера

$$I = I_0 e^{-snl} \quad \text{или} \quad I = I_0 10^{-\varepsilon cl}, \quad (2.4)$$

где I и I_0 – интенсивности ослабленного образцом и падающего на образец монохроматического света; l – толщина образца (см); n и c – концентрация вещества в образце, выражаемая соответственно в числе молекул на 1 см^3 ($1/\text{см}^3$) или в молях на литр (моль/л); коэффициенты s (см^2) и ε [$\text{л}/(\text{моль} \cdot \text{см})$] характеризуют способность молекул исследуемого вещества поглощать свет данной длины волны и называют поперечным сечением поглощения и молярным коэффициентом поглощения соответственно. Часто способность образцов поглощать свет количественно оценивают величиной оптической плотности $OD = \varepsilon cl = \lg(I_0/I)$. Зависимость s , ε или OD от длины волны называют спектром поглощения.

Спектр поглощения ДНК представляет собой широкую неструктурированную полосу и находится в области 200 – 315 нм с максимумом около 260 нм. Спектры поглощения других биологически важных молекул (белков, коферментов, пигментов и т.д.) также представляют собой широкие полосы, но по положению отличаются от спектров ДНК. Способность поглощать свет и положение полосы поглощения определяются, прежде всего, тем, как связа-

⁶ Избирательность действия отличает биологические эффекты света от эффектов ионизирующего излучения. Поглощение квантов рентгеновского или γ -излучения осуществляется не молекулами, а атомами и не зависит от того, в состав каких молекул эти атомы входят. Поэтому поглощение ионизирующего излучения происходит в основном теми элементами, которых в организме больше. Так как наш организм на 80% состоит из воды, то радиохимические процессы приводят преимущественно к появлению радикалов воды, которые в дальнейшем повреждают белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др.

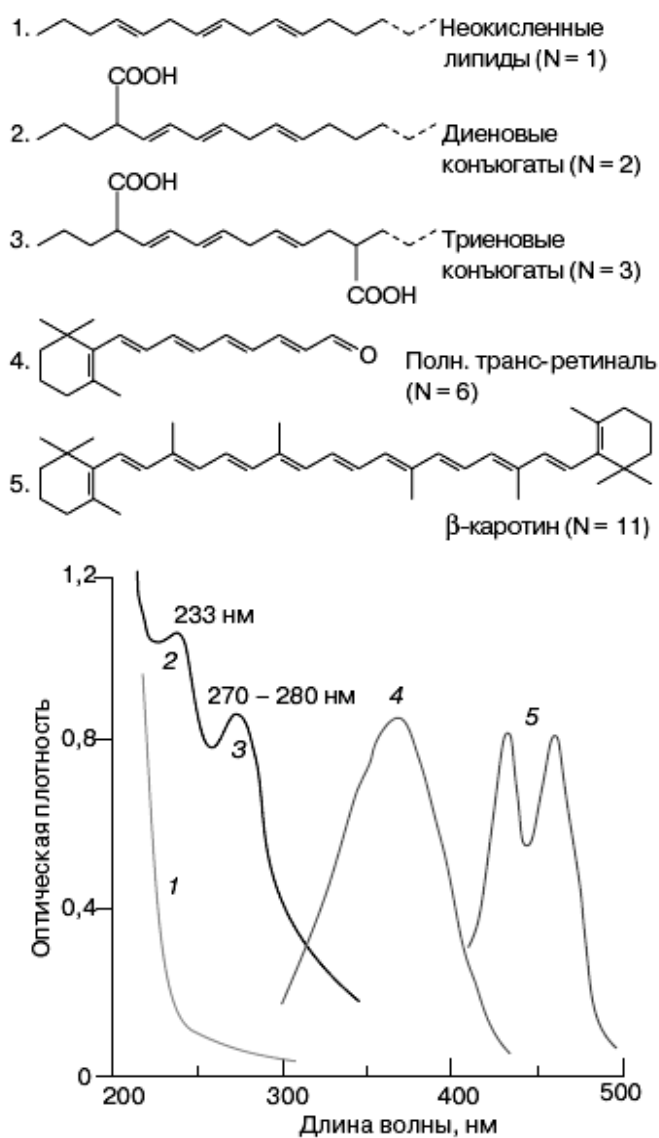


Рис. 2.5. Химическая структура молекул и спектры их поглощения. N – число сопряженных двойных связей в молекуле (Потапенко А.Я., 1996).

ния короче 200 нм. При окислении липидов двойные связи сдвигаются и становятся сопряженными. При сопряжении двух связей (диеновые конъюгаты) возникает максимум поглощения около 233 нм, при образовании триеновых конъюгатов появляется максимум около 270-280 нм (соответственно 2 и 3). Белок ретиналь, содержит шесть сопряженных связей и имеет максимум поглощения около 360 нм (4). У каротиноидов еще более длинная система сопряженных связей и еще более длинноволновое поглощение (5). Таким образом, достаточно посмотреть на структурную форму молекулы, чтобы определить, способна ли она поглощать свет, и даже примерно предсказать положение полосы поглощения.

Когда говорится об избирательном действии света, то подразумевается, что фотобиологический эффект вызывается светом только определенного

ны между собой в молекулах атомы углерода. На рис. 2.5 представлены несколько примеров спектров поглощения.

Все молекулярные полосы поглощения широкие, их полуширина (ширина на половине высоты) варьирует в пределах 30-70 нм, форма полос напоминает гауссовы кривые распределения. При сопоставлении спектров с химической структурой молекул обращает на себя внимание то, что чем длиннее в молекуле система сопряженных двойных связей (система чередующихся двойных и одинарных связей между атомами углерода), тем в более длинноволновой области располагается спектр поглощения. Так, молекулы ненасыщенных липидов (1 на рис. 2.5), содержащие несопряженные двойные связи (двойные связи разделены двумя или более одинарными связями), имеют максимум поглощения

диапазона длин волн. Причем на краях этого диапазона эффективность действия света снижается, а если выйти за пределы «эффективного» диапазона, то данное явление, например, эритему вызвать не удастся, сколь долго бы не облучался исследуемый объект, в данном случае кожа.

Для оценки *биологической эффективности* действия света нужны количественные характеристики. К ним относятся квантовый выход фотохимической реакции и спектр действия.

Как уже обсуждалось выше, молекула, поглотившая квант света и перешедшая в результате в электронно-возбужденное состояние, растрчивает энергию возбуждения на тепловые колебания, высвечивание квантов люминесценции, перенос энергии на другие молекулы, химические реакции и др. Каждый из указанных процессов осуществляется с определенной вероятностью, эту вероятность называют *квантовым выходом* данного процесса. Соответственно квантовый выход фотохимической реакции Φ равняется отношению

$$\Phi = (\text{число поврежденных молекул}) / (\text{число поглощенных квантов}).$$

Вероятность осуществления каждого процесса растраты энергии возбуждения для молекул с сопряженными связями не зависит от энергии поглощенного кванта или, другими словами, от длины волны возбуждающего света. По закону Бугера-Ламберта-Бера молекулы представляют собой мишени с некоторым эффективным сечением s , при попадании в которое происходит поглощение кванта света. В фотохимии ввели понятие *поперечного сечения фотохимической реакции* $\sigma = s\Phi$ (см²). Видно, что σ меньше s по абсолютному значению, так как Φ меньше единицы, но форма кривых зависимостей величин s и σ от длины волны света одинакова.

Важной характеристикой воздействия света на биологические объекты является *спектр фотобиологического действия – зависимость биологического эффекта от длины волны действующего света*.

Одна из задач при изучении фотобиологических процессов – определение вещества, которое поглощает действующее излучение и, тем самым, участвует в первых стадиях процесса. Для этого изучают спектр фотохимического действия и сравнивают его со спектрами поглощения предполагаемых участников реакции.

Рассмотрим этот подход на примере фотохимической инактивации ферментов при УФ облучении. Особенность этой реакции состоит в том, что она протекает по одноударному механизму: под действием поглощенного кванта молекула либо совсем не изменяется, либо полностью инактивируется, вероятность инактивации есть квантовый выход инактивации.

Рассмотрим кинетику этого процесса. Пусть в кювете толщиной l находится разбавленный раствор фермента в концентрации n молекул в 1 см³ (см⁻³); s (см²) – поперечное сечение поглощающего фермента; I_0 и I (см⁻²с⁻¹) – величины, пропорциональные интенсивности падающего и прошедшего че-

рез раствор света и выраженные числом квантов на 1 см^2 в секунду. Каждую секунду раствор будет поглощать $(I_0 - I)$ квантов, при этом в растворе площадью 1 см^2 ежесекундно инактивируется число молекул, равное

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi(I_0 - I)/l \quad (2.5)$$

где Φ – квантовый выход фотохимической реакции. Величины I_0 , I , s и l связаны между собой в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера (см. 2.4):

$$I/I_0 = T = e^{-snl}. \quad (2.6)$$

Из уравнений (2.5) и (2.6) находим

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi I_0(1 - e^{-snl})/l. \quad (2.7)$$

В разбавленных растворах, где $snl < 0.1$, выражение в скобках в правой части уравнения (2.7) приблизительно равно snl . Тогда для кюветы с раствором толщиной $l = 1 \text{ см}$ можно написать, что

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi I_0 sn. \quad (2.8)$$

Интегрирование выражения (2.8) дает

$$\ln \frac{n_0}{n_t} = I_0 t s \Phi = D_{об} \sigma, \quad (2.9)$$

где $D_{об} = I_0 t$ – доза облучения; $\sigma = s\Phi$ – поперечное сечение инактивации фермента, имеет размерность площади.

Для определения σ строят график зависимости $\ln(n_0/n_t) = f(D_{об})$ (рис. 2.6).

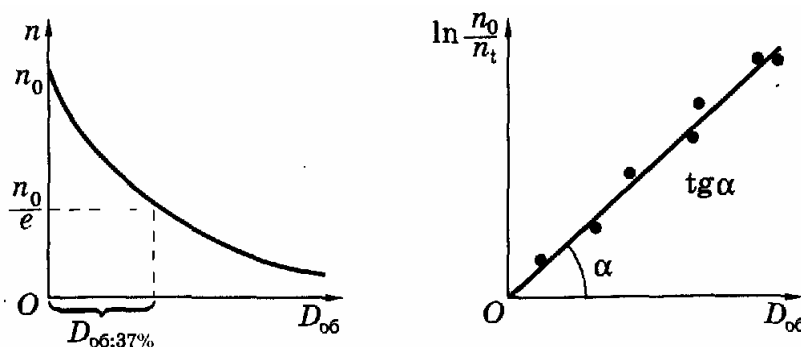


Рис. 2.6. Определение поперечного сечения инактивации фермента (Ремизов А.Н. и др., 2003).

Величина σ определяет наклон прямой. Поскольку при $n_0/n_t = e$, $\ln(n_0/n_t) = 1$, величину σ можно найти непосредственно из дозовой кривой инактивации

$$\sigma = 1/D_{37\%}, \quad (2.10)$$

где $D_{37\%}$ - доза облучения, при которой остались неразрушенными 37% молекул.

В случае сложной оптически плотной смеси веществ, в которой оптическая плотность образца OD не изменяется в ходе облучения, уравнение (2.5) усложняется и принимает вид

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi I_0(1-T) \frac{OD_A}{OD} \quad (2.11)$$

где OD_A – оптическая плотность вещества, участвующего в фотохимической реакции, T – коэффициент пропускания смеси. Подставим в уравнение (2.11) $s_A n_A l / \ln 10$ вместо OD_A , разделим переменные и проинтегрируем, получаем

$$\ln \frac{n_0}{n} = I_0 t s \Phi \frac{l(1-T)}{\ln 10 OD} = D_{06} \sigma K \quad (2.12)$$

где K – константа, учитывающая экранировку фотолизируемого вещества.

При нужной длине волны следует измерить оптическую плотность OD , рассчитать коэффициент экранировки K и затем найти σ из уравнения (2.12).

В фотохимии *спектром действия* называют зависимость σ от длины волны действующего света (рис. 2.7).

Как и квантовый выход люминесценции, *квантовый выход фотохимических реакций органических молекул в растворах не зависит от длины волны действующего света*. Поскольку $\sigma = s\Phi$, спектр действия $\sigma(\lambda)$ для индивидуального вещества по форме соответствует спектру его поглощения $s(\lambda)$, т.к. различаются только постоянным множителем Φ . Измерив по дозовым кривым спектр действия, можно определить спектр поглощения участвующего в процессе вещества, не проводя никаких спектрофотометрических измерений (рис. 2.7).

Описанная методика определения спектров действия может быть в первом приближении применена к исследованию бактерицидного действия света. Сходство процессов при фотолизе⁷

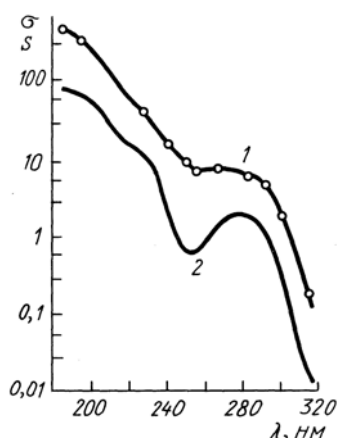


Рис. 2.7. Спектр действия фотоинактивации $\sigma(\lambda)$ (1) и поглощения $s(\lambda)$ (2) трипсина (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

⁷ *Фотоллиз* – химическая модификация вещества под действием света.

молекул в растворе и при фотоинактивации бактерий в суспензии заключается в следующем. Под действием поглощенного кванта молекула либо совсем не изменится, либо превратится в фотопродукт, т.е. возможны только два исхода, причем вероятность фотолиза определяется квантовым выходом Φ . Предположим, что при поглощении кванта излучения бактерией она так же останется либо живой, либо погибнет (случай, когда бактерия подвергается мутации в данном приближении не рассматривается). Концентрацию жизнеспособных бактерий можно определить подобно концентрации неразрушенных молекул в растворе. Вероятность гибели бактерии при поглощении кванта определяется квантовым выходом бактерицидного эффекта и (так же как при фотолизе молекул) не зависит от длины волны действующего света. Поэтому если в формулы (2.10 - 2.12) вместо концентрации молекул подставить концентрацию бактерий, то можно найти σ для бактерицидного эффекта и построить спектр действия. Так, например, было установлено, что кривая гибели бактерий под действием УФ-излучения (спектр фотобиологического действия) подобна спектру поглощения нуклеиновых кислот, представляющему широкую неструктурированную полосу в диапазоне длин волн 200 – 315 нм с максимумом при 260 нм. Это дало основание сделать вывод, что гибель бактерий обусловлена повреждением именно нуклеиновых кислот. На этом основано использование в медицине для обеззараживания помещений ртутных бактерицидных ламп, излучающих монохроматический свет с длиной волны 254 нм, что соответствует максимуму спектра действия бактерицидного эффекта.

В случае сложных фотобиологических процессов, когда конечному эффекту предшествуют частично обратимые фотохимические процессы и темновые стадии, уравнение (2.12) может не соблюдаться, и определить σ для построения спектра действия становится затруднительно.

Подобным процессом является возникновение эритемы кожи. Эритема заключается в расширении кровеносных сосудов кожи, что видно по ее покраснению. Зависимость степени покраснения от дозы характеризуется наличием пороговой дозы (*минимальной эритемной дозы, МЭД*), вызывающей едва различимое глазом покраснение. Подпороговые дозы эритему не вызывают совсем. При увеличении дозы облучения степень покраснения растет пропорционально логарифму дозы. Здесь отсутствуют количественные показатели, подобные числу разрушенных молекул или погибших клеток, которые можно было бы использовать для расчета σ .

Выход из положения был найден при введении следующего предположения. Если облучать кожу разными длинами волн и при этом подбирать каждый раз дозу так, чтобы возникающий эффект (степень покраснения) был одинаков, то можно полагать, что одинаковая степень покраснения (стандартный эффект) является результатом одинаковых фотохимических повреждений. В качестве стандартного эффекта обычно выбирают минимальное покраснение, вызываемое *МЭД*. Величина *МЭД* является функцией длины волны действующего света. По аналогии с (2.10) было предложено опреде-

лять величину *эритемной эффективности* как $1/MЭД$. Предполагается, что $1/MЭД$ пропорциональна σ , подобно $1/D_{37\%}$ из выражения (2.10).

На рис. 2.8 по оси ординат отложена именно такая величина – $1/MЭД$. Выяснилось, что динамика развития, длительность существования и степень покраснения кожи сильно зависят от длины волны действующего света. На этом основании в медицине весь диапазон УФ-излучения принято подразделять на три области: УФА (320-400 нм), УФВ (280-320 нм) и УФС ($\lambda < 280$ нм). УФА-излучение наименее эффективно. УФВ-излучение способно вызывать наиболее интенсивную и длительную эритему, переходящую при дозах более 10 МЭД в эдему (ожог кожи). УФС-излучение может вызвать только

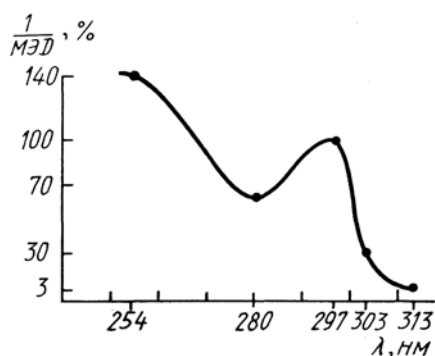


Рис. 2.8. Спектр действия УФ-эритемы кожи человека (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

умеренное покраснение, ни при каких дозах не переходящее в эдему. Регистрация спектров действия эритемы показала, что данная реакция кожи является следствием суммирования двух или трех фотохимических процессов, каждый из которых по-разному зависит от длины волны действующего света. Величину, подобную МЭД, используют и при построении спектров действия загара человека, чувствительности глаза и других явлений.

По сравнению с относительно простой ситуацией, изложенной выше, изучение спектров действия в сложных биологических системах может представлять определенные трудности за счет эффектов экранировки. Суть экранирующего эффекта состоит в том, что часть падающего на объект света поглощается в верхних слоях этого объекта и в его глубине интенсивность действующего света оказывается ниже по сравнению с интенсивностью падающего света, измеряемой экспериментатором. Примером могут служить фотобиологические процессы, протекающие в коже человека и животных. До хромофоров в клетках доходит свет, ослабленный поверхностными слоями кожи (например, роговым слоем), т.е. имеет место оптическое экранирование, которое будет искажать истинный спектр действия эритемы при его регистрации (см. рис. 2.8).

В случае сложных фотобиологических процессов можно для регистрации спектров действия использовать величину *биологической эффективности света (БЭС)*, обратную дозе облучения, вызывающей стандартный биологический эффект

$$БЭС = 1/D_c - \sigma.$$

Изучение спектров действия показало, что УФВ-излучение наиболее эффективно вызывает не только эритему, но также пигментацию и рак кожи, кроме того, оно подавляет Т-клеточное звено иммунитета и вызывает многие другие эффекты у человека и животных.

3. МЕХАНИЗМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ РЕАКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

3.1. Понятие фотосенсибилизатора

Биологические объекты обладают чувствительностью к свету за счет наличия *эндогенных хромофоров*. Фотобиологические процессы, такие как фотомутагенез, фотоканцерогенез, эритема, индуцируются, если под действием света соответствующих длин волн возбуждаются молекулы зрительных пигментов, белков, нуклеиновых кислот или других хромофоров, в норме содержащихся в объекте. В некоторых случаях наблюдается резкое повышение светочувствительности биологических систем. Чаще всего это происходит при попадании в объект *экзогенных хромофоров*, например каких-либо красителей, поглощающих УФ, видимый или ближний ИК свет. Фоточувствительность может возрастать и при некоторых заболеваниях. Например, в тканях человека при нарушениях эритропоэза⁸ или при отравлениях свинцом резко повышается содержание протопорфиринов, и фотохимические реакции с их участием начинают играть более заметную роль по сравнению с нормой.

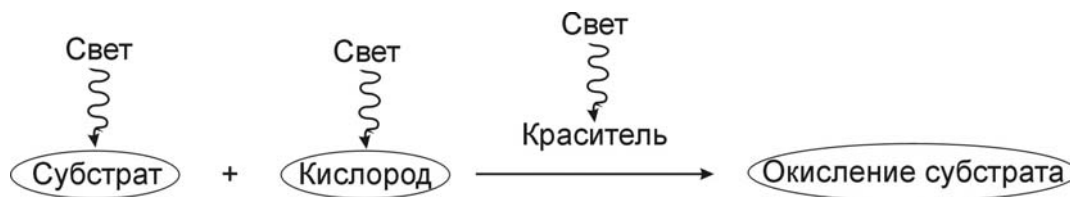
В фотобиологии соединения, повышающие чувствительность биообъектов к свету, называют *фотосенсибилизаторами* (ФС). Механизмы фотохимических реакций с участием ФС крайне многообразны, так же как и механизмы действия эндогенных хромофоров.

В общем случае, роль ФС может играть сам субстрат окисления. Примерами таких эффектов может служить фотоповреждение белков и аминокислот под действием ультрафиолетового излучения и самосенсибилизированное окисление кислородом порфиринов. ФС может служить также молекулярный кислород, который, поглощая свет, образует реакционноспособное синглетное состояние.

В итоге процессы фотоокисления органических субстратов кислородом соответствуют схеме 3.1, где показано, что такие реакции могут осуществляться за счет фотовозбуждения красителя (что является наиболее распространенным механизмом и собственно фотодинамическим действием), субстрата или кислорода.

⁸ *Эритропоэз* (erythropoiesis, erythrogenesis) - процесс образования эритроцитов, который обычно протекает в кроветворной ткани костного мозга.

Схема 3.1. Фотодинамическое действие: определение сущности эффекта



Фотосенсибилизированные процессы можно разделить на два класса: нуждающиеся в присутствии кислорода и не нуждающиеся в нем.

3.2. Кислороднезависимые фотосенсибилизированные реакции

Примером кислороднезависимых фотосенсибилизированных реакций является фотоприсоединение псораленов (фурокумаринов) к пиримидиновым основаниям ДНК, обнаруженное Л. Мюсайо (L. Musajo), Дж. Родигьеро (G. Rodighiero) и Ф. Далл'Акуа (F. Dall'Acqua) (1965). Эти реакции играют ключевую роль в некоторых процессах, фотосенсибилизированных псораленами. Установлено, что они ответственны за летальное и мутагенное действие УФ-облучения на микроорганизмы, а также лежат в основе его терапевтического воздействия при фотохимиотерапии псориаза и других заболеваний кожи (ПУФА-терапия).

Рассмотрим сначала реакции псораленов с тимином в растворе. Псоралены имеют широкую полосу поглощения с максимумом при ~ 300 нм, простирающуюся до 400 нм. Под действием УФА-излучения (320-400 нм), не поглощаемого тимином, псорален (I) возбуждается и вступает в реакцию присоединения, образуя с тимином (II) несколько циклобутановых аддуктов⁹ – III, IV, V, VI (рис. 3.1).

Рассмотрим фотоприсоединение псораленов к тимину, входящему в состав двуспиральной ДНК. В этом случае фотохимической реакции всегда предшествует темновая стадия связывания псораленов с ДНК. Плоские молекулы псораленов встраиваются в двойную спираль между двумя парами комплементарных оснований. Если рядом с псораленом оказался тимин, то реакционноспособные участки молекулы псоралена располагаются близко к реакционноспособной связи тимина. Поглотив фотон, молекула псоралена не должна уже в процессе диффузии «искать» тимин. Таким путем в водных растворах ДНК образуются все четыре типа аддуктов псорален-тимин. Спектральные свойства соединений III, IV отличаются от свойств соединений V, VI: III и IV имеют максимумы поглощения при ~ 330 нм, тогда как V и VI вообще не поглощают в УФА-области спектра. Поэтому их дальнейшая фотохимическая судьба различна. Соединения III или IV способны, поглотив УФА-фотон, вступить в реакцию фотоприсоединения еще с одним тимином

⁹ *Аддукт* – продукт присоединения молекул друг к другу, при котором не происходит какого-либо отщепления фрагментов.

из другой нити ДНК, если такой тимин имеется рядом. Таким образом, после последовательного поглощения двух квантов света молекула псоралена может ковалентно связать между собой две нити ДНК.

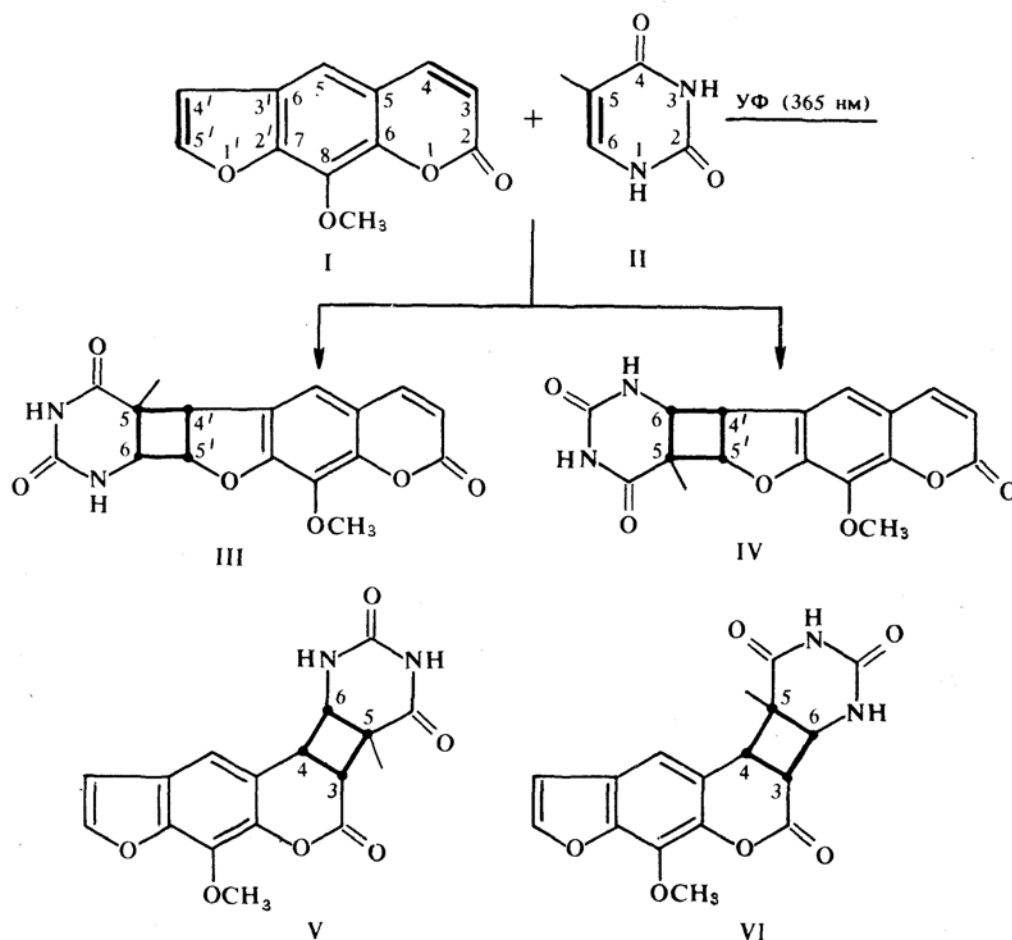


Рис. 3.1. Схема взаимодействия псоралена и тимина под действием УФА-излучения: римскими цифрами обозначены молекулы псоралена (I), тимина (II), циклобутановых аддуктов (III, IV, V, VI); арабскими цифрами обозначены номера атомов углерода. У молекул псоралена и тимина реакционноспособные двойные связи обозначены утолщенными линиями (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

Ф. Далл'Акуа предложена следующая схема реакций фотоприсоединения (схема 3.2):

Схема 3.2. Реакции фотоприсоединения псоралена к ДНК (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006)



Фотопродукты взаимодействия псоралена и тимина, содержащие одну молекулу тимина, называются *моноаддуктами*, а содержащие две молекулы тимина – *диаддуктами* (сшивками в ДНК). Диаддукты являются основной причиной возникновения обнаруженного ранее летального действия на микроорганизмы УФ-облучения в присутствии псоралена, тогда как моноаддукты в большей степени ответственны за мутагенный эффект облучения. Репарация ДНК в случае моноаддуктов протекает легче, чем в случае сшивки. Однако, если доза ПУФА-воздействия велика или репарирующие системы клетки неполноценны, то клетки гибнут в результате возникновения даже

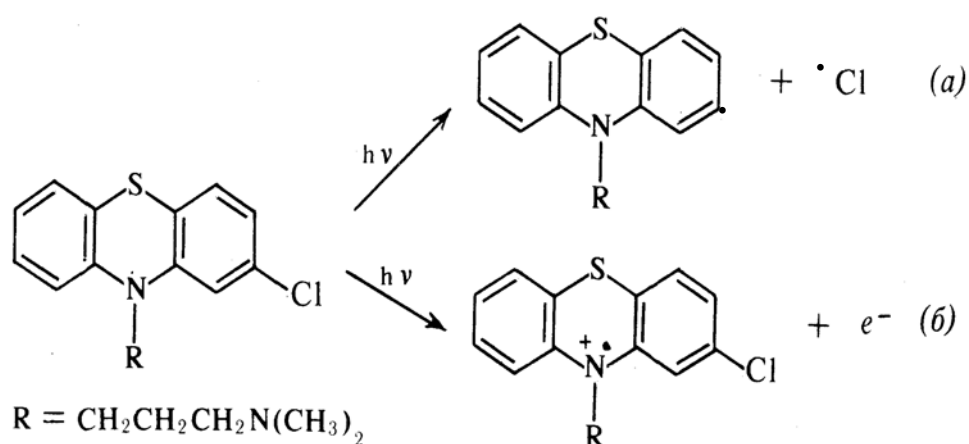


Рис. 3.2. Схема фотореакции хлорпромазина (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

малого числа аддуктов.

Примером фотосенсибилизированных реакций без участия кислорода могут служить также некоторые фотореакции

хлорпромазина. Хлорпро-

мазин используют для лечения психических заболеваний. Побочным эффектом терапии оказалось повышение чувствительности кожи пациентов к свету. Максимум спектра поглощения хлорпромазина в водных растворах расположен при 305 нм, хвост поглощения простирается в УФА-область спектра. Электронно-возбужденный хлорпромазин характеризуется высоким выходом триплетных состояний. Первичные фотопродукты в реакциях хлорпромазина – нейтральные свободные радикалы (рис. 3.2, а) или катион-радикалы и сольватированный электрон (рис. 3.2, б):

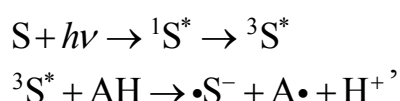
Эти нестабильные реакционноспособные фотопродукты могут реагировать с биомолекулами. Хлорпромазин с высокой эффективностью фотоприсоединяется к белкам через стадию образования нейтральных радикалов. Эта реакция лежит в основе фотоинактивации бактериофагов; меньшая роль в этом процессе принадлежит реакциям фотоприсоединения хлорпромазина к ДНК и РНК. Напротив, фотомутагенные эффекты хлорпромазина основаны главным образом на его реакциях с ДНК. УФА-облучение хлорпромазина, образовавшего комплексы с ДНК, способствует фотогенерации сольватированных электронов, а последние вызывают разрыв нитей ДНК.

Кислороднезависимых фотосенсибилизированных реакций известно сравнительно мало, хотя они участвуют в важных процессах. Основная часть фотосенсибилизированных процессов нуждается в присутствии кислорода.

3.3. Кислородзависимые фотосенсибилизированные реакции

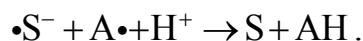
Как правило, в кислородзависимых фотосенсибилизированных реакциях участвуют триплетные возбужденные состояния ФС. В таких реакциях может происходить перенос электрона между органическим соединением и ФС, находящимся в триплетном состоянии. При этом в зависимости от пары сенсибилизатор – субстрат, происходит либо восстановление, либо окисление сенсибилизатора.

Фотовосстановление сенсибилизатора более вероятно, если субстрат является хорошим донором электронов. Схематично первичные события при этом выглядят следующим образом:

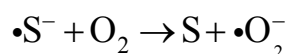


где S, ${}^1S^*$ и ${}^3S^*$ - сенсибилизатор в основном, синглетном и триплетном возбужденных состояниях соответственно; АН – окисляемая молекула; $\bullet S^-$ и $\text{А}\bullet$ - радикалы сенсибилизатора и субстрата.

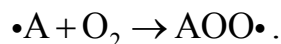
В отсутствие кислорода образующиеся радикалы рекомбинируют с генерацией исходных соединений, так что химические изменения в системе минимальны.



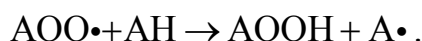
В присутствии кислорода свободные радикалы исчезают в одной из реакций:



или



Образовавшийся диоксид-радикал может вступать в дальнейшие (в том числе цепные) темновые реакции, приводящие к дополнительному повреждению субстрата:

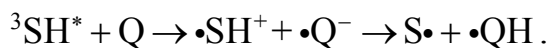


Дисмутация супероксид-радикалов приводит к формированию перекиси водорода:

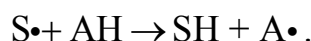


из которой в дальнейшем могут образовываться гидроксильные радикалы и другие активные формы кислорода, также участвующие в повреждении биологических субстратов.

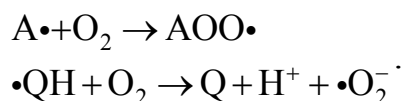
Реакции, в которых первичным является процесс *окисления* возбужденных молекул ФС акцептором электрона, например хиноном (Q), протекают по схеме:



Как можно видеть, на первом этапе происходит перенос электрона, а затем и протона от ФС к хинону. Эта реакция становится необратимой в присутствии второго субстрата окисления (АН), например ненасыщенных липидов и т.д.



Кислород резко усиливает деструктивные эффекты за счет последующих реакций:



Образовавшиеся радикалы могут включаться в разнообразные окислительные процессы. Таким образом, роль кислорода заключается в том, что он связывается с радикалами, первично образующимися в фотохимической реакции, делая ее необратимой. При этом образуются более стабильные продукты фотоокисления.

3.4. Синглетный кислород и другие активные формы кислорода

Производство *активных форм кислорода* (АФК) является неотъемлемым условием функционирования живых клеток в организмах человека и животных. Выявлен широкий спектр биологического действия АФК: их участие в деструкции молекул, клеток, тканей и органов; поражении организма, вызванном ишемией и реперфузией; канцерогенезе; старении; реализации функций фагоцитов и лимфоцитов; регуляции тонуса сосудов; клеточной пролиферации; воспалительных процессах и др.

Молекулярный кислород O_2 в основном состоянии обозначается (${}^3\Sigma_g^-$). Причина, по которой молекулярный кислород (диоксиген) обладает высокой реакционной способностью вообще и в реакциях с радикалами в особенности, заключена в необычной структуре его молекулярных орбиталей.

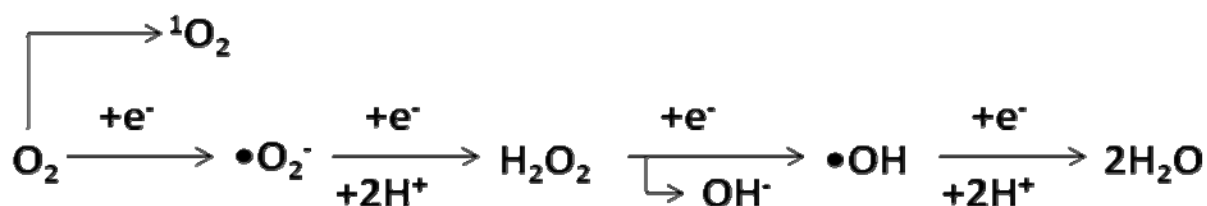
Еще в 1840-х годах М. Фарадей (M. Faraday) обнаружил, что кислород притягивается к магниту. Почти через 100 лет в 1925 г. Р.С. Малликен (R.S. Mulliken) объяснил магнитные свойства молекулярного кислорода на основе только что разработанных квантово-механических представлений. Его анализ показал, что кислород имеет два неспаренных электрона в нижнем электронном энергетическом состоянии, находящихся на разных молекулярных π -орбиталях.

Таким образом, основное состояние кислорода - бирадикальное, оно имеет два неспаренных электрона и является парамагнитным триплетным состоянием. Присутствие неспаренных валентных электронов в стабильной молекуле встречается в природе очень редко и определяет высокую реакционную способность молекулярного кислорода.

В живых организмах в процессе эволюции выработались специализированные ферментативные системы восстановления молекулярного кислорода посредством переноса на него одного, двух или четырех электронов. Все ферменты, восстанавливающие молекулярный кислород, представляют собой металлопротеины с активным центром, включающим один или несколько атомов (ионов) металла переменной валентности (Fe, Cu, Zn, Mo, Mn, Co). К ним относятся дыхательные белки (железосодержащие гемоглобин и миоглобин), оксидазы и оксигеназы¹⁰. Активный центр этих ферментов с входящими в него ионами служит донором электронов для кислорода.

При последовательном присоединении электронов к молекулярному кислороду образуются супероксидный анион-радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), пероксид водорода (H_2O_2) и гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$). Изменение спинового состояния электронов в молекуле кислорода может происходить и без присоединения электронов, например, при поглощении кванта света. При этом образуется синглетный кислород $^1\text{O}_2$, также обладающий свойствами окислителя (схема 3.3).

Схема 3.3. Образование активных форм кислорода (Артюхов В.Г., 2009).



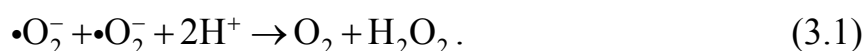
Основными источниками генерации супероксидного анион-радикала $\bullet\text{O}_2^-$ являются ферментативные системы: NADPH-оксидаза, ксантинооксидаза, митохондриальная цитохром-с-оксидаза, микросомальные монооксигеназы. Он образуется также как промежуточный продукт окисления тиолов, флавинов,

¹⁰ Оксидаза, оксигеназа – любые ферменты (или энзимы), являющиеся катализаторами в реакциях окисления-восстановления.

хинонов, катехоламинов, птеринов, в метаболизме ксенобиотиков¹¹. Образование $\bullet\text{O}_2^-$ в результате активации NADPH-оксидазы фагоцитов играет важную роль в реализации их микробицидного, цитотоксического и иммунорегуляторного действия. Генерация $\bullet\text{O}_2^-$ и других АФК ксантиноксидазой необходима для метаболизма железа, регуляции тонуса сосудов, клеточной пролиферации и др.

Время жизни супероксидного анион-радикала в биологических субстратах составляет $\sim 10^{-6}$ с, радиус действия – 0.3 мкм. Так как $\bullet\text{O}_2^-$ имеет заряд, он плохо мигрирует через мембраны. $\bullet\text{O}_2^-$ относительно слабый окислитель и во многих биосистемах выступает в роли донора электронов, восстанавливая ряд соединений.

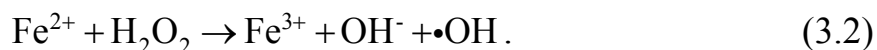
Предполагают, что $\bullet\text{O}_2^-$ либо взаимодействует с ДНК непосредственно, либо приводит к образованию вторичных радикалов, воздействующих на ее макромолекулу. Супероксидный анион-радикал может разрушать мембрану эритроцитов, ингибировать Ca^{2+} -АТФ-азу, синтез РНК и белка эндотелиальных клеток, индуцировать пероксидное окисление липидов через образование $\bullet\text{RO}_2$, HO_2^\bullet и др. В белках супероксидный анион-радикал участвует в окислении некоторых аминокислотных остатков. Уровень $\bullet\text{O}_2^-$ в клетке регулирует высокоспецифичный фермент супероксиддисмутаза (СОД), катализируя реакцию *дисмутации*:



Пероксид водорода H_2O_2 является наиболее стабильным из интермедиатов восстановления кислорода. Его можно получить прямым двухэлектронным восстановлением O_2 (с участием ксантиноксидазы или флавиновых оксидаз) или косвенным путем – одноэлектронным восстановлением кислорода с последующей дисмутацией $\bullet\text{O}_2^-$ (3.1) с участием или без участия СОД.

H_2O_2 относят к окислителям средней силы; в отсутствие некоторых ферментов и ионов металлов переменной валентности он относительно стабилен, способен мигрировать в клетки и ткани. Токсичность H_2O_2 проявляется в том, что он вызывает окисление тиолов и метионильных остатков белков, индуцирует пероксидное окисление липидов, в присутствии фермента участвует в образовании высокорекреационноспособных гипогалоидов (HOCl , HOBr , HOI), является источником возникновения чрезвычайно активного окислителя – гидроксильного радикала в реакции Фентона (H. Fenton):

¹¹ *Ксенобиотики* (от греч. ξενος) – условная категория для обозначения чужеродных для живых организмов химических веществ, естественно не входящих в биотический круговорот (пестициды, некоторые моющие средства, радионуклиды, синтетические красители, полиароматические углеводороды и др.). Попадая в окружающую природную среду, они могут вызвать повышение частоты аллергических реакций, гибель организмов, изменить наследственные признаки, снизить иммунитет, нарушить обмен веществ, нарушить ход процессов в естественных экосистемах вплоть до уровня биосферы в целом.



Клетки млекопитающих достаточно устойчивы к воздействию H_2O_2 благодаря наличию глутатионпероксидазы¹² и каталазы¹³, первая из которых эффективно работает при малых концентрациях H_2O_2 , вторая – при высоких.

В настоящее время $\bullet\text{O}_2^-$ и H_2O_2 уже не рассматриваются как агенты, вызывающие принципиальные морфологические и функциональные сдвиги в клетках, в связи с их низким окислительным потенциалом и наличием в биосистемах ферментов, участвующих в их дезактивации. По-видимому, токсичность супероксидного радикала и пероксида водорода усиливается в условиях интенсивного образования свободных радикалов и «истощения» ферментативных антиоксидантных систем клетки.

Гидроксильный радикал $\bullet\text{OH}$ является наиболее реакционноспособным из АФК: чрезвычайно реактивен в процессах акцептирования, донирования и переноса электронов, может разрывать любую $-\text{C}-\text{H}-$ или $-\text{C}-\text{C}-$ связь. Скорость его взаимодействия с большинством органических соединений достигает величин, равных скорости диффузии и обуславливает очень малые значения времени его жизни в биологических субстратах ($\sim 10^{-9}$ с), при этом радиус миграции составляет менее 10 нм, что сравнимо с размером органических молекул. Образование $\bullet\text{OH}$ отмечено в реакциях окисления арахидоновой кислоты, в реакции Габер-Вейса (F. Haber - J. Weiss) (3.3), при микросомальном окислении, в реакциях с флавиновыми ферментами и коферментом Q, при воздействии на биосистемы ионизирующей радиации.



Основным источником гидроксильного радикала служит реакция Фентона (3.2) с участием металлов переменной валентности, главным образом с Fe^{2+} .

Для $\bullet\text{OH}$ характерны три основных типа реакций: отрыв атома водорода от органической молекулы, присоединение к молекуле по двойной связи и перенос электрона. К первому типу реакций относится взаимодействие с фосфатидилхолином биомембран¹⁴, которое является основной реакцией при иницировании пероксидного окисления липидов, а также с сахарами, входящими в состав нуклеиновых кислот. Образующиеся продукты обладают

¹² *Глутатионпероксидазы* - семейство ферментов, защищающих организм от окислительного повреждения, катализируя восстановление перекисей липидов в соответствующие спирты и восстановление пероксида водорода до воды.

¹³ *Каталаза* (от греч. *Katalyo* - разрушаю) - фермент из группы гидропероксидаз, катализирующий окислительно-восстановительную реакцию, в ходе которой из двух молекул пероксида водорода образуются вода и кислород.

¹⁴ *Фосфатидилхолины* — группа фосфолипидов, содержащих холин, одни из самых распространенных молекул клеточных мембран.

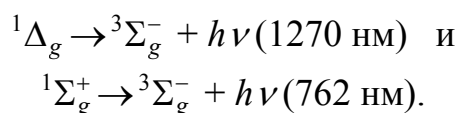
мутагенными свойствами. Примером второго типа реакций служит взаимодействие с пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями¹⁵, приводящее к накоплению вторичных радикалов, повреждающих компоненты нуклеотидов и вызывающих разрывы цепей нуклеиновых кислот.

Таким образом, •ОН обладает сильным цитотоксическим, канцерогенным и мутагенным действием на биосистемы.

Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ отличается от других АФК тем, что для его получения требуется лишь поглощение энергии без химической модификации кислородных молекул. Открытие абсорбционных полос, обусловленных заселением синглетных уровней молекулярного кислорода, связано с классическими работами В.Х. Волластона (W.H. Wollaston) (1801) и Й. Фраунгофера (J. Fraunhofer) (1814), обнаруживших серию темных полос (фраунгоферовых линий) в спектре излучения Солнца. Г.Р. Кирхгоф (G.R. Kirchhoff) (1858) установил, что фраунгоферовы линии – следствие поглощения солнечного света газами атмосферы, причем полоса при 760 нм принадлежит атмосферному кислороду. В 1928 г. Р. Малликен пришел к заключению, что полоса при 760 нм возникает при электронном переходе с основного триплетного уровня кислорода, обозначаемого как $^3\Sigma_g^-$, на возбужденный синглетный уровень $^1\Sigma_g^+$. В 1933 г. была обнаружена еще одна полоса поглощения кислорода, на этот раз в инфракрасной области спектра (при 1270 нм), обусловленная переходом из состояния молекулы кислорода $^3\Sigma_g^-$ в состояние $^1\Delta_g$.

Помимо указанных триплет-синглетных электронных переходов, в молекуле кислорода наблюдается триплет-триплетный переход $^3\Sigma_g^- \rightarrow ^3\Sigma_u^-$, который соответствует поглощению при длинах волн короче 200 нм.

В 1947 г. Дж. Каплан (J. Kaplan) зарегистрировал свечение при электрическом разряде в содержащем кислород газообразном азоте на длине волны 762 нм. Впоследствии эта полоса (а также полоса 1270 нм) была зарегистрирована в спектрах послесвечения атмосферы – слабой люминесценции, возникающей на высотах от 60 до 250 км над поверхностью Земли. Излучение при 1270 и 762 нм обусловлено дезактивацией соответственно $^1\Delta_g$ и $^1\Sigma_g^+$ синглетных состояний молекулярного кислорода:

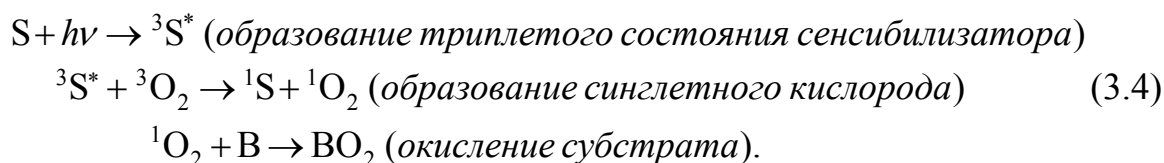


Люминесценция при 1270 нм является единственным прямым методом («золотым стандартом») определения синглетного кислорода в растворах.

Кислород может участвовать в фотосенсибилизированных реакциях другим способом – за счет тушения им триплетных возбужденных состояний

¹⁵ К пуриновым основаниям относятся аденин, гуанин, к пиримидиновым - урацил, цитозин, тимин, входящие в состав нуклеиновых кислот.

сенсibilизатора и образования электронно-возбужденного (синглетного) молекулярного кислорода, который вступает затем в дальнейшие химические реакции с субстратами окисления. Эти процессы можно представить в форме химических уравнений:



Важная роль возбужденного кислорода в фотосенсibilизированных реакциях была продемонстрирована еще в 1931 г. доцентом Гейдельбергского университета Г. Каутским (H. Kautsky). В опытах Г. Каутского изучалась реакция фотохимического превращения предварительно обесцвеченного красителя (лейкоформы) малахитового зеленого в окрашенную (ярко-зеленую) форму под действием света, поглощаемого другим красителем - трипафлавином. Идея этого эксперимента заключалась в том, что оба красителя были адсорбированы на разных гранулах силикагеля и непосредственно друг с другом не контактировали. В отсутствие кислорода в смеси гранул никакого образования малахитового зеленого не наблюдалось, тогда как в присутствии кислорода воздуха шло образование малахитового зеленого из лейкоформы.

Г. Каутский очень точно объяснил полученные результаты тем, что происходит перенос энергии с оптически возбужденного трипафлавина на молекулярный кислород, а образовавшийся возбужденный кислород окисляет лейкоформу малахитового зеленого.

Гранулы силикагеля, пропитанные красителем, используются для получения синглетного кислорода и в наши дни. В настоящее время доказана широкая распространенность фотосенсibilизированных реакций с участием 1O_2 . Синглетный кислород в растворах генерируется многими красителями, например, метиленовым синим, эозином, бенгальским розовым, протопорфирином, антраценом и др.

1O_2 (радиус действия ~ 0.3 мкм) легко окисляет ненасыщенные соединения, образуя гидропероксиды, диоксетаны, эндопероксиды и др. В белках и пептидах основными мишенями служат шесть аминокислотных остатков: триптофан, гистидин, метионин, тирозин, цистеин, фенилаланин. Биологические последствия окисления синглетным кислородом многообразны: повреждение структуры биомембран, приводящее, в частности, к гемолизу эритроцитов; инактивация ферментов; индукция эритемы и отека кожи и др.

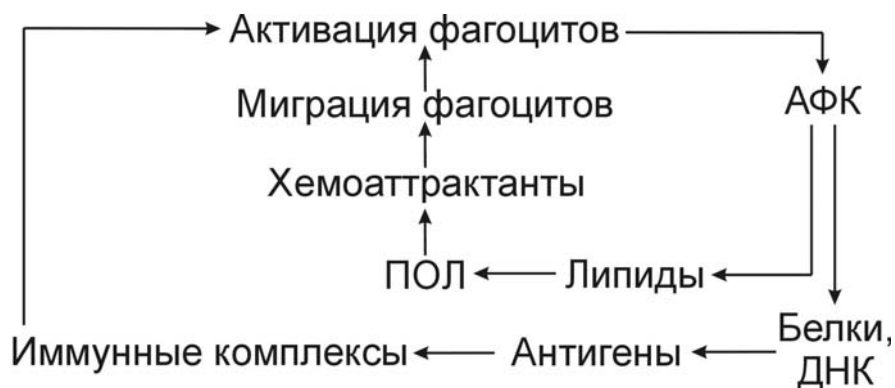
К АФК относятся также NO-радикал, пероксинитрит $ONOO^{\cdot}$, гипогалоиды. В роли эндогенных свободных радикалов, образующихся в реакциях клеточного метаболизма, могут выступать не только выше названные производные молекулярного кислорода, но и некоторые радикальные продукты их взаимодействия с клеточными компонентами: пероксидные радикалы $\bullet RO_2$, алкоксильные радикалы $\bullet RO$.

NO-радикал (NO•) вырабатывается ферментативно NO-синтазой фагоцитов и гладкомышечных клеток сосудов и выполняет роль расслабляющего фактора для стенок сосудов. NO• обладает высокой скоростью проникновения через клеточную мембрану и длительным временем жизни (несколько секунд). В клетке NO• взаимодействует с низкомолекулярными тиолами, образуя моно- и динитрозильные комплексы, токсичные для клетки. Например, мононитрозоглутатион может вызвать программируемую гибель клетки – апоптоз.

Пероксинитрит ONOОН вызывает вазоконстрикцию (сужение сосудов), агрегацию тромбоцитов, адгезию гранулоцитов клетками эндотелия, их миграцию в очаг повреждения. Действие высокотоксичного пероксинитрита направлено против экзогенных микроорганизмов и эндотелиальных клеток сосудов, в результате чего повышается их проницаемость.

Таким образом, высокореакционноспособные молекулы АФК являются важными факторами микробицидного, цитотоксического и мутагенного действия фагоцитов. Модификация азотистых оснований ДНК может приводить к образованию аутоантител к трансформированной ДНК и индукции аутоиммунных процессов. Модификация белков в условиях повышенного синтеза АФК также вызывает появление у них антигенных свойств. Пероксидное окисление липидов (ПОЛ) приводит к синтезу хемоаттрактантов, усиливающих миграцию фагоцитов в очаг воспаления. Так происходит запуск замкнутого круга реакций (схема 3.4):

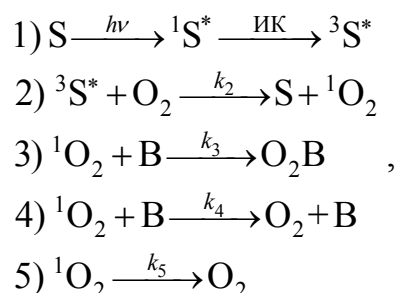
Схема 3.4. Цикл реакций, возникающих в присутствии активных форм кислорода (Артюхов В.Г., 2009).



Постоянное образование АФК (называемых еще прооксидантами) в живых организмах находится в равновесии с их дезактивацией антиоксидантами, что лежит в основе внутриклеточного механизма регуляции метаболических процессов – редокс-регуляции. Сдвиг баланса антиоксидантов и прооксидантов в тканях в сторону прооксидантов называют окислительным (или окислительным) стрессом. Следствием окислительного стресса является окислительное повреждение тканей, приводящее к возникновению патологических состояний.

3.5. Кинетический анализ реакций фотосенсибилизированного окисления

Если имеется вероятность участия синглетного кислорода в фотосенсибилизированной реакции, то значения констант скоростей отдельных стадий этих реакций уточняются путем анализа кинетики процесса. Последовательность реакций можно представить в следующем виде:



где ИК – интеркомбинационная конверсия.

Синглетный кислород может взаимодействовать с субстратом [B] химически, окисляя его (реакция 3), или физически (реакция 4), а также ${}^1\text{O}_2$ может спонтанно дезактивироваться (реакция 5). В стационарном режиме облучения концентрация ${}^1\text{O}_2$ будет постоянна, т.е. скорость изменения концентрации ${}^1\text{O}_2$ равна нулю:

$$\frac{d[{}^1\text{O}_2]}{dt} = 0 = \Phi_{\Delta}(I_0 - I) - \{k_5 + (k_3 + k_4)[\text{B}]\}[{}^1\text{O}_2], \quad (3.5)$$

где Φ_{Δ} - квантовый выход генерации ${}^1\text{O}_2$; $(I_0 - I)$ – интенсивность поглощенного света (скорость поглощения на единицу длины); k_3 , k_4 и k_5 – константы скоростей химического и физического тушения ${}^1\text{O}_2$ субстратом, а также спонтанной дезактивации ${}^1\text{O}_2$. Квантовый выход Φ окисления субстрата с учетом уравнения (3.5) равен

$$\Phi = \frac{k_3[\text{B}][{}^1\text{O}_2]}{I_0 - I} = \frac{\Phi_{\Delta}k_3[\text{B}]}{k_5 + (k_3 + k_4)[\text{B}]}. \quad (3.6)$$

Из (3.6) видно, что Φ зависит от концентрации субстрата и что эта зависимость нелинейная.

Преобразуем уравнение (3.6), введя две новые величины:

$$\Psi_{\infty} = k_3/(k_3 + k_4)$$

и

$$\beta = k_5/(k_3 + k_4)$$

Ψ_{∞} - доля химических реакций во всех актах тушения $^1\text{O}_2$ субстратом, т.е. доля всего синглетного кислорода, фотогенерированного в системе, истраченная на химическое окисление при $[\text{B}] \rightarrow \infty$, когда скоростью реакции 5 – дезактивации $^1\text{O}_2$ растворителем – можно пренебречь. Квантовый выход фотоокисления при бесконечно высокой концентрации субстрата Φ_{∞} , равный

$$\Phi_{\infty} = \Phi_{\Delta} \Psi_{\infty}, \quad (3.7)$$

можно назвать *предельным квантовым выходом* данной фотосенсибилизированной реакции.

Параметр β численно равен концентрации субстрата, при которой скорость спонтанной дезактивации $^1\text{O}_2$ растворителем (реакция 5) и скорость тушения $^1\text{O}_2$ субстратом (реакции 3 и 4) равны. В итоге получаем:

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\beta}{\Phi_{\infty} [\text{B}]} + \frac{1}{\Phi_{\infty}}. \quad (3.8)$$

По величине отсечки на оси абсцисс (рис. 3.3) находят величину β . По отсечке на оси ординат определяют Φ_{∞} . Величина, обратная β , является мерой эффективности взаимодействия $^1\text{O}_2$ с субстратом в данном растворителе:

$$\frac{1}{\beta} = \tau_{\Delta} (k_3 + k_4). \quad (3.9)$$

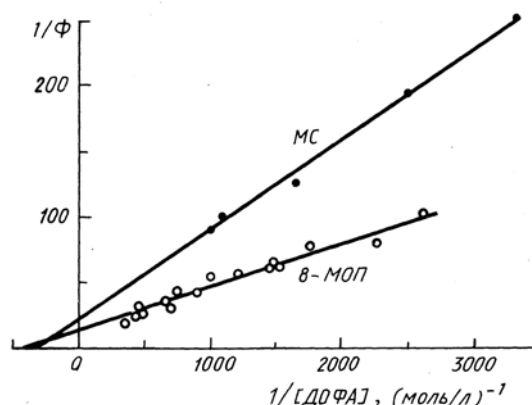


Рис. 3.3. Зависимость квантового выхода фотолиза (Φ) от концентрации диоксифенилаланина (ДОФА), фотосенсибилизированного 8-метоксипсораленом (8-МОП) и метиленовым синим (МС), представленная в обратных координатах (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

Величина Φ_{∞} , как видно из уравнения (3.7), зависит как от свойств ФС, так и от субстрата окисления. Действительно, она является произведением квантового выхода генерации синглетного кислорода фотосенсибилизатором Φ_{Δ} и величины Ψ_{∞} , которая указывает, какая доля всех молекул субстрата, тушащих $^1\text{O}_2$, подвергается химическому превращению. Квантовые выходы генерации синглетного кислорода при освещении растворов различных ФС могут быть измерены на основании регистрации люминесценции синглетного кислорода.

Зная экспериментально найденные Φ_{∞} и Φ_{Δ} , можно рассчитать по

уравнению (3.7) величину Ψ_{∞} , которая, как и β , характеризует субстрат окисления. Но если $1/\beta$ характеризует эффективность субстрата как тушителя синглетного кислорода, то Ψ_{∞} показывает, насколько эффективно это взаимодействие с $^1\text{O}_2$ сопровождается химическим разрушением субстрата.

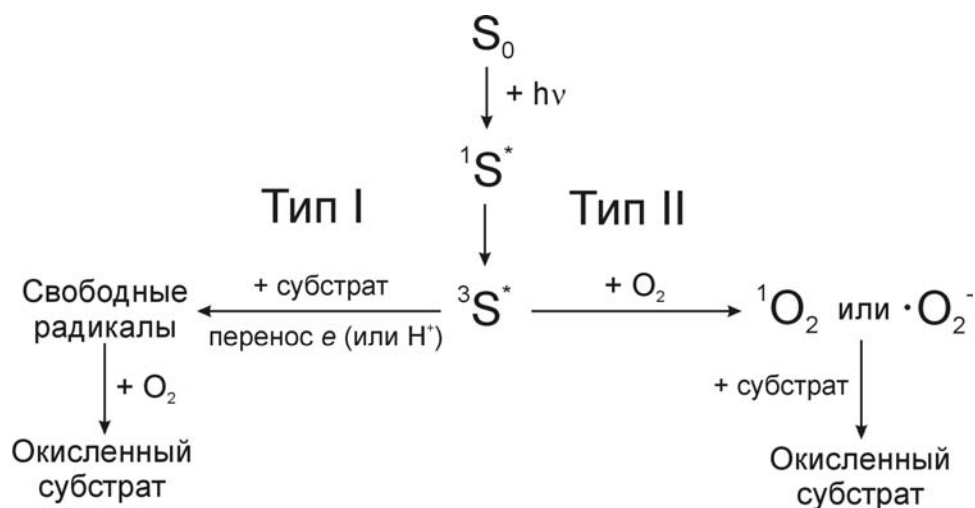
3.6. Классификация реакций фотосенсибилизированного окисления

К.С. Фут (C.S. Foote) предложил все фотосенсибилизированные окислительные реакции разделять на два типа (схема 3.5).

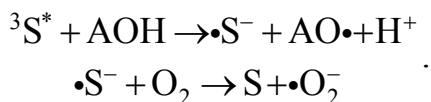
К *типу I* относятся реакции, в которых ФС в триплетном возбужденном состоянии ($^3\text{S}^*$) первоначально взаимодействует непосредственно с субстратом, а не с молекулярным кислородом.

В реакциях *типа II* ФС в триплетном возбужденном состоянии на первичных стадиях взаимодействует с молекулярным кислородом.

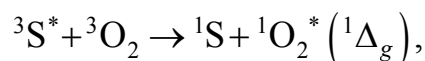
Схема 3.5. Типы фотосенсибилизированных окислительных реакций (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).



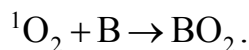
К первому типу относятся описанные разделе 3.3 кислородзависимые реакции фотосенсибилизированного 8-МОП окисления антиоксиданта α -токоферола (АОН):



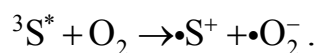
В реакциях типа II чаще всего происходит перенос энергии с ФС в триплетном состоянии на молекулярный кислород:



во взаимодействии с субстратом участвует возбужденный синглетный кислород, окисляя последний:



Значительно реже может происходить отрыв электрона от возбужденного ФС с образованием супероксид-аниона:



В последующих реакциях окисления субстрата участвуют уже супероксид-анион и образующиеся из него другие АФК.

Соотношение между процессами типа I и типа II в реакциях фотосенсибилизированного окисления в большой степени зависит от условий эксперимента. Например, гематопорфирин в водных растворах или в мицеллах сенсибилизирует фотоокисление триптофана путем прямой реакции (без ${}^1\text{O}_2$) в том случае, если концентрация триптофана высока, тогда как при низкой концентрации реакция идет с участием ${}^1\text{O}_2$. Связывание сенсибилизаторов с биологическим субстратом обычно способствует протеканию реакций с прямым участием триплетных возбужденных состояний сенсибилизатора. Например, метиленовый синий, связавшийся с эпидермисом кожи, перестает генерировать синглетный кислород. Генерация ${}^1\text{O}_2$ гематопорфирином при связывании с эпидермисом ослабляется более чем в два раза по сравнению с водным мицеллярным раствором и почти в 10 раз – по сравнению с раствором в этаноле. Одновременно возрастает удельный вклад в процесс фотосенсибилизированного окисления свободнорадикальных реакций (тип I).

4. ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КОЖЕ

К фотобиологическим процессам, происходящим в коже с участием эндогенных хромофоров, относятся эритема и эдема кожи, пигментация, синтез витамина D, индукция рака кожи (фотоканцерогенез), фотоаллергия и фотоиммуносупрессия и др.

4.1. Эритема

Эритема – это стойкое покраснение кожи, возникающее вследствие расширения кровеносных сосудов кожи – гиперемии. Спектры действия эритемы, индуцируемой ультрафиолетом, изучают и измеряют, начиная с 20-х гг. XX в. Однако интерпретация этих спектров представляет достаточную сложность. Получение спектров действия эритемы рассмотрено в разделе 2.3. В настоящее время стало ясно, что не существует одного «стандартного» спектра действия эритемы – он может быть суммой двух или трех компонентов. Кроме того, форма спектра действия будет зависеть от времени, прошедшего между облучением и регистрацией покраснения кожи.

Эритему принято разделять на три типа: УФА, УФВ и УФС в зависимости от диапазона УФ излучения, порождающего эритему. Типы эритемы различаются по механизму возникновения и развития. Вероятно, что акцепторами квантов в этих трех случаях являются разные хромофоры, находящиеся к тому же в коже на разной глубине. Однако до сих пор нет сколько-нибудь ясных указаний на природу этих хромофоров.

Существует предположение, что первичными акцепторами действующих квантов являются белки, имеющие максимум поглощения при 280 - 285 нм. Однако в стандартном спектре действия около 280 нм находится не максимум, а провал (рис. 1.9). Возможно, что этот провал возникает из-за экранирующего эффекта белков рогового слоя эпидермиса.

Возможно, что максимум при 292 - 294 нм в спектре действия обусловлен присутствием антиоксиданта α -токоферола, имеющего максимум в спектре поглощения при 292 нм. После фотохимических реакций в коже развиваются темновые биохимические реакции, в первую очередь процесс пероксидного окисления ненасыщенных липидов, являющийся начальным звеном эритемной реакции кожи. Антиоксидант ингибирует не фотохимическую стадию эритемы, а темновые биохимические реакции которые и приводят к расширению сосудов дермы – *вазодилатации*. Для возникновения УФВ-эритемы необходимо фотохимически разрушить антиоксиданты в коже.

Несомненно, что ответ кожи на УФ-облучение не ограничен только фотохимическими превращениями определенных молекул, а включает в себя

также активацию клеток и выброс интермедиатов в систему микроциркуляции.

Известно, что в коже в результате ряда ферментативных реакций из полиненасыщенных жирных кислот образуются простагландины. Механизм возникновения вазодилатации может быть связан с сосудорасширяющим действием простагландинов, количество которых возрастает в эпидермисе после УФВ-облучения.

Следовательно, в первые часы важнейшую роль играют процессы перекисидации липидов, а затем продукты окисления липидов активизируют синтез простагландинов.

Важно отметить, что темновые стадии УФС- и УФА-эритемы иного характера, чем УФВ-эритемы. Так, оксиданты не снимают действия УФС-излучения, а УФА-эритема не подавляется антипростагландиновыми агентами.

Для УФВ- и УФС-эритемы характерно явление *фотореактивации*. Установлено, что если после УФВ или УФС-облучения кожу осветить видимым светом, то эритемный эффект уменьшается. Явление фотореактивации хорошо изучено на микроорганизмах. Оно заключается в активации видимым светом фермента, восстанавливающего поврежденную ультрафиолетом структуру ДНК в участках возникновения тиминовых димеров. В последние годы такой фермент обнаружен в клетках кожи человека. Однако роль УФ-повреждения ДНК в индукции эритемы остается неясной.

4.2. Пигментация кожи

Пигментация кожи – фотобиологический процесс, приводящий к образованию пигмента меланина, защищающего кожу от фотоповреждения.

Известны три механизма его защитного действия. Во-первых, пигмент поглощает фотоны и как экран ослабляет интенсивность действующего излучения. Во-вторых, меланин является перехватчиком свободных радикалов, образующихся при облучении кожи. Наконец, в-третьих, меланин связывает ионы двухвалентного железа, которые катализируют процесс пероксидного окисления липидов. Тем самым меланин ингибирует цепные реакции пероксидного окисления липидов и другие свободнорадикальные реакции.

Различают два вида процессов пигментации. Один из них – непрямая пигментация, начинающаяся вслед за эритемой через 2-3 сут. после облучения. Другой вид – прямая пигментация – возникает непосредственно сразу под лучами.

4.2.1. Непрямая пигментация (загар)

Непрямую пигментацию называют также *замедленной*, т.к. она начинается через 2-3 сут. после облучения, на 13-21-й день достигает максимума и

затем угасает за несколько месяцев. Первичные стадии возникновения загара до сих пор не ясны. Ультрафиолет каким-то образом запускает сложную цепь темновых реакций биосинтеза меланина. Непрямая пигментация активируется излучением с $\lambda < 320$ нм. Спектр действия загара близок к спектру действия эритемы. Под действием УФВ-излучения в коже в ходе темновых биохимических реакций активируется фермент тирозиназа, участвующий в превращении тирозина в меланин (рис. 4.1).

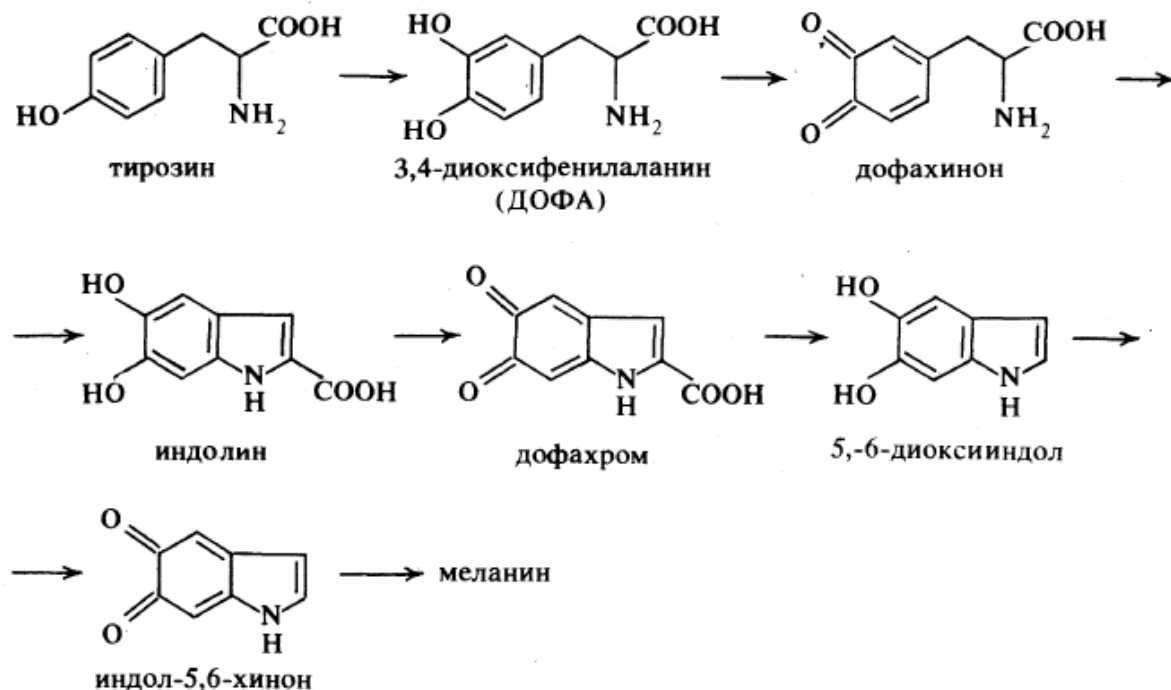


Рис. 4.1. Фотопревращение тирозина в меланин (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

Две первые стадии образования меланина проходят с участием ферментов. Последующие реакции легко осуществляются спонтанно с участием супероксид-аниона и других свободных радикалов.

Оказалось, что большие дозы коротковолнового УФС-излучения (254 нм) блокируют пигментообразование под действием естественного солнечного света. Эффект блокирования загара сохраняется 1-1.5 месяца и связан, вероятно, с повреждением аппарата меланогенеза.

Синтез меланина осуществляется в специальных органеллах меланоцитов¹⁶ – меланосомах. Под действием УФ-излучения возникает следующая цепь событий (см. рис. 4.2):

- 1) активизируется пролиферация меланоцитов;
- 2) меланоциты гипертрофируются и выпускают разветвленные цитоплазматические выросты – псевдоподии;

¹⁶ Меланоциты – клетки базального слоя, содержащие меланосомы – гранулы с меланином. Эти клетки содержат также фермент тирозиназу, участвующий в превращении тирозина в меланин.

- 3) увеличивается число меланосом;
- 4) растёт скорость образования меланина в меланосомах;
- 5) усиливается перенос меланосом в кератиноциты, что совпадает с увеличением скорости деления и смены кератиноцитов;
- 6) возрастает размер меланосом (особенно выраженный у представителей кавказской и монголоидной рас);
- 7) в эпидермисе повреждаются ингибирующие тирозиназу сульфгидрильные соединения, за счёт чего возрастает активность этого фермента.

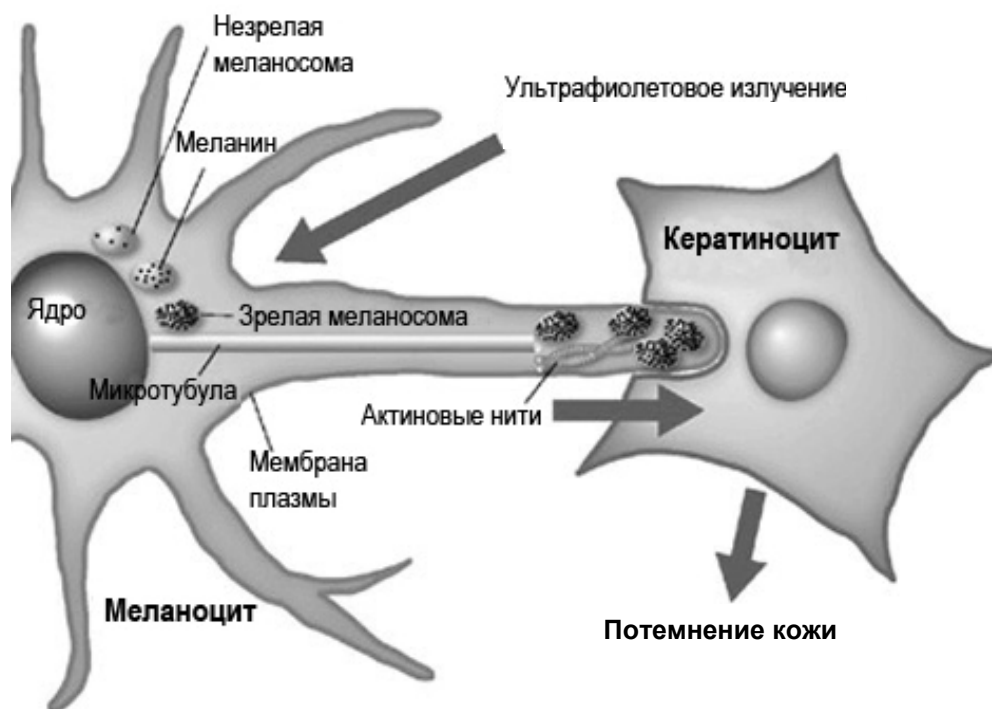


Рис. 4.2. Пигментация кожи под действием ультрафиолета (по www.riken.go.jp).

4.2.2. Прямая (немедленная) пигментация

Прямая пигментация – возникает непосредственно сразу под лучами, за 1-2 ч. достигает максимума и уменьшается через 3-24 ч. после облучения. Прямая пигментация никогда не приводит к сильному потемнению кожи. Спектр ее действия представляет собой широкую неструктурированную полосу в области 300 - 700 нм с максимумом около 400 - 480 нм.

Механизм прямой пигментации включает в себя прямое фотохимическое окисление восстановленного предшественника меланина в меланин. Этот процесс осуществляется в меланоцитах через образование семихинонов. Как показало электронно-микроскопическое исследование, в некоторой степени потемнение кожи в ходе прямой пигментации происходит за счёт активного передвижения меланосом в псевдоподии меланоцитов. Новые меланосомы при этом не образуются.

Хотя прямая пигментация и не бывает очень интенсивной, но благодаря ей частичная защита от УФ излучения осуществляется уже непосредственно во время воздействия луча света.

4.3. Синтез витамина D₃

Витамин D на самом деле гормон, а не витамин. Обеспечение организма животных и человека витамином D происходит двумя путями: за счёт эндогенного образования в коже под воздействием УФ-лучей и за счёт усвоения экзогенного витамина D в кишечнике из пищи.

Активность препаратов витамина D выражается в международных единицах (МЕ): 1 МЕ содержит 0.000025 мг (0.025 мкг) химически чистого витамина D. 1 мкг = 40 МЕ.

Витамины группы D образуются под действием ультрафиолета в тканях животных и растений из стероидов. К витаминам группы D относятся:

- витамин D₂ – эргокальциферол, выделен из дрожжей, его провитамином является эргостерин;
- витамин D₃ – холекальциферол, выделен из тканей животных, его провитамин - 7-дегидрохолестерин (7-ДГХ);
- витамин D₄ - 22,23-дигидро-эргокальциферол;
- витамин D₅ - 24-этилхолекальциферол (ситокальциферол), выделен из масел пшеницы;
- витамин D₆ - 22-дигидроэтилкальциферол (стигма-кальциферол).

Сегодня витамином D называют два витамина - D₂ и D₃ - эргокальциферол и холекальциферол - это кристаллы без цвета и запаха, устойчивые в воздействию высоких температур. Эти витамины являются жирорастворимыми, т.е. растворяются в жирах и органических соединениях и нерастворимы в воде. D₃ - единственная форма витамина D в коже.

Эндогенное образование витамина D₃ это достаточно сложный процесс, состоящий из нескольких стадий (схема 4.1):

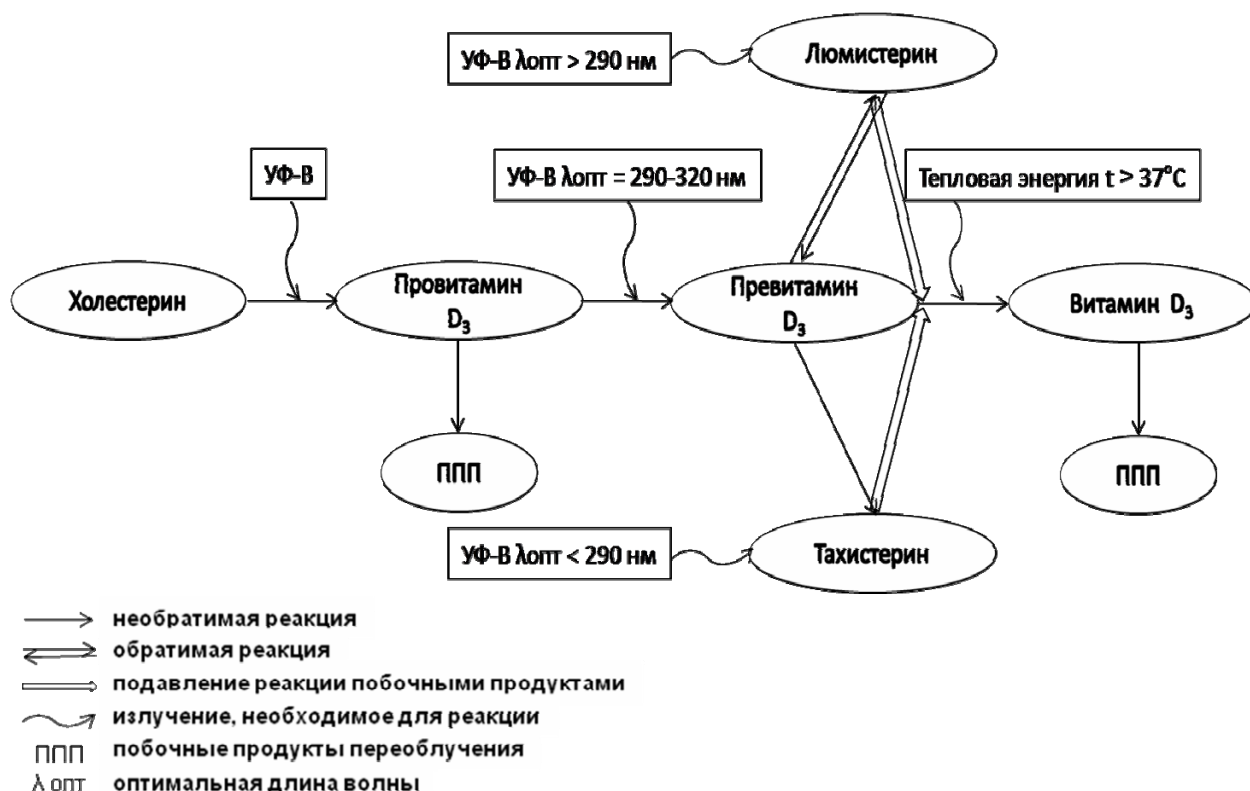
- биосинтез холестерина;
- превращение холестерина в провитамин D₃: 7-ДГХ;
- образование превитамина D₃ в ходе неферментативной, зависимой от УФ-света фотохимической реакции;
- термическая трансформация превитамина D₃ в витамин D₃.

Затем эндогенный витамин D₃ (и его метаболиты) из кожи и (или) поступивший с пищей витамин D₃ с помощью D-связывающего белка, выполняющего транспортную функцию, поступает на последующие этапы в печень, почки, где происходит синтез гормона кальцитриола. Кальцитриол выполняет целый ряд функций, основные из которых связаны с усвоением кальция, с формированием и регуляцией минерализации костной ткани.

При достаточной и регулярной инсоляции потребность человека в витамине D полностью обеспечивается фотохимическим синтезом в коже. Вот

почему витамин D_3 называют «солнечным витамином». Именно фотохимические стадии во многих аспектах являются определяющими и лимитирующими в деятельности D -гормональной системы. Пищевой источник витамина D выполняет лишь компенсирующую роль в случаях дефицита эндогенного витамина.

Схема 4.1. Реакции синтеза витамина D_3 в коже



Активность фотохимических стадий синтеза витамина D_3 находится в прямой зависимости от интенсивности, а также спектрального состава УФ-облучения и в обратной - от степени пигментации (загара) кожи. Наличие пигмента при сформированном загаре существенно увеличивает время достижения максимума накопления превитамин D_3 в коже, вместо 15 мин - 3 часа

Летний загар и зимняя депигментация людей в северных широтах позволяют регулировать интенсивность образования витамина D_3 в коже. На синтез витамина D_3 в коже влияет также высота местности над уровнем моря, ее географическое положение, время дня и площадь воздействия света. Когда все тело подвергается воздействию солнечных лучей в дозе, вызывающей легкую эритему, содержание витамина D , в крови увеличивается так же, как после приема внутрь 10000 МЕ витамина D_3 .

Одна из версий развития цивилизации (с юга на север, от чёрного цвета кожи к белому) говорит, что естественный отбор по цвету кожи способствовал образованию белой расы. На севере селекция шла в направлении белого цвета кожи в связи с необходимостью компенсации недостатка солнечного

излучения и дефицита витамина, что могло быть причиной рахита и других заболеваний. А в южных широтах тёмный цвет кожи был необходим для защиты от избытка УФ-лучей.

Фотохимический процесс синтеза витамина D₃ происходит только под воздействием на кожу световой и тепловой энергии с определёнными характеристиками. Реакции данного процесса являются неферментативными, т.е. абсолютно не зависят от присутствия и активности ферментов. Исходным субстратом реакции синтеза витамина D₃ является провитамин D₃. Более 80% продукции витамина D₃ в коже происходит в эпидермисе, а остальное количество в дерме. Снижение синтеза витамина D₃ в коже с возрастом, вероятно, является результатом локального дефицита субстрата. Концентрация 7-ДГХ в эпидермисе в возрастном интервале от 20 до 80 лет снижается приблизительно на 50%, что отрицательно сказывается на балансе кальция и других функциональных свойствах D-гормональной системы.

Процесс синтеза витамина D₃ в коже принято делить на две стадии (рис 4.3):

1. Образование превитамина D₃ из провитамина D₃.
2. Образование витамина D₃ из превитамина D₃.

Первая стадия этого процесса



Провитамин D₃ → Превитамин D₃

происходит при воздействии световой энергии УФВ-лучей на провитамин D₃.

Наиболее оптимальным излучением для синтеза превитамина D₃ являются лучи с длиной волны 290-320 нм (средняя часть УФВ-лучей). Волны данного диапазона поглощаются конъюгированными двойными связями C₅ и C₇ 7-ДГХ, что приводит к фрагментации кольца В между C₉ и C₁₀ с образованием 9,10-секостерола (*секо* означает расщепление) провитамина D₃ (рис. 4.3). Превитамин D₃ биологически инертен, но термолабилен и спонтанно подвергается зависимой от температуры молекулярной перестройке на участке своей конъюгированной триеновой системы (три двойные связи) с образованием термостабильного 9,10-секостерола, витамина D₃. При температуре тела полное превращение превитамина D₃ в витамин D₃ происходит примерно за 3 дня. Резкие изменения температуры поверхности кожи не влияют на скорость

Рис. 4.3. Фотобиогенез и метаболический путь образования витамина D.

этого превращения, так как оно происходит в активно растущих слоях эпидермиса, где температура относительно постоянна; изменения температуры внутренних структур организма также слабо влияют на эту реакцию. Превитамин D₃ является достаточно неустойчивым соединением, из которого под воздействием различных факторов могут образоваться различные соединения (схема 4.1):

- Витамин D₃ - в процессе термической изомеризации при температуре > 37°C (без участия дальнейшего облучения);
- Люмистерин - при воздействии светового излучения с длиной волны более 290 нм;
- Тахистерин - при воздействии светового излучения с длиной волны менее 290 нм; при этом, чем короче длина волны (область УФ-С), тем более интенсивно происходит синтез тахистерина.

По-видимому, люмистерин и тахистерин можно рассматривать и как побочные продукты биосинтеза витамина D₃ и как факторы регуляции, тормозящие избыточное образование витамина D₃, т.е. как факторы защиты организма от гипervитаминоза.

Известно, что тахистерин является токсичным и легко окисляемым соединением, а люмистерин не обладает D-витаминной активностью, но способствует проявлению физиологической активности витамина D₃. Кроме того, при избыточном УФ-облучении (особенно коротковолновой частью УФ-спектра) на разных этапах могут образовываться, так называемые, побочные продукты переоблучения (или деградации): из провитамина D₃ - токсистерины и бихолестадиенолы, а из самого витамина D₃ - супрастерины и другие соединения (на схеме 4.1 не показаны).

Теоретически процесс образования витамина D₃ в естественных условиях можно представить следующим образом: из провитамина D₃ под воздействием УФВ-лучей образуется превитамин D₃, который превращается в витамин D₃ при температуре 37°C; и только по мере накопления витамина D₃ (как конечного продукта реакции Пре D₃ → Вит D₃) происходит образование побочных продуктов люмистерина и тахистерина с относительным преобладанием первого, что связано с соответствующим преобладанием длинноволнового излучения (УФА и УФВ) над коротковолновым (УФС) в естественном солнечном свете.

Остается только невыясненным вопрос: откуда может появиться достаточная тепловая энергия для стадии Пре D₃ → Вит D₃? Поскольку температура в базальном слое эпидермиса, где происходит этот процесс, значительно ниже требуемой, по-видимому, можно определить несколько источников тепла для этой реакции. Во-первых, это энергия самого света, тепловая составляющая которой растёт по мере увеличения длины волны. Во-вторых, это разогрев кожи при интенсивной физической нагрузке. В-третьих, это гипертермия кожи, которая сопровождает воспалительную эритемную реакцию кожи на воздействие УФВ-лучей.

Из всех перечисленных источников, только эритема является местным и обязательным процессом, происходящим параллельно со стадиями фотохимического синтеза в ответ на УФВ-излучение. Следовательно, если объединить представления о эритемном воздействии УФВ-лучей, о синтезе меланина и о фотохимических процессах образования витамина D₃ можно нарисовать следующую картину: УФВ-излучение инициирует образование превитамина D₃ из провитамина D₃, запускает процессы эритемного ответа организма. При этом эритемная воспалительная реакция необходима для синтеза меланина, а гипертермия эритемы способствует активизации химической трансформации превитамина D₃ в витамин D₃.

Можно предположить, что эритема является естественной физиологической реакцией организма необходимой одновременно для создания защиты кожи от последующих доз УФ-излучения (образование загара) и для энергообеспечения процессов синтеза витамина D₃. Образовавшийся меланин загара, являясь естественным фотофильтром, задерживает УФ-лучи, защищает от эритемы и от избыточного синтеза витамина D₃. И лишь чрезмерное облучение (в зависимости от наличия загара и фоточувствительности кожи) способно вывести эритему за границы естественной физиологической реакции до острых проявлений фотоожога.

Хотя меланин конкурирует с 7-ДГХ в коже за фотоны ультрафиолета и тем самым может ограничивать синтез провитамина D, более важным для предотвращения избыточного образования провитамина D₃ при длительном воздействии солнечного света является, по-видимому, фотохимическая изомеризация провитамина D₃ в два биологически неактивных продукта (люмистерол, и тахистерол).

Подсчитано, что количество витамина D₃, образующегося в коже под воздействием УФ-лучей, может составлять около 0.4-1 МЕ/см² в сутки или до 17000 МЕ на всю поверхность тела взрослого человека (при рекомендуемом суточном потреблении витамина D₃ с пищей для взрослых 200 МЕ). На образцах кожи человека *in vitro* показано, что уже через 15 минут после УФ-облучения количество превитамина достигает максимума, а при продолжении экспозиции его количество остается постоянным, но накапливается люмистерин и тахистерин (до 50% от исходной концентрации 7-ДГХ). Эти данные говорят о том, что для полноценного обеспечения суточной потребности организма в эндогенном витамине D₃ (для молодых и людей среднего возраста) достаточно 10-20-ти минутного пребывания под открытым солнечным светом, содержащем УФВ-лучи.

4.4. Фотоканцерогенез

У человека УФ излучение способно вызывать рак кожи. Фотоканцерогенез – обычно кумулятивный процесс, возникающий при хроническом облучении.

По предварительным оценкам, рак кожи возникает под действием ультрафиолета с $\lambda < 320$ нм. С изменением длины волны действующего излучения меняется характер заболевания. Тип опухоли зависит от глубины проникновения излучения. Монохроматический ультрафиолет 254 нм вызывает главным образом эпидермальные карциномы¹⁷, а 280 нм – преимущественно саркомы¹⁸.

Физико-химические стадии фотоканцерогенеза еще предстоит выяснить. Предполагается, что большую роль играет повреждение ДНК клеток кожи. Из других реакций привлекает внимание фотоокисление липидов. Например, при хроническом УФ-облучении в коже возрастает содержание канцерогенного продукта окисления холестерина – холестерин-5 α ,6 α '-эпоксида. В процесс УФ-канцерогенеза в коже, вероятно, могут вовлекаться и другие продукты фотоокисления липидов.

Опухоль возникает преимущественно на открытых участках тела – на коже лица и наружной стороны рук, причем чаще встречается у людей, работающих вне помещений. У представителей негроидной расы рак кожи возникает реже, чем у людей с белой кожей. Очевидно, защитную роль у темнокожих людей выполняет меланин, служащий одновременно оптическим экраном, антиоксидантом и ингибитором пероксидного окисления липидов.

4.5. Фотоаллергия и фотоиммуносупрессия

Наиболее часто фотоаллергические реакции вызывает прием хлорпромазина, сульфаниламидов, прометазина и других лекарственных препаратов. Эти соединения используются как антибактериальные, антигрибковые препараты и транквилизаторы. Они содержат ароматические кольца и галогены и поглощают свет в УФА-области спектра. Доказано, что фотоаллергены фотохимически присоединяются к белкам. Собственные белки модифицируются и распознаются иммунной системой, как чужеродные антигены. Эта реакция и приводит к формированию иммунного ответа. Фотохимически образованный аллерген взаимодействует с макрофагами и Т-лимфоцитами¹⁹. Таким образом, при первом воздействии света на лекарственные вещества в коже происходит аллергическая сенсibilизация Т-лимфоцитов. Даже при очень слабых повторных воздействиях Т-лимфоциты узнают аллерген, и возникает ответная реакция кожи (экзема), а в более тяжелых случаях – анафилактиче-

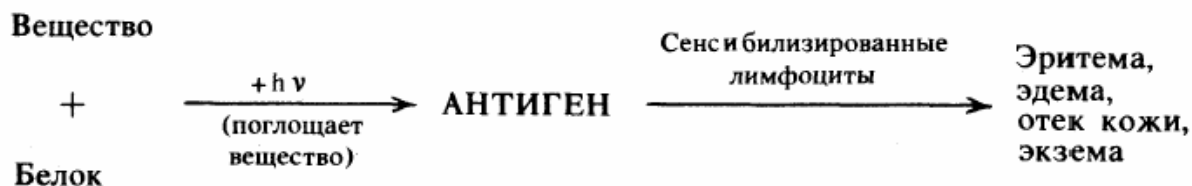
¹⁷ Карцинома - злокачественная опухоль, поражающая эпителиальные клетки кожи и внутренних органов человека.

¹⁸ Саркома - злокачественная опухоль неэпителиального происхождения, развивается из производных мезодермы.

¹⁹ Т-лимфоциты, или Т-клетки (*t* - лат. *thymus* - тимус) - один из важнейших типов белых клеток крови. Помогают организму бороться с инфекциями. В тимусе (вилочковой железе) Т-лимфоциты развиваются и дифференцируются, приобретая Т-клеточные рецепторы и поверхностные маркеры. Игрют важную роль в приобретенном иммунном ответе. Обеспечивают распознавание и уничтожение клеток, несущих чужеродные антигены.

ский шок. Таким образом, фотоаллергическую реакцию организма схематично можно представить следующим образом (схема 4.2):

Схема 4.2. Фотоаллергическая реакция организма (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).



При УФВ-облучении кожи в ней возможно образование и других повреждений, приводящих к появлению антигенов. Таким образом, ультрафиолет способен индуцировать мощный иммунный ответ на возникшие в коже антигены.

Однако, с другой стороны, под воздействием УФВ-излучения может возникать *иммуносупрессия*, проявляющаяся в подавлении клеточно-опосредованного иммунитета как у человека, так и у животных. Важно, что иммуносупрессия в этом случае может снижать аутоиммунную атаку на образующиеся в коже под действием ультрафиолета антигены. В этом заключается биологический смысл данной реакции.

Были выдвинуты две гипотезы о фотохимическом механизме иммуносупрессии, которые экспериментально подтвердились на моделях реакций *гиперчувствительности замедленного типа* (ГЗТ) и *контактной чувствительности* (КЧ). Эти иммунологические реакции являются замедленными, опосредованными Т-клетками.

Суть реакции ГЗТ заключается в следующем. Если в организм животного ввести какой-либо антиген, например, мышам внутривенно – эритроциты барана, то происходит иммунологическая сенсибилизация и, в зависимости от вида антигена, за 4 – 7 дней нарабатывается клон Т-клеток, способных специфически распознавать и уничтожить этот антиген. Если такому сенсибилизированному животному повторно ввести тот же антиген (тест-инъекция), то Т-клетки узнают его, диффундируют к месту введения антигена и уничтожают данный антиген. Это сопровождается локальной воспалительной реакцией и отеком. Процесс диффузии клеток занимает примерно одни сутки, отек также развивается не сразу, поэтому и вся реакция носит замедленный характер.

Реакция КЧ вызывается нанесением на кожу высокореактивных химических соединений, например динитрофторбензола или тринитрохлорбензола. ГЗТ и КЧ отличаются не только по способу первичной сенсибилизации, при

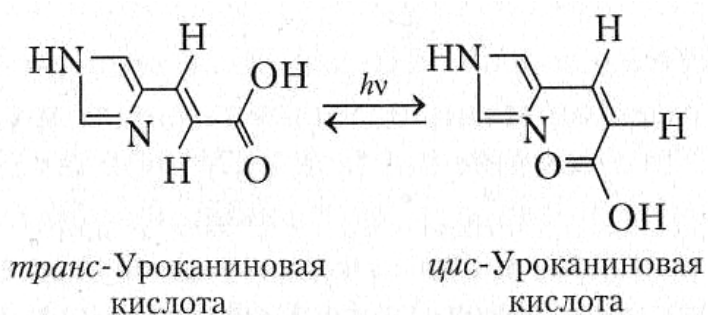


Рис. 4.4. Фотоизомеризация уроканиновой кислоты (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

КЧ презентацию²⁰ антигена проводят макрофаги кожи, а при ГЗТ – макрофаги селезенки.

По одной из гипотез, первичный механизм иммуносупрессии состоит в фотоизомеризации *транс*-уроканиновой кислоты в *цис*-форму под действием УФ света (рис. 4.4):

Транс-уроканиновая кислота содержится в роговом слое эпидермиса и является одним из главных его хромофоров (см. далее раздел 6.1, рис. 6.1). При УФ-облучении происходит фотоизомеризация до тех пор, пока не достигается стационарное состояние с примерно равными количествами обоих изомеров. Многочисленные данные указывают на важную роль *цис*-формы в иммуносупрессирующем действии ультрафиолета. Например, под действием экзогенного *цис*-изомера в эпидермисе уменьшается число клеток Лангерганса²¹, в результате чего подавляются процессы презентации антигенов и супрессируются реакции ГЗТ.

По другой гипотезе ведущую роль в иммуносупрессии, индуцированной ультрафиолетом, играют реакции фотодимеризации тиминовых оснований ДНК. Тот факт, что при нанесении на УФ-облученную кожу фермента, мономерирующего тиминовые димеры, не происходит подавления реакции КЧ, является аргументом в ее поддержку.

Наряду с перечисленными механизмами возможно участие в иммуносупрессии свободнорадикальных реакций и др.

²⁰ Презентация антигена - один из ключевых процессов, в ходе которого компоненты системы врожденного иммунитета, такие как макрофаги и дендритные клетки, стимулируют иммунный ответ системы приобретенного иммунитета путем представления (презентации) захваченного ими антигена Т-лимфоцитам.

²¹ Клетки Лангерганса, или внутриэпидермальные макрофаги, впервые были описаны в 1868 году немецким гистологом Паулем Лангергансом (Paul Langerhans).

5. МЕТОДЫ ФОТОТЕРАПИИ

5.1. Псораленовая фотохимиотерапия (ПУФА-терапия)

При кожном заболевании витилиго (приобретенная лейкодерма) в некоторых участках кожи деградируют и исчезают меланоциты – клетки, вырабатывающие пигмент меланин. Эти участки никогда не пигментируются под действием солнечного света, имеют белый цвет, что особенно заметно у людей со смуглой или черной кожей.

В 1947 г. египетский дерматолог Эль Мофти (El Mofty) установил, что терапевтический эффект лекарственных растений, использовавшихся при лечении витилиго, обусловлен присутствием в их экстрактах молекул 8-метоксипсоралена (8-МОП), поглощающего в УФА-области спектра и являющегося фотосенсибилизатором. Использование очищенного 8-МОП позволило создать стандартный фармацевтический препарат для лечения витилиго, при этом для облучения кожи по-прежнему использовали солнечный свет.

Псоралены содержатся во многих растениях, используемых в пищу. К ним относятся петрушка, пастернак, сельдерей, бергамот, апельсины, грейпфрут, инжир, а также много других видов растений. Интенсивность ближнего ультрафиолета высока даже в наших северных широтах, кроме того, он хорошо проникает через белую одежду и, достигая кожи, запускает фотохимические реакции псораленов. Поэтому люди, сами того не зная, часто подвергаются малым дозам псораленовой фотохимиотерапии. Иногда это воздействие оказывается столь значительным, что вызывает световые ожоги кожи.

Следующий важный шаг в развитии ПУФА-терапии был сделан в 1974 г., когда благодаря сотрудничеству инженеров фирмы «Sylvania» (США) и дерматологов Гарвардского университета был разработан интенсивный источник УФА-излучения, позволивший контролировать режим облучения больных и избегать передозировок, приводящих к эритеме или более сильным ожогам кожи. С этого времени и берет начало ПУФА-терапия в ее современном варианте.

ПУФА-терапия эффективна не только при витилиго, но и при лечении псориаза. При псориазе ускоряется деление базальных клеток эпидермиса, в результате чего на коже возникают утолщения – псориатические бляшки. ПУФА терапия оказалась эффективной и при лечении гнездной плешивости, нейродермита, кожной Т-клеточной лимфомы, экземы, ревматоидного артрита, некоторых других заболеваний.

Под действием света псоралены способны модифицировать биологические молекулы двумя способами: в результате кислороднезависимых реакций фотоприсоединения к ненасыщенным органическим молекулам (в первую

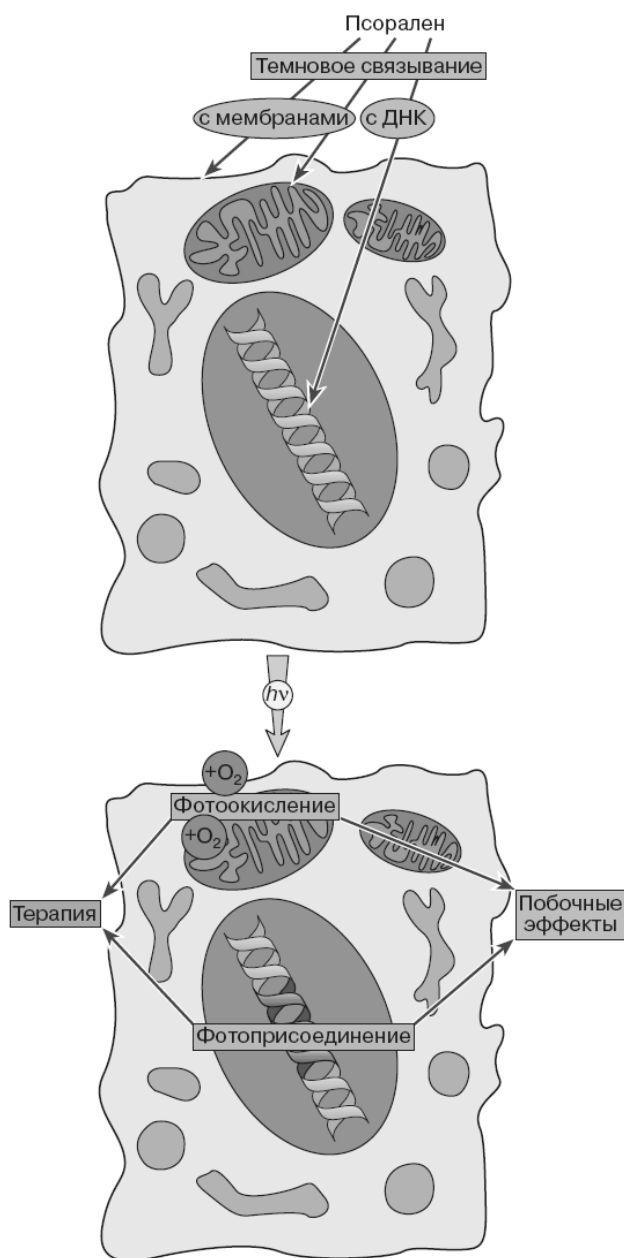


Рис. 5.1. Схема процессов, происходящих при ПУФА-терапии дерматозов (Потапенко А.Я., 2000).

антиоксидантами α -токоферолом и ионолом. МЭД при этом возрастала в 1.5 – 2 раза. Эти же антиоксиданты ингибируют эритему, вызванную УФВ-облучением кожи без сенсibilизаторов. Однако механизмы действия оказались в этих случаях разными. Если при УФВ-эритеме эффект антиоксидантов не зависел от того, когда наносился антиоксидант (до или сразу после УФВ-облучения), то ПУФА-эритема ингибировалась только если антиоксидант присутствовал во время облучения. Следовательно, если при УФВ-эритеме антиоксиданты подавляли постлучевые процессы в коже и не влияли на фотохимическую стадию, то при ПУФА-воздействии они, напротив, действова-

очередь к ДНК) и за счет окислительных фотореакций (см. разделы 3.2 и 3.5). Эти процессы могут оказывать как позитивное, так и негативное (побочное) действие (рис. 5.1).

К побочным эффектам относятся эритема, эдема, гиперпигментация, преждевременное старение кожи, а при некоторых условиях ПУФА-терапия может служить промотором рака кожи.

Лечебное действие ПУФА-терапии многообразно. При псориазе терапевтический эффект заключается в исчезновении псориатических бляшек, при Т-клеточной лимфоме – уничтожение злокачественно размножающихся Т-лимфоцитов, при витилиго – в стимуляции деления меланоцитов и миграции этих клеток в непигментированные области кожи, при гнездной плешивости – в стимуляции роста волос.

Ранее (до 1980 г.) считалось, что все эффекты ПУФА-терапии связаны с реакцией фотоприсоединения псораленов к ДНК. Однако оказалось, что часть побочных эффектов вызвана фотодинамическими реакциями псораленов, т.к. фотосенсибилизированная 8-МОП эритема и пигментация снижались

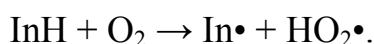
ли на фотохимической стадии, перехватывая первичные фотопродукты псораленов и не влияя на постлучевые процессы.

Установлено, что антиоксиданты не подавляют реакцию фотоприсоединения псораленов к ДНК или фотосенсибилизированную 8-МОП инактивацию ферментов, но ингибируют сенсibilизированное 8-МОП окисление липидов. ПУФА-эритему также ингибируют β -каротин, кантаксантин, азид натрия и ароматический ретиноид тигазон.

На основании этих данных был разработан новый метод ПУФА-терапии псориаза, заключающийся в том, что на кожу перед УФА-облучением вместе с фурукумаринами наносятся антиоксиданты. Длительность разового сеанса облучения, так же как и в обычной ПУФА-терапии, ограничивалась эритемной реакцией кожи. Но так как эритемная реакция кожи ослаблялась антиоксидантами, разовые дозы были увеличены. Таким образом, эритемная реакция при использовании только фурукумаринов и фурукумаринов в сочетании с антиоксидантами была одинаковой. Однако для достижения терапевтического эффекта при новом методе требовалось в 1.5 – 2 раза меньше сеансов ПУФА-воздействия, чем при обычной ПУФА-терапии (без антиоксидантов). Следовательно, антиоксиданты избирательно ингибируют фотохимические реакции псораленов, приводящие к побочным эффектам, но не влияют на реакции, ответственные за терапевтический эффект.

На избирательном подавлении побочных эффектов антиоксидантами основана РеПУФА-терапия, заключающаяся в комбинированном применении ПУФА-терапии и ароматических ретиноидов.

При передозировке антиоксидантов ингибирование ПУФА-эритемы сменяется ее активацией. Снижение защитного действия антиоксидантов при их высоких концентрациях может быть объяснено несколькими причинами. Известны прооксидантные эффекты антиоксидантов (InH), обусловленные их темновым окислением с образованием свободных радикалов, например



Кроме того, фурукумарины эффективно (с квантовым выходом до нескольких процентов) фотосенсибилизируют фотолиз α -токоферола и его аналогов. Фотолиз может сопровождаться образованием токсических продуктов, в свою очередь вызывающих эритему.

Важным шагом к расшифровке механизма ПУФА-терапии послужило открытие, сделанное в 1987 г. в Йельском университете Р. Эдельсоном (R. Edelson) с сотрудниками. Они занимались ПУФА-терапией кожной Т-клеточной лимфомы (КТКЛ). При КТКЛ в циркулирующей крови концентрация злокачественных Т-хелперов²² у больных существенно повышена. Эти клетки (в отличие от локализующихся под эпидермисом) оказываются

²² Т-хелперы (от англ. *helper* - помощник) - Т-лимфоциты, главной функцией которых является усиление адаптивного иммунного ответа. Т-хелперы распознают антигены при взаимодействии их Т-клеточного рецептора с антигеном.

недоступными для ПУФА-воздействия. У больных брали кровь и, чтобы уменьшить поглощение УФА-излучения гемоглобином, отделяли белые клетки крови от эритроцитов с помощью центрифугирования (лейкоферез). Затем лейкоциты из светлого слоя облучали в присутствии псораленов, лейкоциты при этом погибали. Для того, чтобы проверить, не будет ли ПУФА-повреждение лейкоцитов токсичным для больных, облученную кровь вводили им обратно в кровяное русло. Состояние безнадежных больных значительно улучшалось, а у некоторых из них признаки заболевания исчезали полностью. Интересно, что в этом случае погибали также и злокачественные Т-хелперы, которые непосредственно не получали ПУФА-воздействия. Таким образом, был разработан новый метод псораленовой экстракорпоральной фотохимиотерапии, названный *фотоферезом* (от *фотохимиотерапии* и *лейкофереза*). Фотоферез оказался эффективнее ПУФА-терапии не только при КТКЛ, но и при других заболеваниях (псориазе, ревматоидном артрите и др.). Оказалось, что все заболевания, излечиваемые под действием ПУФА-терапии, еще более эффективно излечиваются с помощью фотофереза.

Таким образом, мишенью действия фотохимических реакций псораленов при ПУФА-терапии является Т-клеточное звено иммунной системы. Как показали исследования, при всех таких внешне непохожих заболеваниях как витилиго, псориаз, КТКЛ, экзема, гнездная плешивость это звено гиперактивировано, а лечебный эффект является следствием подавления (супрессии) Т-клеточного звена. В настоящее время ПУФА-терапию и фотоферез относят к методам иммунотерапии.

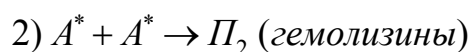
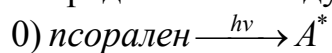
Состояние Т-клеточного звена иммунитета изучается по реакциям ГЗТ и КЧ. Р. Эдельсон с сотрудниками показали, что фотоферез приводит к супрессии ГЗТ. Подобный эффект супрессии ГЗТ ранее был обнаружен и для многих лекарств, обладающих терапевтическим эффектом при псориазе, например для циклоспорина А, каменноугольной смолы, дитранола и др. Супрессию ГЗТ вызывает также ПУФА-терапия. Поэтому способность того или иного агента супрессировать ГЗТ указывает на его возможную терапевтическую эффективность при псориазе и аутоиммунных заболеваниях.

Используя реакцию ГЗТ, удалось обнаружить новый фотохимический механизм иммуносупрессорного действия псораленов. Ранее считалось, что в основе ПУФА-терапии и фотофереза лежат реакции фотоприсоединения псораленов к ДНК, которые и приводят к иммуносупрессии. Оказалось, что для подавления ГЗТ достаточно в кровь животного ввести предварительно фотоокисленный псорален (ФОП). При этом ни кровь, ни кожа не подвергались УФА-облучению и, соответственно, реакции фотоприсоединения псораленов к ДНК не могли осуществляться.

При облучении растворов псораленов накапливаются многочисленные продукты фотолиза, часть из них образуется только в присутствии кислорода. Было обнаружено, что ФОП ингибировал тирозиназу. При смешивании с суспензией липосом ФОП инициировал окисление липидов. При добавлении в суспензию эритроцитов ФОП вызывал их гемолиз.

Иммуномодулирующий эффект ФОП, по-видимому, является наиболее важным биологическим эффектом фотопродуктов псоралена. Оказалось, что введение мышам фотоокисленного псоралена, предоблученного УФА в низких дозах (1 – 3 мин.), приводило к активации, а предоблученного в высоких дозах (10 – 30 мин.) – к практически полной супрессии ГЗТ к эритроцитам барана.

Кинетические исследования показали, что ФОП-продукты, гемолизирующие эритроциты (ФОП-гемолизины), эффективнее образуются при высоких интенсивностях УФА-облучения и при высоких концентрациях псоралена в облучаемых растворах. Напротив, ФОП-продукты, супрессирующие ГЗТ, преимущественно образуются в разбавленных растворах псоралена и при низких интенсивностях УФА-излучения. Образование ФОП-продуктов можно представить следующим образом:



При поглощении молекулой псоралена кванта света образуется лабильный продукт (A^*). Далее A^* либо превращается в стабильный продукт P_1 , либо две молекулы A^* рекомбинируют с образованием другого продукта P_2 . Образование P_1 преобладает при низких концентрациях A^* (т.е. при низких интенсивностях УФА-излучения и/или низких концентрациях псоралена). При увеличении концентрации A^* (интенсивности УФА-излучения и/или концентрациях псоралена) увеличивается вероятность рекомбинации лабильного продукта A^* и, следовательно, выход продукта P_2 .

Было высказано предположение, что фотопродукты P_1 обладают терапевтической эффективностью. Для проверки этой гипотезы исследовали влияние ФОП на рост привитой Т-клеточной лимфомы EL-4 у мышей, являющейся экспериментальной моделью КТКЛ человека, которая успешно лечится псораленовой фотохимиотерапией. Было показано, что введение мышам с привитой опухолью водного раствора предварительно фотоокисленного псоралена приводило к достоверному торможению роста опухолей. Ингибирующий эффект ФОП наблюдался при любом способе введения: внутривенных или подкожных инъекциях, закапывании ФОП в нос или при его оральном введении.

Ингибирование роста привитой лимфомы EL-4 у мышей позволяет предположить, что ФОП может обладать терапевтическим эффектом и в случае КТКЛ человека. Эти данные показывают, что фотоокислительными реакциям псораленов принадлежит важная роль в ПУФА-терапии.

В целом схему процессов при ПУФА-терапии можно представить следующим образом (см. рис. 4.3). Сначала после приема препарата происходит распределение псораленов в клетках и их связывание как с ДНК, так и с другими структурами, например мембранами. Затем на свету осуществляются фотохимические реакции псораленов с биосубстратами, ответственные за те-

рапевтические и побочные эффекты терапии. Можно предполагать, что реакции фотоприсоединения к ДНК также играют важную роль, хотя прямые доказательства этого оказалось получить сложнее, чем для фотоокислительных реакций.

Терапевтическое действие продуктов фотоокисления псоралена указывает на возможность создания нового варианта псораленовой фотохимиотерапии, при котором псоралены фотоокисляются вне организма и затем принимаются пациентом (ФОП-терапия). При ФОП-терапии не требуется подвергать ткани пациентов УФА-облучению, благодаря чему устраняются многие нежелательные последствия ПУФА-воздействия. Оказываются невозможными реакции фотоприсоединения псораленов к ДНК. Именно эти реакции могут представлять потенциальную опасность при ПУФА-терапии и фотоферезе, т.к. способны приводить к мутациям и быть потенциально канцерогенными.

5.2. Фототерапия желтухи новорожденных

Современная фототерапия желтухи новорожденных возникла в 50-е годы XX века в графстве Эссекс в Англии благодаря наблюдательности медсестры родильного дома. Она заметила, что кожа младенцев, находившихся ближе к окну и получавших больше дневного света, была менее желтой, чем у младенцев, находившихся в затененной, дальней от окна части палаты. Медсестра поделилась своим наблюдением с врачом, который, к счастью, отнесся к этому наблюдению со всей серьезностью. Врача звали Р.Д. Кремер (R.D. Cramer). К сожалению, имя медсестры, благодаря которой удалось спасти очень многих людей от тяжелых последствий гипербилирубинемии, осталось неизвестным.

Желтуха новорожденных является следствием резкого повышения в организме концентрации билирубина, придающего коже желтоватый оттенок. Билирубин образуется из гемоглобина после распада эритроцитов, длительность жизни которых у взрослых составляет около 120 дней, у новорожденных – около 70 дней. Гемоглобин, освободившийся из эритроцитов, распадается на глобин и гем²³. Гем подвергается деградации, превращаясь в билирубин, который должен выводиться из организма при участии печени. Превращение гема в билирубин осуществляется в два этапа. Сначала образуется биливердин²⁴: при участии фермента гемоксигеназы (монооксигеназы) в присутствии кислорода и НАДФН²⁵ происходит раскрытие порфиринового коль-

²³ Гем представляет собой комплекс протопорфирина с двухвалентным железом.

²⁴ Биливердин [от лат. *bilis* — жёлчь и франц. *vert (verd)* — зелёный], $C_{33}H_{34}O_8N_4$ - один из жёлчных пигментов.

²⁵ НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), $C_{21}H_{29}N_7O_{17}P_3$ - широко распространённый в природе кофермент некоторых дегидрогеназ - ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в живых клетках. НАДФ принимает на себя водород и электроны окисляемого соединения и передаёт их на другие вещества.

ца в α -положении с выделением оксида углерода (СО). Затем центральный метиленовый мостик биливердина в присутствии НАДФН восстанавливается биливердинредуктазой с образованием билирубина (рис. 5.2). Приведенные на рис. 5.2 структурные формулы гема и билирубина позволяют проследить стадии реакции, но пространственная структура молекулы билирубина представлена в упрощенном виде. На самом деле она сложнее. В молекуле билирубина есть несколько полярных химических групп, которые могли бы обеспечить его высокую растворимость в воде. Однако пространственная структура молекулы билирубина такова, что полярные группировки обращены внутрь и образуют стабилизирующие внутренние водородные связи. В результате билирубин плохо растворим в воде за счет отталкивания ее молекул гидрофобными группами молекулы билирубина. В плазме крови билирубин связывается с альбумином и в такой форме переносится током крови.

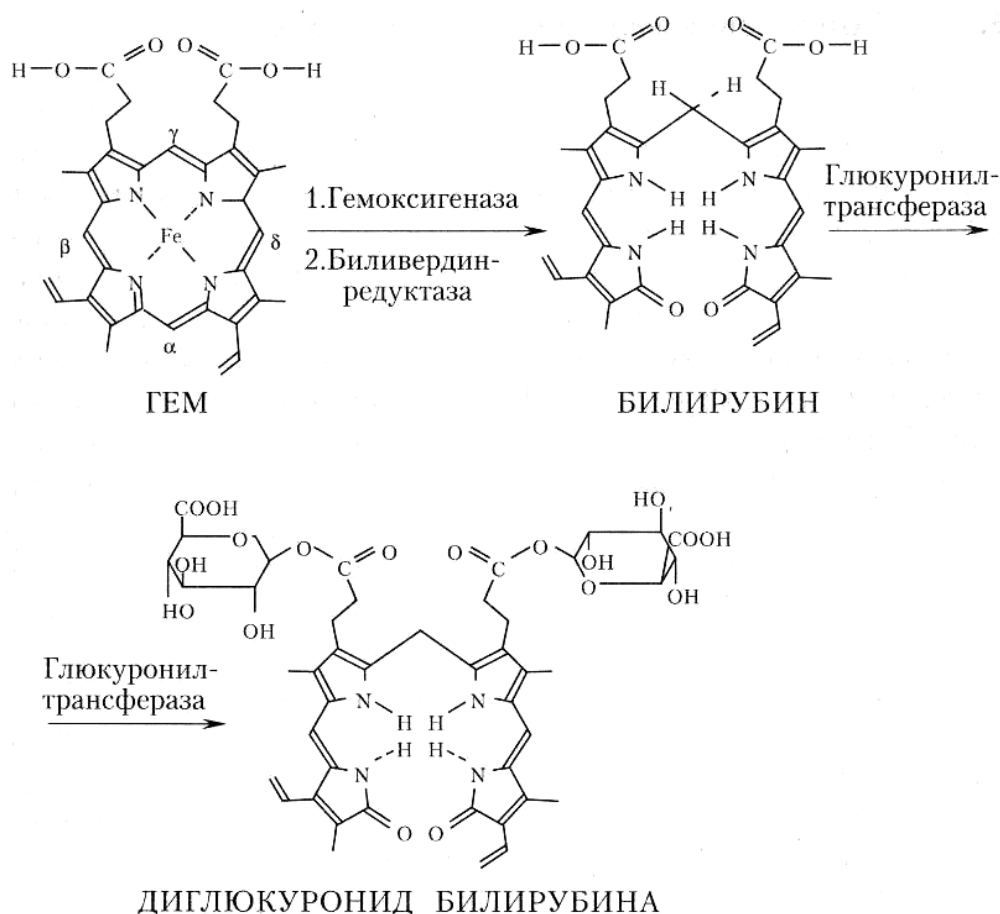


Рис. 5.2. Основные стадии образования и метаболизма билирубина. Наряду с изображенным на рисунке диглюкуронидом билирубина также образуются моноглюкурониды билирубина (не приведены).

Гидрофобные молекулы билирубина распределяются преимущественно в органах, богатых липидами, к которым относится и мозг. Гематоэнцефалический барьер новорожденных, особенно недоношенных, не защищает мозг от проникновения в него билирубина. Накопление билирубина в мозге вызы-

вают серьезные и необратимые его повреждения и неврологические заболевания. Гистологически гипербилирубинемия характеризуется накоплением билирубина в ядрах нервных клеток серого вещества мозга.

Предотвратить гипербилирубинемия можно, если перевести билирубин в водорастворимую, гидрофильную форму, которая легко выводится из организма. У взрослых это происходит при участии находящегося в клетках печени фермента глюкуронилтрансферазы, который присоединяет к билирубину глюкуроновую кислоту. Глюкуроновая кислота прекрасно растворима в воде, она похожа на глюкозу, только в С6 положении вместо CH_2OH -группы находится COOH -группа. В ходе реакции образуется либо диглюкуронид билирубина (рис. 5.2), либо моноглюкурониды. Эти водорастворимые производные называют «конъюгированным» (связанным) или «прямым» билирубином. Немодифицированный гидрофобный билирубин называют «свободным» или «непрямым». Конъюгированный билирубин экскретируется в желчные протоки и выводится из организма.

У новорожденных созревание ферментативных систем печени, участвующих в превращении непрямого билирубина в прямой, запаздывает. Длительное время в тяжелых случаях для борьбы с гипербилирубинемией у новорожденных применяли обменное переливание крови. Эта процедура приводила к тяжелым осложнениям и даже к летальному исходу. Поэтому возможность фототерапевтического лечения желтухи новорожденных стала важным научным достижением.

Билирубин имеет широкую полосу поглощения с максимумом в синей области – около 450 нм. Исходя из этого, в фототерапии желтухи применяется синий свет.

Поглощение света молекулой билирубина может приводить к *цис-транс*-фотоизомеризации вокруг С4 – С5 или С15 – С16 двойных связей (рис. 5.3). Возникающую при распаде гемоглобина пространственную структуру билирубина принято называть 4Z,15Z- или просто ZZ-изомером (Z от нем. *zusammen* - вместе). Если в электронно-возбужденном состоянии происходит поворот вокруг 4-5 связи, то образуется 4E,15Z- (или просто EZ-) изомер (E от нем. *entgegen* - напротив). Возможно также образование 4Z,15E- (ZE) или 4E,15E- (EE) изомеров билирубина. Разрыв внутренних водородных связей приводит к высвобождению гидрофильных группировок билирубина, образующих водородные связи с молекулами воды. В результате этого молекула билирубина становится водорастворимой и может легко выводиться из организма. Фотоизомеризация – обратимая реакция, поэтому в процессе облучения устанавливается стационарное равновесие разных изомерных форм. Кроме этого, протекают и необратимые фотохимические реакции, заключающиеся в фотоизомеризации с последующим фотоокислением при участии синглетного кислорода. Завершаются они внутримолекулярной циклизацией с образованием водорастворимого EZ-циклобилирубина, называемого также люмилирубином, и EE-циклобилирубина (на рис. 5.3 не показан).

Хотя билирубин потенциально может инициировать реакции фотосенсибилизированного окисления, фототерапия не сопровождается заметными побочными эффектами. Возможно, это связано с антиоксидантной активностью билирубина. Все же при проведении процедур фототерапии необходимо защищать глаза, т.к. возможно фотосенсибилизированное повреждение рецепторных клеток сетчатки.

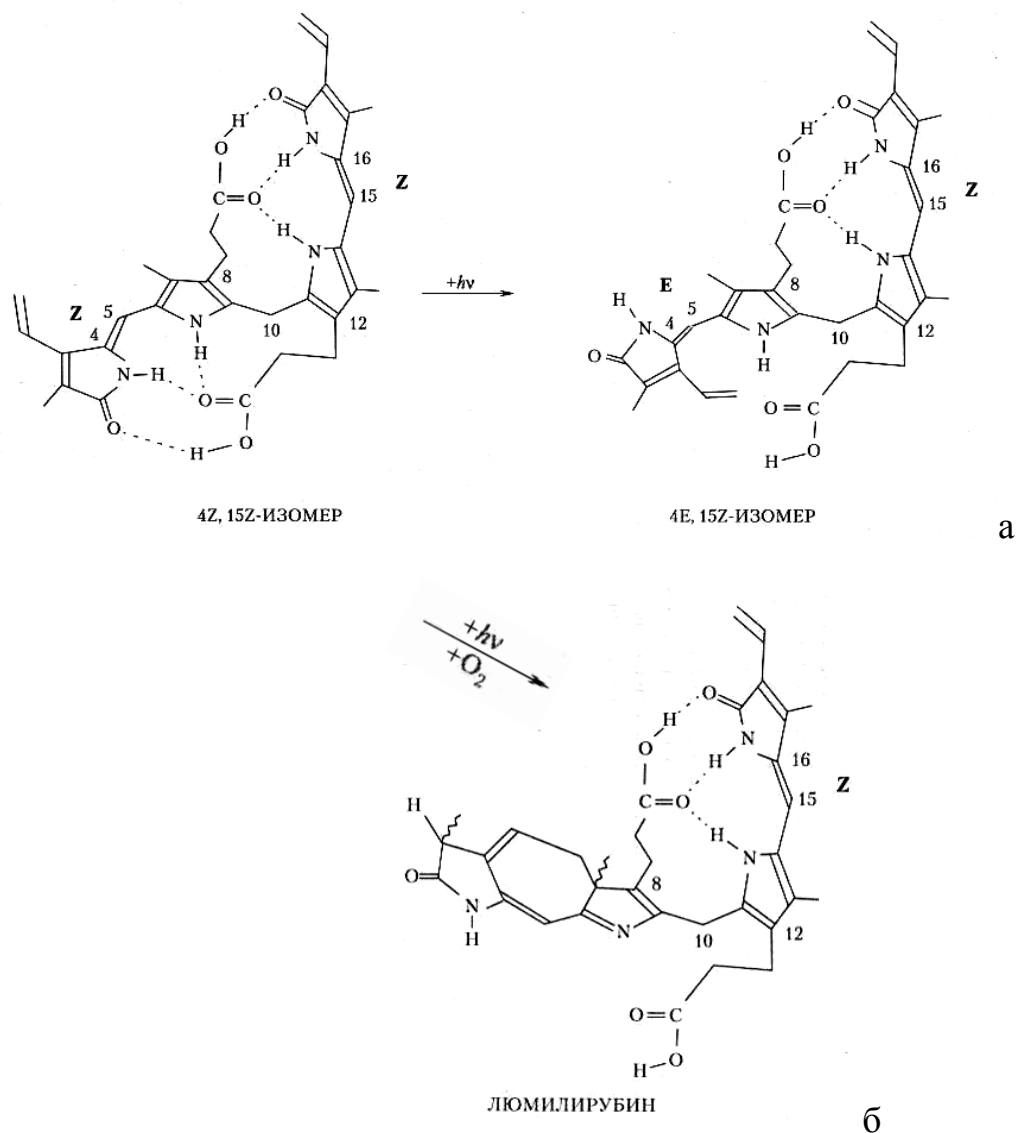


Рис. 5.3. Цис-транс-фотоизомеризация билирубина (а) и образование люмилирубина (б). Помимо изображенного на рисунке 4E,15Z-изомера образуются также 4Z,15E- и 4E,15E-изомеры билирубина. В 4Z,15Z-билирубине водородные связи замыкаются внутри молекулы, а после фотоизомеризации становится возможным образование водородных связей с молекулами окружающей воды.

В настоящее время благодаря высокой эффективности и незначительным побочным эффектам фототерапия желтухи новорожденных широко применяется во многих родильных домах.

5.3. Низкоинтенсивная лазерная терапия

5.3.1. Особенности взаимодействия лазерного излучения с биотканями

С появлением мощных источников видимого света – лазеров – возникли новые возможности для развития медицины. Лазерное излучение применяется либо в качестве инструмента при функциональных исследованиях или лабораторном анализе, либо как средство воздействия на ткани человека.

Лазерное излучение низкой интенсивности оказывает биостимулирующее воздействие на организм и запускает фотохимические реакции. При умеренной интенсивности лазерное излучение оказывает неспецифическое тепловое, а высокой интенсивности — разрушающее (деструктивное) действия на биообъекты, т.е. проявляет себя как электромагнитное излучение любой другой природы. В отличие от нелазерных источников света, тепловое действие и фоторазрушение могут быть осуществлены в очень малых объемах (в пределах клетки или даже ее частей).

Таким образом, процессы, характеризующие взаимодействие лазерного излучения с биообъектами, можно разделить на три группы. К первой группе относятся все невозмущающие процессы (по крайней мере, не оказывающие заметного действия на биообъект), ко второй — процессы, в которых проявляется биостимулирующее, фотохимическое или тепловое действие, и к третьей — процессы, приводящие к фоторазрушению (абляция, фотокоагуляция).

Существует представление о том, что эффекты, наблюдаемые при лазерном облучении, являются следствием таких особых свойств лазерного излучения, как когерентность, поляризация света и импульсный характер излучения. Однако это неверно, т. к. эти свойства лазерного излучения становятся существенными только при очень интенсивных потоках (порядка $2 \cdot 10^{15}$ Вт/м²). Вместе с тем обычно используемые в клинической практике и в экспериментах с клеточными культурами интенсивности излучения лазера колеблются в пределах от 1 до 100 Вт/м². При таких плотностях мощности каждая молекула, поглотившая свет, успевает перейти в основное состояние до того, как произойдет ее встреча со следующим фотоном. Поэтому по своему фотохимическому действию лазерное облучение – это не более чем освещение объекта очень ярким и узким пучком света со строго определенной длиной волны.

В зависимости от интенсивности (мощности) излучения лазеры, используемые в медицине, принято делить на две категории: *низкоинтенсивные* (НИЛ) – терапевтические и *высокоинтенсивные* (ВИЛ) – хирургические.

НИЛ не оказывают прямого разрушительного действия на ткани, т. к. их эффекты основаны на фотохимических реакциях. Используемая интенсивность в среднем составляет 0.1 Вт/м², а интервал излучаемых волн лежит в видимой и ближней ИК областях шкалы электромагнитных волн. К этой

группе относятся, например, гелий-неоновый (ГНЛ) и полупроводниковый лазеры.

В терапевтических целях в настоящее время применяют не только лазерное, но и излучение светодиодов. Наибольший терапевтический эффект дает облучение в красной и ближней ИК областях спектра.

Излучение ВИЛ оказывает заметное негативное воздействие на ткани (нагрев, обугливание, испарение). В этом случае интенсивность составляет около 100 Вт/м^2 , интервал используемых длин волн простирается от далекой ИК до УФ области. К ВИЛ относятся твердотельные, углекислотные, аргоновые, а также эксимерные лазеры.

В медицине лазеры используют в зависимости от мощности в четырех основных направлениях:

1. *Лазерная хирургия.* В данном случае применяется излучение большой мощности, под действием которого происходит локальный разогрев («выжигание») ткани.
2. *Фотодинамическая терапия опухолей.* В этой области излучение НИЛ применяется в сочетании с фотосенсибилизатором.
3. *Лазерная терапия.* Лазерное воздействие оказывается НИЛ без использования фотосенсибилизаторов. Особый интерес представляет наблюдаемая при этом активация жизненных процессов, так называемая «биостимуляция». Однако, как правило, при больших дозах положительный эффект лазерного излучения сменяется угнетением, что служит основным препятствием для широкого применения лазерной терапии.
4. *Неинвазивная диагностика.* Используются очень низкие интенсивности света, с помощью которых можно изучать процессы в живом объекте, не внося серьезных возмущений в его поведение.

Остановимся на биологическом действии НИЛ.

5.3.2. Возможные механизмы биологического действия низкоинтенсивных лазеров

Спектр заболеваний, при которых используется терапевтический эффект лазерного излучения НИЛ, в настоящее время достаточно широк. Облучение крови и суставов при ревматоидном артрите, лечение мужского бесплодия, глазных болезней (включая глаукому), дисфункции мочевого пузыря, ишемической болезни сердца, кожных болезней и болезней крови, осложнений при хирургических травмах, пиелонефрита, туберкулеза легких, подготовка больных к хирургическим вмешательствам – таков далеко не полный перечень областей применения лазерной терапии в России.

Наблюдаемые в клинике эффекты лазерного облучения (противовоспалительное действие, ускорение регенерации поврежденных тканей и улучшение кровоснабжения органов) могут быть следствием процессов, регистри-

руемых в эксперименте на изолированных клетках и лабораторных животных:

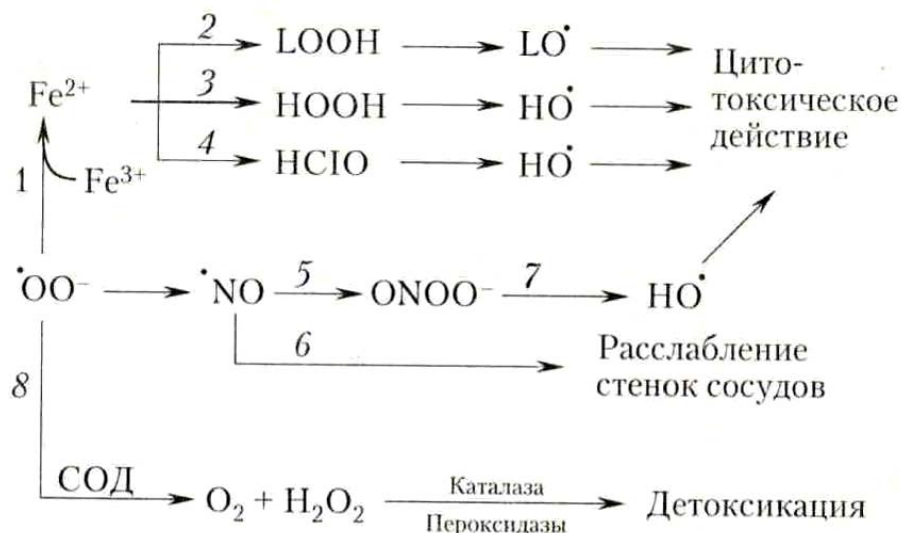
- 1) увеличение активности клеток-фагоцитов;
- 2) усиление пролиферации клеток;
- 3) улучшение циркуляции крови по сосудистому руслу вследствие расслабления стенок кровеносных сосудов (вазодилатация).

В 1994 г. Ю.А. Владимировым была сформулирована гипотеза, согласно которой биологическое действие НИЛ обусловлено одной из трех первичных реакций:

- 1) фотореактивирующее действие на фермент Cu, Zn-супероксиддисмутаза (СОД);
- 2) фотодинамическое действие на мембраны, вызванное эндогенными ФС и сопровождаемое увеличением концентрации внутриклеточного кальция и последующей стимуляцией клеток;
- 3) фотолиз металлокомплексов с монооксидом азота (NO).

Фотореактивация супероксиддисмутазы. Как известно, СОД уменьшает концентрацию супероксидного радикала ($\cdot\text{O}_2^-$), катализируя реакцию *дисмутации* (см. уравнение 3.1). В результате происходит снижение стационарной концентрации $\cdot\text{O}_2^-$ в клетках и тканях, где этот радикал постоянно образуется, особенно при некоторых патологических состояниях. На схеме метаболизма супероксидного радикала видно, каким образом его избыток может оказаться токсичным для клетки (схема 5.1).

Схема 5.1. Возможные механизмы цитотоксического действия супероксидного радикала



Сокращения: монооксид азота - $\cdot\text{NO}$, гипохлорит - HClO , гидроперекиси липидов - LOOH , алкоксил радикал - $\text{LO}\cdot$, гидроксил радикал $\text{HO}\cdot$, пероксинитрит анион - ONOO^- , супероксидный радикал - $\cdot\text{OO}^-$ (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

Во-первых, избыток $\cdot\text{O}_2^-$ оказывает патогенное действие, высвобождая ионы свободного двухвалентного железа Fe^{2+} из различных депо. Трехва-

лентное железо Fe^{3+} в свободном виде в клетке, по-видимому, отсутствует, но оно входит в состав белка ферритина в виде гидроксида (III). Проникая в ферритин, радикал $\bullet O_2^-$ восстанавливает трехвалентное железо до свободного двухвалентного иона (реакция 1). Ионы Fe^{2+} вступают по меньшей мере в три реакции, сопровождающиеся образованием новых свободных радикалов: реакцию с гидроперекисями липидов (реакция 2), реакцию с пероксидом водорода (реакция Фентона 3, см. уравнение 3.2) и реакцию с гипохлоритом (реакция 4).

В результате реакции Фентона образуется гидроксильный радикал, обладающий высокой реакционной способностью (реакция 3). При его взаимодействии с белками происходит их денатурация, а реакции с нуклеиновыми кислотами могут вызывать мутации и гибель клеток. При совместном использовании методов спиновых ловушек²⁶ и хемилюминесценции (ХЛ) удалось показать, что гидроксильный радикал образуется также и при взаимодействии Fe^{2+} с гипохлоритом (реакция 4). Реакции 3 и 4 протекают главным образом в водной фазе клеток и тканей, где растворены H_2O_2 и гипохлорит. В липидной фазе биологических мембран и липопротеидов ионы Fe^{2+} являются мощными катализаторами свободнорадикального цепного окисления липидов (реакция 2). Совокупность реакций 1 – 4 лежит в основе непрямого цитотоксического и мутагенного действия $\bullet O_2^-$.

Во-вторых, негативная роль избытка $\bullet O_2^-$ заключается в его взаимодействии с монооксидом азота NO (реакция 5). Многие клетки, такие как, например, клетки эндотелия или нейтрофилы крови и тканевые макрофаги, способны одновременно выделять $\bullet O_2^-$ и продуцировать NO. Между тем $\bullet O_2^-$ и NO активно взаимодействуют друг с другом, образуя пероксинитрит-анион $ONOO^-$, который обладает сильнейшим цитотоксическим действием (реакция 7) и оказывает повреждающее действие на клетки стенок сосудов. Кроме этого, монооксид азота стимулирует выделение эндотелиальными клетками так называемого фактора расслабления (реакция 6). Последний играет важную роль в регуляции кровяного давления.

Защитное действие СОД обусловлено снижением концентрации $\bullet O_2^-$ в среде в результате реакции дисмутации (реакция 8) с последующим удалением H_2O_2 в реакциях, катализируемых каталазой и глутатионпероксидазой. Тем самым СОД защищает клетки от повреждения при многих патологических состояниях (реперфузионное повреждение ишемизированных тканей, мутагенное действие промышленных загрязнений, побочное действие некоторых препаратов) и играет важную роль в улучшении циркуляции крови.

²⁶ *Спиновая ловушка* — аналитический метод, применяемый для детекции и идентификации короткоживущих свободных радикалов, и соединения, используемые для этого метода. Метод спиновых ловушек заключается в добавлении свободных радикалов, образующихся в процессе какой-либо реакции, к особым акцепторам («спиновым ловушкам»). Основан на свойствах этих соединений связывать свободные радикалы с образованием более стабильных радикалов, которые можно определять по спектрам электронного парамагнитного резонанса.

Рассмотрим подробнее положительное действие облучения области сердца после его реоксигенационного повреждения. Повреждение сердца и мозга из-за недостатка кислорода в определенных участках тканей – одна из основных причин смерти людей в развитых странах. Казалось бы, восстановление кровообращения должно предотвратить или уменьшить повреждение клеток и тканей, испытывающих недостаток кислорода. Однако еще в 80-е гг. XX в. Д.Н. Грангер (D.N. Granger), Дж.М. МакКорд (J.M. McCord) и Д.А. Паркс (D.A. Parks) показали, что реперфузия может вызвать дополнительное повреждение ткани (реоксигенационное повреждение), которое в значительной мере обусловлено усилением образования активных форм кислорода, в частности супероксида. Так, при реперфузии сердца, некоторое время находившегося в состоянии ишемии (отсутствие кровообращения), может происходить резкое ухудшение состояния органа, проявляющееся прежде всего в фибрилляции - состоянии сердца, при котором отдельные группы мышечных волокон сердечной мышцы сокращаются разрозненно и нескоординировано, вследствие чего сердце теряет способность совершать согласованные сокращения, что приводит к неэффективности работы этого органа. Введение СОД в перфузионную жидкость заметно уменьшает этот эффект. Если вместо введения СОД область сердца лабораторных животных облучать НИЛ, то реперфузионного повреждения и фибрилляции сердца не происходит. При этом образование в тканях продуктов перекисидации липидов снижается до уровня неповрежденной ткани. Эти явления могут быть объяснены явлением реактивации СОД под действием света.

Явление фотореактивации фермента цитоплазматической СОД было обнаружено при изучении положительного действия ГНЛ надолго незаживающие раны и трофические язвы. Предположение, что положительный эффект облучения связан с подавлением образования свободных радикалов, подтвердилось в экспериментах по изменению интенсивности ХЛ раневых экссудатов²⁷ при добавлении к ним пероксида водорода (H_2O_2). Наблюдаемое свечение было связано с образованием супероксидного радикала при разложении H_2O_2 экссудатом. Вспышку ХЛ подавляло добавление к экссудату как фермента СОД, удаляющего супероксидные радикалы, так и каталазы, разлагающей H_2O_2 . Облучение экссудата светом ГНЛ также производило подобный эффект. Таким образом, свет лазера действовал как каталаза или СОД.

Поскольку за несколько секунд облучения в экссудате вряд ли могло произойти образование новой каталазы или СОД в результате их биосинтеза, то было естественно предположить, что исходно активность каталазы или СОД в экссудате снижена, а лазерное облучение привело к восстановлению активности одного из этих ферментов. Оба фермента поглощают при длине волны 633 нм, излучаемой ГНЛ.

В экспериментах с изолированной эритроцитарной СОД (Cu, Zn-СОД) было показано, что снижение рН раствора до 5.9 инактивирует фермент. По-

²⁷ *Экссудат* (от лат. *exsuda* - выделяю), жидкость, выделяющаяся при воспалении из кровеносных сосудов в ткани и полости тела и накапливающаяся в них.

следующее облучение инактивированного фермента светом ГНЛ приводит к полной его реактивации. По-видимому, это явление наблюдается и в живых организмах, т.к. при патологических процессах в очаге заболевания может происходить локальное закисление, и, как следствие, снижение активности СОД.

Фотоокисление липидов в мембранах. Фосфолипиды, входящие в состав всех клеточных и внутриклеточных мембран, не поглощают свет в видимой и инфракрасной областях спектра, излучаемых обычными лазерами. Но при добавлении к фосфолипидам ФС, например гематопорфирина или фталоцианина, под действием света происходит окисление липидов (фотодинамический эффект) и образование перекисей (фотопероксидация).

При лазерном облучении суспензии клеток или митохондрий фотопероксидация липидов в ряде случаев может наблюдаться и без добавления сенсibilизатора извне – за счет эндогенных сенсibilизаторов. Известно, что при определенных заболеваниях в мембранах клеток накапливаются сенсibilизаторы, прежде всего гематопорфирин и его производные.

Действие липидной пероксидации на фосфолипидный слой мембран хорошо изучено и сводится к трем основным эффектам:

- 1) увеличение проницаемости мембран для ионов Ca^{2+} ;
- 2) избирательное увеличение проницаемости для ионов H^+ и/или OH^- ;
- 3) снижение электрической стабильности мембран и, как следствие, «самопробой» собственным электрическим потенциалом.

В клеточных мембранах действие облучения связано, кроме того, с изменениями мембранных белков. В частности, имеет место окисление SH-групп, а также повреждение фермента Ca^{2+} -АТФ-азы, который является основной так называемого *кальциевого насоса*.

Как известно, в нормальных клетках низкое содержание ионов кальция поддерживается работой кальциевого ионного насоса – ферментом Ca^{2+} -зависимой АТФ-азой (Ca^{2+} -АТФ-аза), встроенным в цитоплазматическую мембрану, а также в мембраны эндоплазматического ретикулума. Расщепляя АТФ, Ca^{2+} -АТФ-аза переносит ионы Ca^{2+} из цитоплазмы, где их концентрация мала (10^{-7} М), во внутриклеточные депо или межклеточную среду, где концентрация Ca^{2+} велика (10^{-3} М) (рис. 5.4, а).

После повреждения фермента в результате липидной пероксидации нарушается его связь с мембраной и, хотя способность расщеплять АТФ сохраняется, он теряет способность переносить ионы кальция. Ионы кальция начинают «протекать» в сторону их меньшей концентрации, т.е. в цитоплазму (рис. 5.4, б), в результате чего повышается их концентрация внутри клеток. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , в свою очередь, приводит к активации клеток и их пролиферации.

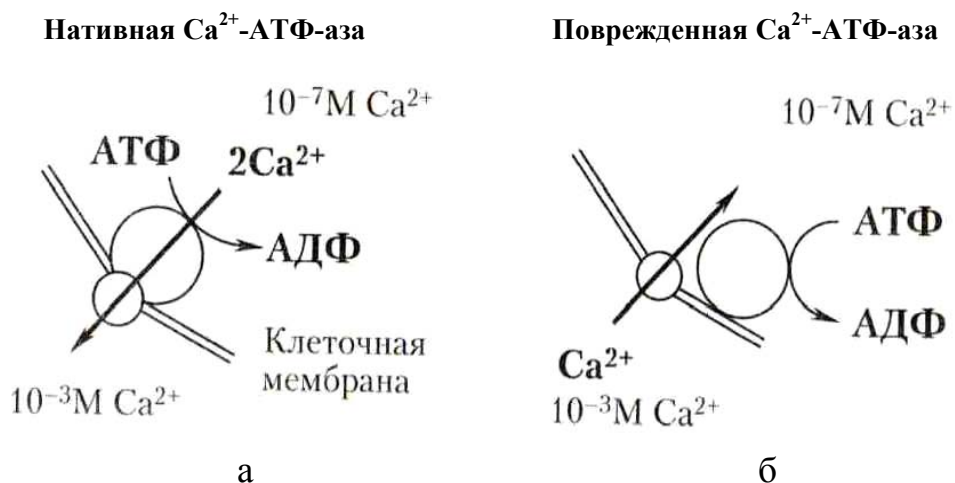


Рис. 5.4. Работа Ca^{2+} -АТФ-азы в клетке: а – связь нативного фермента с клеточными мембранами; б – изменение свойств Ca^{2+} -АТФ-азы под действием пероксидного окисления липидов (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

Можно предположить, что последовательность событий при действии лазерного облучения в данном случае выглядит следующим образом:

- 1) поглощение фотона эндогенным ФС и пероксидация липидов;
- 2) поступление ионов кальция в клетку;
- 3) активация внутриклеточных процессов.

Активация внутриклеточных процессов при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может приводить к различным биологическим эффектам в зависимости от типа клеток, подвергнутых лазерному облучению. Так, облучение крови оказывает выраженный эффект на лейкоциты (нейтрофилы и моноциты), которые выполняют защитные функции (фагоцитоз) в организме и участвуют в регуляции кровообращения. Было показано, что продукты пероксидного окисления липидов и окисленные липопротеиды плазмы крови вызывают *предстимуляцию* клеток-фагоцитов, так называемый *прайминг* (priming). Предстимуляция заключается в двух-, трехкратном увеличении выделения этими клетками активных форм кислорода в ответ на действие некоторого стимула (которым могут быть оболочки бактериальной клетки, кальцийпереносящие антибиотики и некоторые другие вещества). Суть явления предстимуляции поясняется на рис. 5.5.

К суспензии клеток (около 1 млн. клеток) добавляли люминол и стимул (например, активированный зимозан) и измеряли ХЛ (см. рис. 5.5, а). В отсутствие облучения количество рецепторов на поверхности клетки невелико, что соответствует небольшому уровню ХЛ. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция и прайминг фагоцитов могут быть вызваны синтетическими кальциевыми ионофорами, продуктами пероксидации липидов, а также лазерным облучением. Оказалось, что на поверхности клетки увеличивается количество рецепторов, и действие стимула на такие фагоциты приводит к усилению выделения активных форм кислорода и повышению уровня ХЛ (см. рис. 5.5, б).

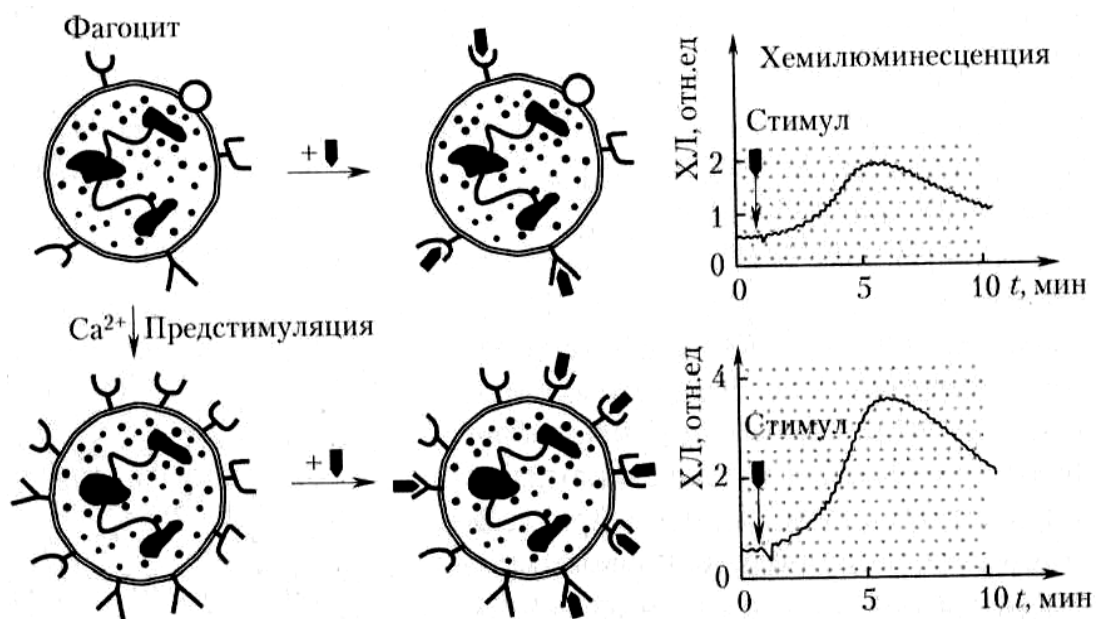


Рис. 5.5. Лазериндуцированный прайминг фагоцитов: а – добавление стимула к суспензии нативных фагоцитов (количество рецепторов на поверхности клетки невелико, что соответствует небольшому уровню ХЛ); б – увеличение количества рецепторов и действия стимула за счет прайминга фагоцитов (усиление выделения активных форм кислорода и повышение уровня ХЛ) (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

Известно, что содержание в крови эндогенных ФС может существенно различаться у здоровых людей и при некоторых заболеваниях. Было обнаружено, что чем больше содержание порфирина, тем ниже доза лазерного облучения, при которой наблюдается эффект прайминга. Таким образом, гематопорфирин является наиболее вероятным природным ФС при облучении ГНЛ.

Под действие света лазера происходит также увеличение синтеза фермента – индуцибельной NO-синтазы²⁸. Было показано, что после облучения клетки-фагоциты начинают продуцировать монооксид азота (NO), который можно определить по образующемуся из него NO₂.

Два основных биологических эффекта могут быть следствием предстимуляции фагоцитов при лазерном облучении крови. Во-первых, усиление образования активных форм кислорода (супероксида, перекиси водорода, гипохлорита) и NO должно привести к более эффективному фагоцитозу и бактерицидному действию. Во-вторых, большее выделение NO должно сопровождаться расширением кровеносных сосудов и улучшением кровообращения. Оба этих эффекта наблюдаются при действии лазерного облучения на организм.

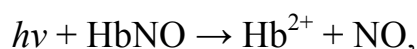
²⁸ *Индукцибельные ферменты* – ферменты, скорость синтеза которых изменяется в зависимости от условий существования организма.

В ряде работ было показано, что лазерное облучение клеток способно индуцировать синтез белков, например, цитокинов²⁹ – лейкоцитами, коллагена – фибробластами и др.

Таким образом, терапевтическое действие лазерного облучения является результатом инициации первичных свободнорадикальных реакций, которые, в свою очередь, активируют клеточное звено (лейкоциты, фибробласты, кератиноциты и др.), что выражается в увеличении продукции белков и цитокинов, пролиферации клеток и усилении бактерицидного действия.

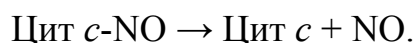
Фотолиз нитрозильных комплексов металлопротеинов. Монооксид азота (NO) синтезируется в митохондриях и может оказывать угнетающее действие на клеточное дыхание. Наиболее чувствительным звеном дыхательной цепи является, по-видимому, фермент цитохромоксидаза, активность которой подавляется NO уже при низких его концентрациях. Другие железосодержащие переносчики электронов в дыхательной цепи митохондрий ингибируются при более высоких концентрациях NO. На рис. 7.3 схематично показано образование и распад комплексов NO с переносчиками электронов дыхательной цепи митохондрий. При облучении светом лазера происходит распад комплексов и высвобождение NO.

Экспериментально была продемонстрирована светочувствительность комплексов NO с гемоглобином и цитохромом *c*. По-видимому, распад дыхательных комплексов NO связан с фотодиссоциацией NO:



где HbNO – комплекс, Hb²⁺ - гемоглобин.

При облучении нитрозильных комплексов цитохрома *c* также происходит фотолиз с высвобождением NO:



В изолированных митохондриях печени при облучении светом ГНЛ было обнаружено увеличение концентрации АТФ, рост трансмембранного потенциала и ΔpH, а также изменение ультраструктуры органоидов. Эти данные говорят о восстановлении работы дыхательной цепи. При облучении лимфоцитов крови человека светом ИК диодного лазера (длина волны излучения 820 нм) также возрастает уровень АТФ в клетках.

²⁹ *Цитокины* - небольшие пептидные информационные молекулы. Они регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференциацию, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия.

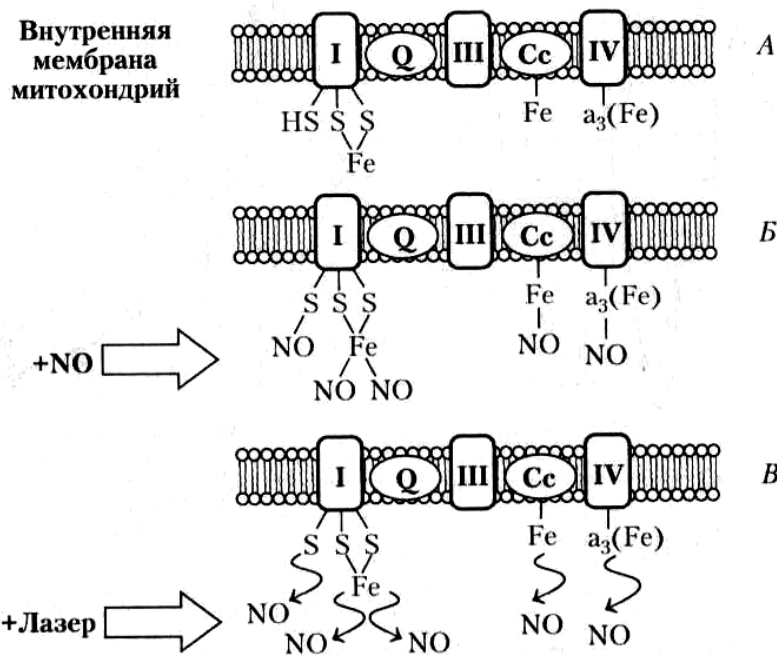


Рис. 5.6. Комплексы монооксида азота с переносчиками электронов в дыхательной цепи: I, III, IV – дыхательные комплексы, Q – коэнзим Q (убихинон), Cc – цитохром c; A – элементы внутренней мембраны митохондрий до взаимодействия с NO; B – ингибирование NO цитохрома c и цитохром c-оксидазы, приводящее к снижению потребления кислорода, синтеза АТФ и повышению продукции свободных радикалов; B' – лазерное излучение вызывает фотолиз комплексов NO с митохондриальными переносчиками электронов и восстанавливает дыхание и синтез АТФ (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

рис. 5.6, B).

Таким образом, лечебное действие излучения НИЛ (так же как и света других источников, например таких, как светодиоды) основано на различных первичных фотохимических реакциях. Можно считать, что механизм трех из них является доказанным.

Поскольку низкие дозы лазерного облучения оказывают стимулирующее действие на клетки, а высокие – повреждающее, знание условий протекания этих реакций в организме каждого конкретного больного (например, содержания порфиринов) необходимо для правильного дозирования и эффективного применения лазеротерапии.

5.4. Другие методы фототерапии

Гелиотерапия (от греч. *helios* - солнце, *therapia* - лечение) - солнцелечение. Термин «гелиотерапия» обозначает вид терапии, заключающийся в облучении ультрафиолетом, обычно комбинированным УФА и УФВ. Это поня-

На основе экспериментальных данных можно представить следующую схему действия излучения лазера на митохондрии или клетки. В отсутствие действующего излучения дыхание митохондрий частично подавлено монооксидом азота, который синтезируется митохондриальной NO-синтазой (см. рис. 5.6, A и B). NO тормозит дыхание за счет связывания с переносчиками электронов, такими как цитохромы и цитохромоксидаза, а также, возможно, железосерными комплексами (см. рис. 5.6, B). Облучение интенсивным светом вызывает фотолиз этих NO-комплексов и восстановление дыхания и синтеза АТФ (см.

тие может включать в себя облучение естественным солнечным излучением, но чаще при этом подразумевается использование специальных ламп для загара, ванн для загара или ванн, комбинирующих ультрафиолетовое и инфракрасное облучение тела. Этот метод применяется с целью закаливания организма и лечения некоторых заболеваний кожи, внелегочных форм туберкулеза и др.

Зимой интенсивность света часто намного ниже, чем летом: в зимний день интенсивность света меняется от 2 500 до 10 000 люкс, тогда как в яркий летний день это может быть 100 000 люкс. Множество исследований показывают, что мощный искусственный источник света может быть весьма эффективен в лечении сезонного аффективного расстройства, а также при синдромах позднего или раннего засыпания.

Было показано, что УФ облучение, способствует выработке эндорфинов (эндогенных опиоидов – аналогов морфина) в глубоких слоях кожи. Это может объяснить наблюдаемый при сезонном аффективном расстройстве, антидепрессивный эффект УФ облучения тела.

Использование видимого светового излучения более низкой интенсивности, но с энергией, сконцентрированной в определенном диапазоне длин волн, к которым наиболее чувствительны пигменты сетчатки глаза, а именно синего света, может давать, по меньшей мере, такой же, если не лучший, антидепрессивный эффект, как использование полного спектра излучения.

Синдром позднего засыпания характеризуется поздним наступлением сна и поздним пробуждением, но отсутствием расстройств самого сна. Синдром возникает в связи с нарушением режима, при котором время, когда больной может заснуть, наступает примерно спустя 3 часа после того, как он хотел бы заснуть. При синдроме раннего засыпания, который обычно наблюдается у пожилых людей, больные описывают чрезмерную сонливость, обычно наступающую в вечерние часы. Пробуждение наступает от 3 до 5 часов утра.

Терапия ярким светом может оказаться эффективной для таких больных. При лечении данных синдромов критически важна не только интенсивность светового излучения и длительность сеанса, но и соблюдение точного времени сеанса, с целью ресинхронизации биологических часов на правильное время засыпания и пробуждения. Некоторым людям помогает свет, который постепенно включается и нарастает по мощности незадолго до планируемого пробуждения, то есть такой сеанс фототерапии, который эмулирует естественный восход солнца, служащий сигналом к пробуждению.

Фототерапия ярким видимым светом является также методом лечения проблем, связанных с резкой сменой часовых поясов или рассинхронизацией биологических часов.

6. ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ

6.1. Основы фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия рака (ФДТ) – метод удаления доступных для света опухолей, основанный на введении в организм больных фотосенсибилизаторов, способных избирательно накапливаться преимущественно в опухолевых тканях. В результате повышается чувствительность опухолей к свету, т.к. под действием света ФС вступают в фотодинамические реакции, продуцируя АФК и свободные радикалы. Эти реакционноспособные частицы вызывают окислительное повреждение опухолей, приводящее к их гибели с последующим замещением нормальной тканью.

В настоящее время ФДТ используется для уничтожения небольших поверхностных опухолей, либо полостных опухолей, которые можно облучать при помощи световодов. Помимо этого, ФДТ применяется также для стерилизации операционного поля после хирургического удаления массивных опухолей.

Процесс ФДТ можно разделить на следующие этапы:

- 1) Селективное окрашивание патологически измененных тканей.
- 2) Фотофизические процессы, ведущие к генерации активных химических продуктов.
- 3) Темновые фотохимические процессы, ведущие к смерти клеток и деструкции опухоли.
- 4) Очищение раны и заживление.
- 5) Выведение ФС из организма.

Их можно далее подразделить на следующие стадии:

1а) Доставка красителя-ФС к опухолевой ткани. Фармакокинетика ФС зависит как от свойств органов или тканей, например от их кровоснабжения, так и от физико-химических характеристик ФС, особенно, от их гидрофильности или липофильности (гидрофобности). Гидрофильные ФС локализуются преимущественно в кровеносных сосудах, а гидрофобные – в опухолевой ткани. Они лучше проникают в опухолевые клетки. Через определенное время после внутривенного введения, разное для разных органов или тканей (обычно это несколько часов), концентрация ФС в опухоли достигает максимума, а затем он постепенно выводится из организма. Это дает возможность определить время, когда отношение концентрации ФС в опухоли к его концентрации в окружающих тканях максимально – до 10-30 к 1. В этом случае достигается наибольшая селективность воздействия, позволяющая избирательно разрушить опухоль. Определенные трудности возникают с доставкой гидрофобных ФС, не растворимых в воде. Они хорошо проникают в клетки и более эффективны, но при внутривенном введении могут агрегировать или

связываться с белками и клетками крови и других тканей. В крови, однако, есть естественные переносчики липофильных веществ – липопротеины, альбумины и т.д. В последнее время разрабатываются искусственные носители для доставки ФС в опухоль – липосомы, антитела, наночастицы и т.п.

1б) Проникновение ФС в клетки и распределение их между различными внутриклеточными компонентами (плазматической мембраной, органеллами, ядром и цитозолем). Этот процесс также зависит от физико-химических характеристик ФС. В целом можно сказать, что гидрофобные вещества локализуются в основном в различных клеточных мембранах, а гидрофильные после пиноцитоза³⁰ попадают в эндосомы³¹ и лизосомы³². При освещении лизосомальные мембраны разрушаются, и краситель может перераспределяться внутри клетки и неспецифически окрашивать внутриклеточные структуры.

2а) Доставка света к опухоли и ее облучение. В качестве источников света используются мощные лампы, лазеры, в частности, лазерные диоды, светодиоды и светодиодные матрицы, излучающие красный или ближний инфракрасный (ИК) свет в области 600-800 нм. В этой спектральной области, называемой «терапевтическим окном», собственное поглощение тканей, обусловленное, главным образом, водой, гемоглобином крови и миоглобином мышц, уменьшается, и свет глубже проникает в ткани, не повреждая их (рис. 6.1).

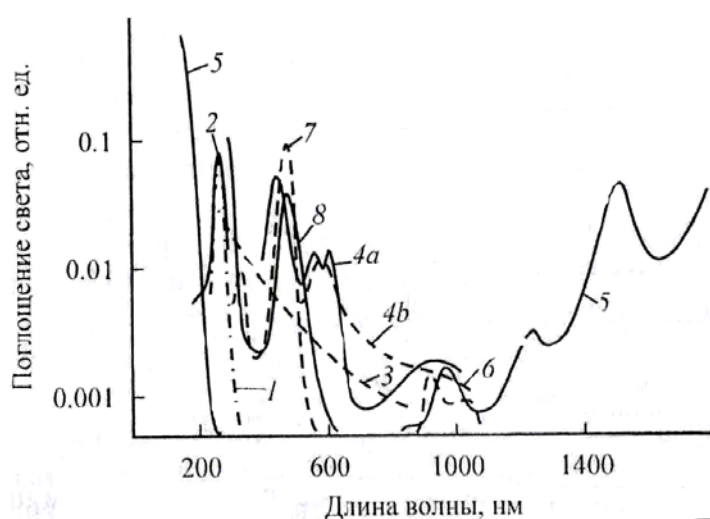


Рис. 6.1. Спектры поглощения важнейших хромофоров в клетках и тканях: 1 – ДНК, 2 – уроцианиновая кислота, 3 – меланин, 4а – оксигемоглобин, 4б – дезоксигемоглобин, 5 – вода, 6 – липиды, 7 – билирубин, 8 – каротин (Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я., 2006).

ИК излучение с длиной волны, большей 800 нм, несмотря на хорошее проникновение в биологические ткани, оказывается неэффективным из-за неспособности низкоэнергетических фотонов генерировать синглетный кислород. В тканях свет поглощается и рассеивается, его интенсивность падает. Глубина проникновения света не превышает 1 см. Поэтому наиболее эффективно повреждаются небольшие и

³⁰ *Пиноцитоз* (от греч. *pino* — пью, впитываю и *kytos* — вместилище, здесь — клетка), захват клеточной поверхностью жидкости с содержащимися в ней веществами.

³¹ *Эндосома* — мембранная внутриклеточная органелла, один из типов везикул.

³² *Лизосомы* (от греч. *lysis* — распад, разложение и *soma* — тело), структуры в клетках животных и растительных организмов, содержащие ферменты (около 40), способные расщеплять (лизировать) белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды.

плоские опухоли. Однако возможно послойное разрушение более крупных опухолей в несколько приемов. Для повышения эффективности облучения в опухолевую ткань иногда вставляют несколько световодов, доставляющих лазерное излучение на большую глубину.

2б) Поглощение света и первичные фотохимические реакции. После поглощения световых квантов молекулы ФС возбуждаются и переходят на верхний синглетный уровень. В соответствии со схемой Яблонского (рис. 2.3), энергия возбуждения безизлучательно расходуется в тепло, либо высвечивается в виде квантов флуоресценции, либо может пойти на фотохимические реакции. Последний процесс наиболее эффективно идет с участием долгоживущих триплетных возбужденных состояний. Поэтому ФС должны отличаться высоким квантовым выходом интеркомбинационной конверсии синглетного состояния в триплетное. В результате переноса энергии фото-возбуждения на кислород и различные биомолекулы генерируется синглетный кислород, другие активные формы кислорода и различные радикальные продукты.

3а) Вторичные темновые реакции и повреждение клеток. На следующем этапе в клетках происходят свободнорадикальные процессы окисления липидов, белков и других биомолекул, вызывающие повреждения биомембран и клеточных органелл. В клетках развиваются цитотоксические каскады, ведущие к смерти клеток, - апоптозу или некрозу (см. далее раздел 6.3.2).

3б) Лизис погибающих клеток. Происходит высвобождение продуктов распада, стимулирующих как гибель соседних клеток, так и фагоцитоз клеточных обломков соседними клетками или лейкоцитами крови. Фагоцитоз продуктов распада больших опухолей представляет серьезную проблему для организма, поэтому лучшие результаты достигаются при лечении небольших новообразований.

4) Заживление раны. В случае массивной некротической гибели клеток под влиянием интенсивного ФД воздействия формируется рубцовая ткань, а при преимущественном развитии апоптоза продукты распада клеток успевают перевариваться соседними клетками и макрофагами, заживление раны происходит быстрее, рубец не формируется и достигается лучший косметический эффект.

5) Выведение ФС из организма может занимать значительное время (до нескольких месяцев). При этом человек приобретает кожную фоточувствительность, что ограничивает возможность его пребывания на свету, снижает трудоспособность и качество жизни. Поэтому одной из проблем ФДТ является разработка быстро выводящихся сенсibilизаторов.

Механизм селективного накопления ФС в опухолях не вполне понятен. Его связывают с рядом причин:

- 1) благодаря утечке из сосудов опухоли, более проницаемых, чем сосуды нормальных тканей, в ней собирается больше ФС;
- 2) слабый лимфатический дренаж ведет к задержке ФС в опухоли;

- 3) макрофаги, многочисленные в опухолевой ткани, аккумулируют агрегированные и связанные с белками ФС;
- 4) большое межклеточное пространство в опухолях способствует накоплению гидрофильных ФС;
- 5) низкий рН внеклеточной жидкости в опухолях способствует связыванию ФС клетками, т.к. при снижении рН повышается липофильность порфиринов и облегчается проникновение их в клетки;
- 6) в опухоли много рецепторов липопротеинов низкой плотности, связывающих большое количество гидрофобных молекул ФС.

Основными мишенями ФДТ рака являются опухолевые клетки, капиллярная сеть, периферические нервные элементы и иммунные клетки. Разрушение опухолей происходит вследствие нескольких событий, заключающихся в прямом и непрямом повреждающем действии света.

Во-первых, ФДТ может *прямо* вызывать гибель опухолевых клеток за счет индукции некроза, либо апоптоза. Оказалось, однако, что прямое фотоповреждение опухолевых клеток не вносит доминирующий вклад в разрушение опухоли. Ведь для разрушения всех опухолевых клеток каждая из них должна получить достаточно большие дозы ФС и света и в опухоли должно быть достаточно кислорода. Но клетки неодинаково аккумулируют краситель, свет неравномерно распределен в гетерогенной опухолевой ткани, а концентрация кислорода выше вблизи капилляров. Поэтому предполагают важную роль ФД повреждения сосудов и нарушения кровотока, вызывающего сильную гипоксию, сохраняющуюся после воздействия. Это приводит, в конечном итоге, к гибели опухоли. Последний пример относится к *непрямому* повреждающему действию ФДТ.

В первом случае разрушение опухолевых клеток происходит за счет фотодинамического повреждения мембран и органелл клеток, например, митохондрий, при участии локализованных внутри клеток ФС, обычно гидрофобных. Гидрофильные ФС оказывают чаще не прямое повреждающее действие на клетки за счет разрушения кровеносных сосудов и прекращения снабжения опухоли питательными веществами и кислородом.

Другим фактором, влияющим на относительный вклад прямого и непрямого повреждения, является время между введением ФС и облучением. При облучении вскоре после внутривенного введения ФС гибель клеток происходит главным образом из-за повреждения кровеносных сосудов и нарушения кровоснабжения. Этот эффект неспецифичен, т.к. повреждаются микрососуды не только в опухолевых, но и в нормальных тканях. Позднее, когда ФС уходят из кровеносного русла и накапливаются в опухолевых клетках, светом индуцируется прямая гибель клеток, и воздействие оказывается более специфичным по отношению к опухоли.

Непрямой механизм удаления опухолей при ФДТ может заключаться также и в активации воспалительных реакций и противоопухолевого иммунного ответа. Эти процессы инициируются даже при очень низких, сублетальных дозах ФДТ. Фотоокислительное повреждение мембран приводит к появ-

лению метаболитов арахидоновой кислоты³³, являющихся медиаторами воспаления³⁴. Кроме того, фотоиндуцированное повреждение сосудов опухоли стимулирует прикрепление к стенкам сосудов нейтрофилов³⁵ и тромбоцитов³⁶, что приводит к нарушению функций сосудов и интенсивной продукции медиаторов воспаления, которые привлекают лейкоциты из крови. Активация нейтрофилов – неспецифических эффекторных клеток иммунной системы – вносит существенный вклад в противоопухолевый эффект ФДТ. Нейтрофилы после выхода из сосудов продуцируют токсичные активные формы кислорода, миелопероксидазу и лизосомальные ферменты, усиливающие повреждение опухолевой ткани. Помимо этого, оставшиеся в сосудах нейтрофилы играют ключевую роль в повреждении эндотелия этих сосудов.

Онкологические применения ФДТ ограничены опухолями, которые возможно облучить красным светом. Это могут быть либо поверхностные опухоли, которые можно непосредственно облучать, например, рак кожи, головы и шеи, либо опухоли полых внутренних органов, к которым можно доставить свет с помощью волоконного световода. К таким опухолям относятся новообразования полости рта, пищевода, желудка, толстого кишечника, легких, молочной железы, шейки матки, простаты и мочевого пузыря. Также проводятся экспериментально-клинические исследования применения ФДТ для лечения опухолей мозга, глаза, яичек, груди и т.д.

ФДТ, как и другие методы лечения, особенно эффективна на ранних стадиях онкологических заболеваний, в случае небольших локализованных опухолей. Ее достоинствами по сравнению с другими методами лечения рака (хирургией, радио- и химиотерапией) являются локальность и селективность

³³ *Арахидоновая кислота* - ненасыщенная жирная кислота, содержащая 20 атомов углерода, найденная в фосфолипидах клеточных мембран нейтрофилов, тканевых базофилов, моноцитов и других клеток. При высвобождении арахидоновой кислоты фосфолипазами запускается ряд сложных реакций, в результате чего образуются простагландины и другие медиаторы воспаления.

³⁴ *Медиаторы воспаления* — это местные химические сигналы, образующиеся, освобождаемые либо активируемые в очаге воспаления, действующие и разрушаемые также в пределах очага.

³⁵ *Нейтрофилы* (от лат. *neuter* — ни тот, ни другой и греч. *phileo* — люблю), микрофаги, специальные лейкоциты, одна из форм белых клеток крови — лейкоцитов — у позвоночных животных и человека. Диаметр 9—12 мкм. Цитоплазма нейтрофилов содержит нейтрофильные зёрна, т. е. окрашивающиеся как основными, так и кислыми красителями (отсюда название). В зависимости от степени зрелости нейтрофилов различают: миелоциты, юные нейтрофилы с несегментированным ядром, палочкоядерные — с ядром в виде изогнутой палочки и сегментоядерные нейтрофилы с сегментированным ядром. Нейтрофилы способны к фагоцитозу мелких инородных частиц, включая микробов. Выделяя гидролитические ферменты, они могут растворять (лизировать) омертвевшие ткани. Протеазы и токсические кислородосодержащие свободные радикалы, образующиеся в нейтрофилах, как предполагается, вызывают эндотелиальное повреждение, что приводит к увеличению сосудистой проницаемости.

³⁶ *Тромбоциты* (от тромб и греч. *kytos* —местилище, здесь — клетка), один из видов форменных элементов крови позвоночных животных и человека; участвуют в процессе её свертывания.

воздействия, возможность многократного повторения процедур, послойной обработки опухолей, бесконтактность воздействия, возможность сочетания с другими методами лечения и сочетания в одной процедуре флуоресцентной диагностики и лечебного воздействия, снижения метастазирования.

ФДТ дает высокий процент апоптозной смерти клеток и в результате дает хорошее заживление раны первичным натяжением без образования больших рубцов.

К недостаткам этого метода относятся: трудность точной дозиметрии воздействия, иногда недостаточная эффективность, медленное выведение красителя из организма, придающее организму нежелательную фоточувствительность.

Успехи ФДТ злокачественных новообразований способствовали проведению исследований по применению ФДТ для лечения неопухолевых заболеваний с быстрой пролиферацией тканей (например, эндометриоза, псориаза, фиброзно-клеточной гиперплазии эндотелия сосудов, макулярной дегенерации сетчатки, ревматоидных и псориатических артритов и др.). Основанием для этого являются данные о селективном накоплении и длительной задержке ФС клетками и тканями с высокой пролиферативной активностью. Важной сферой применения ФДТ стала гнойная хирургия. В последние годы показано, что этот метод перспективен для лечения бактериальной и грибковой инфекции, а также для стерилизации переливаемой крови или эритроцитарной массы.

6.2. Фотосенсибилизаторы

6.2.1. Свойства фотосенсибилизаторов

ФС является ключевым элементом в процедурах ФДТ. Фундаментальной предпосылкой для оптимального ответа на фотосенсибилизацию является способность клеток/тканей мишеней накапливать и селективно удерживать фотосенсибилизирующие соединения.

ФС могут быть разделены на три широких семейства (рис. 6.2): 1) на основе порфирина (например, «Фотофрин», «Аласенс»), 2) хлорофиллосодержащие ФС (например, хлорины, пурпурины, бактериохлорины) и 3) красители (например, фталоцианин, нафталоцианин). Большинство используемых в настоящее время ФС принадлежит к порфириновому семейству.

Порфирины и их гидрированные аналоги – хлорины и бактериохлорины – играют важную роль в природе. Они входят в состав гемоглобина, миоглобина, ферментов каталазы, пероксидазы и многочисленной группы цитохромов. Эти гемопротеиды участвуют в транспорте кислорода и обеспечении животных организмов энергией. Фотосинтез и родственные ему процессы выполняются второй обширной группой порфиринов – хлорофиллами и бактериохлорофиллами.

В основе всех порфириновых соединений лежит сопряженное макроциклическое кольцо (рис. 6.2, а), состоящее из четырех пиррольных остатков, соединенных между собой метиновыми мостиками. Хлорины имеют два добавочных атома водорода (вместо двойной связи) в положениях 17 и 18 (рис. 6.2, б), а бактериохлорины – 4 атома водорода в положениях 7, 8, 17 и 18. Тетраазапорфины представляют собой порфирины с четырьмя атомами азота вместо мезо-углеродных мостиков (рис. 6.2, в). Наиболее изученными соединениями этого ряда являются фталоцианины и нафталоцианины.

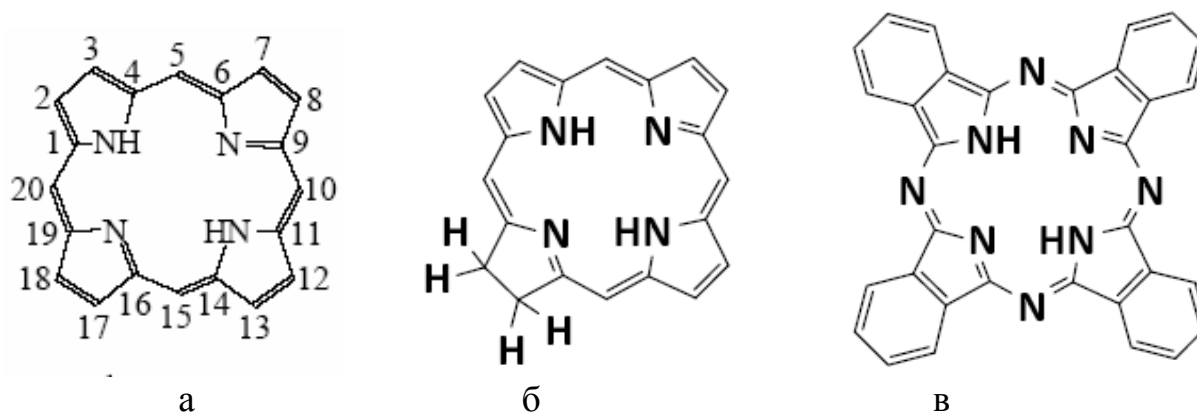


Рис. 6.2. Базовые структуры порфиринов (а), хлоринов (б) и фталоцианинов (в).

Традиционно *порфирины* называют *первым поколением* ФС. Производное гематопорфирина (HrD), эфир дигематопорфирина (ЭДГП) - первый препарат-ФС, разработанный в конце 1970 гг. группой ученых Канады и США под руководством Т.Дж. Догерти (Т.J.Dougherty). ЭДГП является эффективным сенсibilизатором и сегодня используемым в онкологической практике. HrD не имеет строго определенного химического состава, а является смесью множества различных порфиринов, включая гематопорфирин, протопорфирин, дейтеропорфирины, их производные, мономеры, димеры и олигомеры, их эфиры и т.д. В попытке его очистить и выделить действующее начало была выделена более активная фракция дигематопорфирина, в которой две молекулы гематопорфирина соединены эфирной связью. На эффективность препарата сильно влияет агрегация порфиринов в воде. Агрегированные молекулы фотохимически неактивны, но более липофильны и лучше проникают в клеточные мембраны, где в гидрофобном окружении они могут мономеризоваться и стать активными. Степень полимеризации зависит от способа получения препарата, который патентуется. Препараты HrD, полученные в разных странах, называются «Photofrin», «Photofrin-2» (США, Канада), «Photosan-3» (Германия), «Фотогем» (Россия).

«Photofrin» представляет собой смесь олигомеров гематопорфирина (число мономеров от 2 до 6, преимущественно 2-3), которая очищена от менее активных мономеров. Химическая формула этого ФС представлена в таблице 6.1. Это сравнительно стабильный продукт с минимальными вариациями между отдельными партиями. Этот препарат обладает сравнительно невысоким пиком поглощения света на длине волны 630 нм. Дозы световой

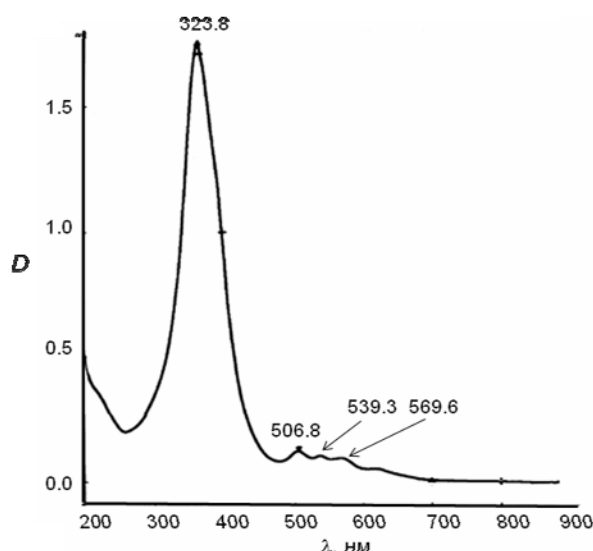


Рис. 6.3. Спектр поглощения фотосенсибилизатора «Фотогем» (по Цыб А.Ф. и др., 2009).

ском растворе: 507, 540, 570, 620 нм, в клетке – 630 нм (рис. 6.3), но максимально он поглощается при 400 нм, однако в этой полосе свет быстро затухает за счет поглощения в ткани. Поэтому ФДТ с использованием гематопорфиринов осуществляется в диапазоне 620-630 нм, где поглощение света тканями значительно меньше.

Максимальные уровни этого ФС в ткани наблюдаются через 5 – 10 часов, 1% «Фотогема» активно участвует в циркуляции через 24 часа, а 0.01% можно обнаружить через 75 дней. В коже фотосенсибилизирующий компонент на низких уровнях присутствует в течение 4-6 недель, что требует от пациентов в течение этого периода соблюдения мер предосторожности, т.е. избегания контакта открытых участков тела с солнечным или электрическим светом.

Таким образом, у всех ФС первого поколения имеется ряд недостатков: медленное накопление в опухолевых тканях, сравнительно невысокая терапевтическая эффективность, особенно при лечении массивных опухолей, продолжительная кожная фоточувствительность, неопределенность химического состава. Это побудило исследователей к разработке следующего поколения ФС. Однако, поскольку «Фотофрин» и его аналоги явились первыми разработанными ФС для ФДТ, большинство литературных данных по ФДТ связаны с применением препаратов этой группы. За двадцать лет клинических испытаний в мире накоплен богатый опыт применения этого препарата для флуоресцентной диагностики и ФДТ рака кожи, орофарингеальной области, легкого, пищевода, желудка и кишечника, гинекологических раков и ряда неопухолевых заболеваний. Препараты из других групп, как правило, по своим характеристикам, фотодинамической активности, сравниваются с производными гематопорфирина.

энергии существенно варьируют и зависят от размеров и локализации опухолевого поражения и составляют от 50 до 500 Дж/см². Он вводится в организм больных внутривенно и вызывает довольно длительный - до 8 недель - период повышенной светочувствительности.

«Фотогем» первый отечественный ФС. Он обладает высокой селективностью накопления в опухолевых тканях, большой терапевтической широтой, низкой токсичностью, оказывает умеренно выраженное иммуностимулирующее действие. «Фотогем» имеет следующие максимумы поглощения в изотоническом

Ко второму поколению относятся синтетические порфирины, хлорины, производные фталоцианина и другие синтетические ФС. Главными преимуществами этих соединений является химическая однородность, растворимость, поглощение света в более длинноволновой части спектра (650 - 730 нм), высокий коэффициент экстинкции и квантовый выход синглетного кислорода. Эти вещества обладают поглощением в «фотодинамическом окне», улучшенной фармакокинетикой. Поскольку это индивидуальные соединения, то проще исследовать их внутриклеточную локализацию. Однако избирательность накопления их в опухоли остается не очень высокой.

Применение производного бензопорфирина ВРD-МА, вертепорфина (производится в Канаде, торговое название «Visudyne»), в качестве ФС для ФДТ некоторыми авторами признано весьма эффективным. Этот препарат имеет высокий длинноволновый пик поглощения (690 нм) и короткий период выведения из организма - до 7 дней. По некоторым данным вертепорфин активно накапливается в опухолевой ткани, градиент его накопления между опухолевой и здоровой тканью достигает 30:1. Этот фотосенсибилизатор успешно применяется при опухолях кожи, псориазе. Имеются сообщения о применении этого препарата в эксперименте при системной красной волчанке, пигментной и беспигментной меланоме.

Наряду с введением экзогенных сенсibilизаторов ведутся работы по активации синтеза ФС в самих опухолевых клетках из предшественников. Так было обнаружено, что введение в организм δ-аминолевулиновой кислоты (ALA) приводит к усилению синтеза и накоплению протопорфирина IX в опухолевых клетках, что повышает их чувствительность к свету. ALA является предшественником эндогенного ФС протопорфирина IX (рис. 6.4), вырабатывающегося в клетках для синтеза гема, а также других метаболитов порфирина, таких как копропорфирин.

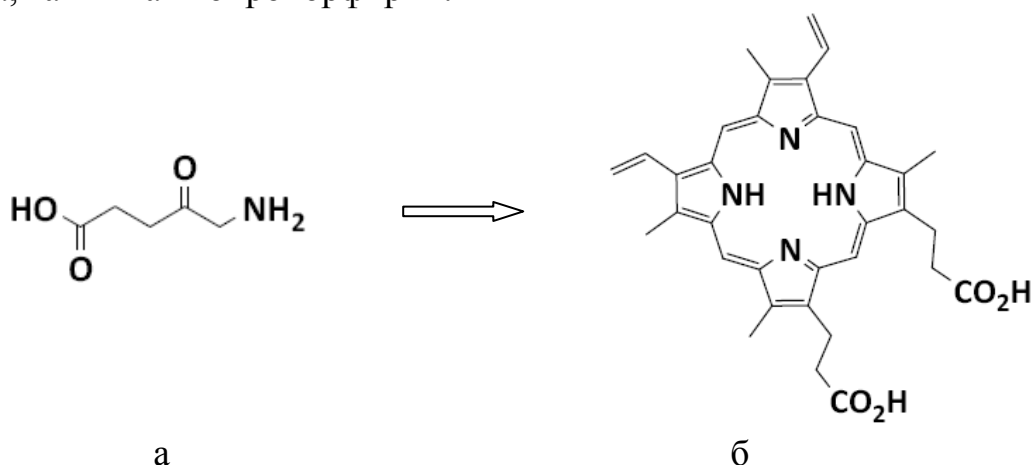


Рис. 6.4. Химические формулы δ-аминолевулиновой кислоты (а) и протопорфирина IX (б).

Это вещество под разными торговыми марками производит ряд фирм («Levulan» в США, «Аласенс» в России, и др.).

ALA и ее метильное производное («Metvix») легко проникают через кожу. Для лечения рака кожи они наносятся в составе мази на кожу, покрывающую опухоль. Для возбуждения фотодинамической реакции на ткани,

обработанные ALA, воздействуют в той же полосе спектра, что и при использовании производного гематопорфирина - 628 - 632 нм. Облучение полностью разрушает опухоли с минимальным повреждением кожи и хорошим косметическим эффектом. Поскольку протопорфирин хорошо флуоресцирует, то его ALA-индуцированный синтез в опухолевых клетках также используется для флуоресцентной визуализации и диагностики опухолей. В эксперименте на мышах высокие уровни флуоресценции порфиринов были отмечены как при использовании свободной аминолевулиновой кислоты, так и ее эфиров. Основным преимуществом этого ФС является быстрый метаболизм и как следствие - короткий период повышенной светочувствительности (см. табл. 6.1). Однако к настоящему времени в клинике применяются только наружные формы препарата - мазь и липосомный гель. Описано успешное применение ФДТ с δ -аминолевулиновой кислотой в дерматологии: при раке кожи, неопухолевых заболеваниях кожи. Аппликационное применение ФС в целом и ALA в частности не позволяет достаточно глубоко воздействовать на опухолевую ткань. Более того, при попытках системного введения ALA отмечено развитие побочных эффектов – тошнота, рвота, головная боль, нарушения кровообращения, транзиторное повышение уровня аминотрансфераз крови, а также удлинение периода повышенной светочувствительности.

Порфицены - синтетические порфирины - по данным ряда исследователей превосходят «Photofrin» и его аналоги по терапевтическому действию, так как обладают значительно более высоким коэффициентом экстинкции при той же длине волны возбуждения - 630 нм. По спектральным характеристикам порфицены находятся между сенсibilизаторами первого и второго поколения. При аппликационном применении порфицены активно резорбируются кожей, проникая на значительную глубину. В настоящее время ФС из этой группы проходит предклинические испытания при раке кожи, меланоме и псориазе. Для порфиценов характерно хорошее накопление в опухоли и низкая фототоксичность кожи.

Отдельные сообщения посвящены использованию сульфата мезотетрафенилпорфирина (Tetrasodium-meso-tetraphenylporphyrinsulfonate). Это полусинтетический ФС порфиринового ряда; ФДТ с его применением при поверхностно стелящемся раке кожи сопровождалось выраженным терапевтическим эффектом. Период повышенной светочувствительности составляет около 6 недель.

ФС из группы хлоринов получают из хлорофилла *a*. Важным производным хлорофилла является хлорин e_6 (рис. 6.5). Исходным сырьем для его производства является микроводоросль – *Spirulina platensis*.

В экспериментах *in vitro* при изучении спектров поглощения в этаноле было установлено, что спектр хлорина e_6 содержит характерную полосу *Soret* в области 405 нм и четыре пика в области 506, 536, 610 и 666 нм. Смещение спектра хлорина e_6 в длинноволновую область позволяет повысить проницаемость тканей для видимого света и снизить поглощение света гемоглоби-

ном крови в области 500-600 нм, что играет существенную роль для повышения эффективности ФДТ опухолей.

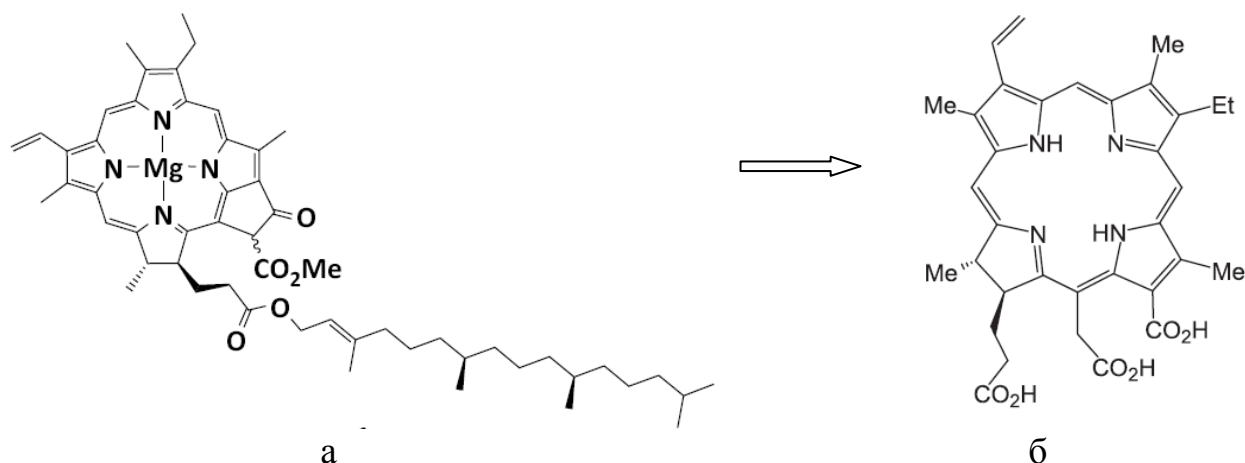


Рис. 6.5. Химические формулы хлорофилла *a* (а) и хлорина *e*₆ (б).

Наиболее распространенными являются N-аспартил-хлорин *e*₆ (производится в Японии, торговое название NPe₆) и мезо-тетра-гидроксифенил-хлорин mTHPC (темопорфин, производится в Великобритании, торговое название – «Foscan», табл. 6.1). Эти ФС активно поглощают свет в полосе 652 – 664 нм, имеют высокий коэффициент экстинкции и выход синглетного кислорода. «Foscan» является наиболее цитотоксически активным ФС из ныне существующих: для получения цитотоксического эффекта, сравнимого и даже превосходящего «Photofrin-2», достаточно применение низкой дозы фотосенсибилизатора (0.1 мг/кг) и света (10 – 20 Дж/см²). Причины такой высокой фотодинамической активности этого вещества в настоящее время недостаточно изучены, предполагается, что в организме оно образует высокоактивные соединения с белками плазмы крови. С клинической точки зрения этот ФС обладает распространенным недостатком – длительным периодом повышенной светочувствительности, который длится до 7 недель.

Отечественный препарат "Радахлорин" содержит композицию из трех циклических тетрапирролов хлориновой природы (с гидрированным кольцом D), основной из которых (80-90 %) - хлорин *e*₆. "Радахлорин" способен разрушать биологические субстраты после возбуждения светом с длиной волны 654-670 нм, чему соответствует эффективная глубина проникновения света в ткани до 7 мм. Высокая степень фототоксичности "Радахлорина" связана с высоким квантовым выходом интерконверсии, что коррелирует с высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Сохраняющаяся при этом способность препарата флуоресцировать оставляет возможность для люминесцентной диагностики очагов неопластического изменения тканей. Для этого препарат возбуждают в любой из полос - 406, 506, 536, 608 или 662 нм и регистрируют интенсивную флуоресценцию при 668 нм. Препарат выводится из организма через сутки на 94%.

Представителями второго поколения ФС на основе хлорина *e*₆ являются также «Фотолон» и «Фотодитазин». «Фотолон» представляет собой комплекс

натриевой соли хлорина e_6 и низкомолекулярного медицинского поливинилпирролидона. Химическая формула этого ФС представлена в таблице 6.1.

ФС «Фотолон» проявляет избирательное накопление в злокачественных клетках. Интенсивность его люминесценции в опухоли в 2-4 раза выше, чем в мышце, причем максимальное различие отмечается через 10 и 14 часов после введения. В целом, основное количество введенного «Фотолона» выводится в первые 10-12 часов, а через 24 часа в организме остается не более 4-6% от первичной величины.

«Фотодитазин» представляет собой N-метилглюкаминовою соль хлорина e_6 (табл. 6.1). Препарат обладает мощной полосой поглощения в красной области спектра с максимумом на длине волны 662 нм и флуоресценцией в полосе 660-680 нм (по полуширине) (рис. 6.6).

«Фотодитазин» прекрасно растворяется в воде, не образуя агрегированных форм, что характерно для производных гематопорфирина. Способность «Фотодитазина» связываться с клеточными мембранами опухолевой ткани

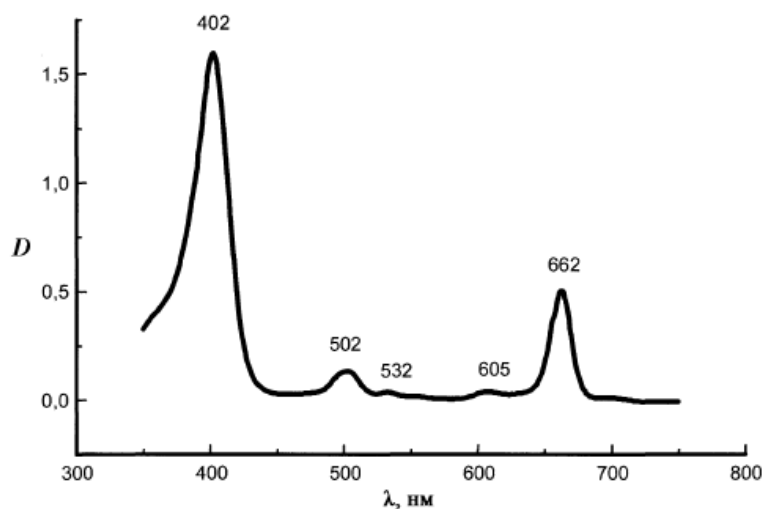


Рис. 6.6. Спектр поглощения фотосенсибилизатора «Фотодитазин» (Цыб А.Ф. и др., 2009).

обуславливает его высокую фотодинамическую активность. При введении «Фотодитазина» в организм максимум накопления в опухоли наступает через 1,5 – 2 часа при индексе контрастности по отношению к окружающей нормальной ткани более 10 и практически полном выведении из организма в течение 28 часов.

Производные хлорина e_6 к настоящему времени весьма тщательно изучены в экспериментах. Ведутся исследования как по применению их в чистом виде, так и в виде конъюгатов с биологическими молекулами. Предварительные данные о клиническом применении производных хлорина e_6 демонстрируют его высокую фотодинамическую активность при раке кожи и ротоглотки. При этом продолжительность периода повышенной светочувствительности при системном введении не превышает 7 дней.

Таким образом, для производных хлоринов характерна высокая избирательность, достаточная эффективность лечения и очень незначительная сенсибилизация кожи (больным необходимо ограничивать контакт с ярким светом только в течение 2 – 4 суток).

На основе хлорофилла созданы пурпурины. Этиопурпурин олова (производится в США, торговое название – «Purlytin») активно поглощает свет с длиной волны 660 нм. В настоящее время он применяется в порядке клини-

ческих испытаний в основном при неопухолевых заболеваниях – возрастной макулодистрофии, псориазе. Проводятся предклинические исследования этого фотосенсибилизатора для ФДТ рака кожи, легкого и предстательной железы. Фотодинамическая активность этого препарата ниже, чем у производных гематопорфирина, а период повышенной светочувствительности при системном введении длится до 1 месяца.

Бактериохлорофилл *a* – основной фотосинтетический пигмент пурпурных бактерий – отличается от хлорофилла *a* дополнительным гидрированием двойной связи. Это приводит к смещению основной полосы поглощения в ближнюю ИК-область приблизительно на 100 нм. По аналогии с хлорофиллом *a* получены производные бактериохлорофилла и среди них – бактериопурпурин с интенсивной полосой поглощения в области 820 нм. Производные бактериохлорофилла по своим спектральным и фотофизическим характеристикам являются перспективными соединениями для ФДТ.

Фталоцианины имеют четыре бензольных кольца, сопряженных с макроциклом. Для них характерно наличие высокоинтенсивного пика в области 670 нм. Известно большое количество фталоцианинов с различными заместителями R и ионами металла в макроцикле. Комплексы с цинком, алюминием и кремнием проявляют повышенную биологическую активность.

Одним из ФС второго поколения является препарат «Фотосенс» (Россия) – сульфированный фталоцианин алюминия AlPcS (см. табл. 6.1). Клинические испытания этого препарата в России начали проводиться с 1994 года.

Электронный спектр поглощения препарата в физиологическом растворе имеет максимумы поглощения в УФ и видимом диапазонах спектра на длинах волн 675-680 нм (рис. 6.7), что обеспечивает более глубокое проникновение лазерного излучения в биоткани и тем самым способствует повышению терапевтической эффективности ФДТ. Замещение в ядре фталоцианинов делает их более липофильными, чем сенсибилизаторы первого поколения,

приводит к лучшему проникновению в мембрану и большей активности.

Применение этого препарата при различных локализациях рака, в том числе и при раке кожи, орофарингеальной локализации, бронхов, пищевода показало высокую терапевтическую эффективность. Зарубежный опыт применения фотосенсибилизаторов из группы производных фталоцианина также свидетельствует об их высокой терапевтической активности. Проводятся исследования по применению производного фталоцианина для фото-

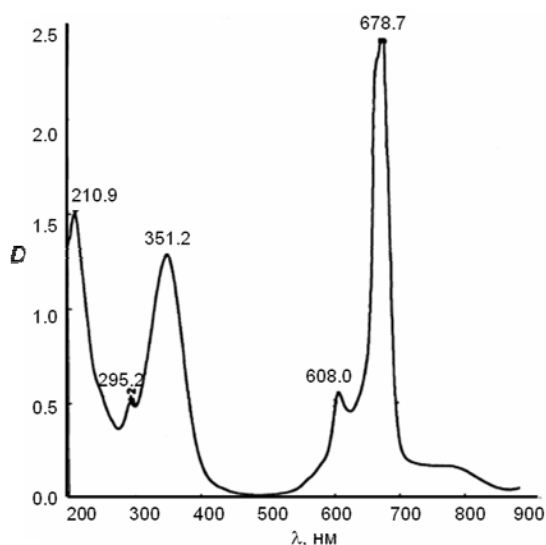


Рис. 6.7. Спектр поглощения фотосенсибилизатора «Фотосенс» (по Цыб А.Ф. и др., 2009).

динамической стерилизации компонентов крови.

Как при использовании «Фотогема» и других аналогичных препаратов, так и после внутривенного введения «Фотосенса» отмечается повышенная чувствительность кожи пациентов, однако продолжительность периода кожной фототоксичности у фталоцианина алюминия более выражена и составляет от 2 до 9 месяцев. Поскольку «Фотосенс» длительно задерживается в тканях пациентов, то это позволило разработать методику пролонгированной фотодинамической терапии.

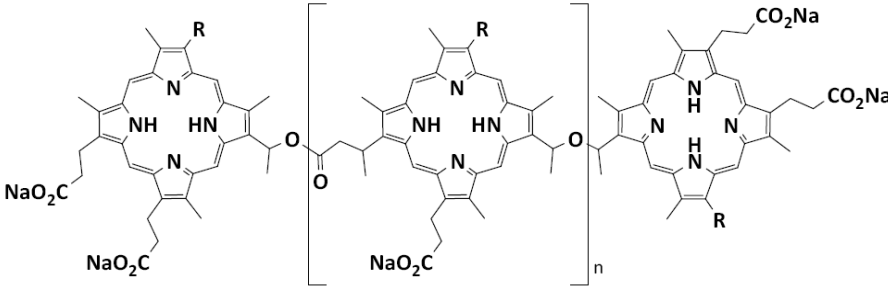
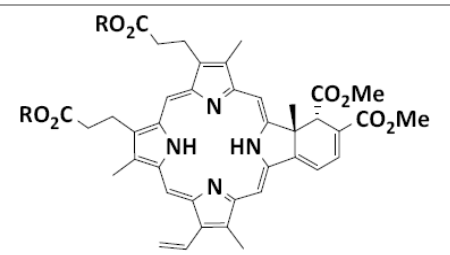
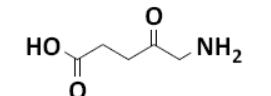
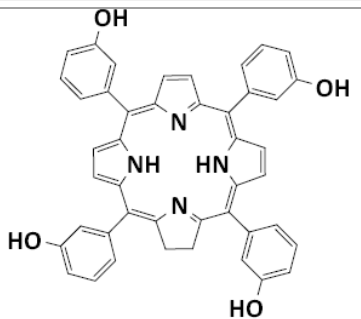
Серьезная трудность при работе с фталоцианинами связана с их высокой гидрофобностью. Для повышения растворимости в воде получают сульфированные металлокомплексы фталоцианинов. Степень сульфирования сильно влияет на биологическую активность. Показано, что для алюминиевого комплекса фталоцианина активность возрастает в ряду: $AlPcS_4 \rightarrow AlPcS_3 \rightarrow AlPcS_2$, где $S_2 - S_4$ обозначают количество сульфогрупп в макрокольце.

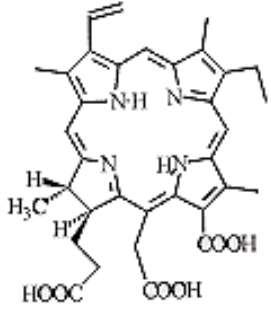
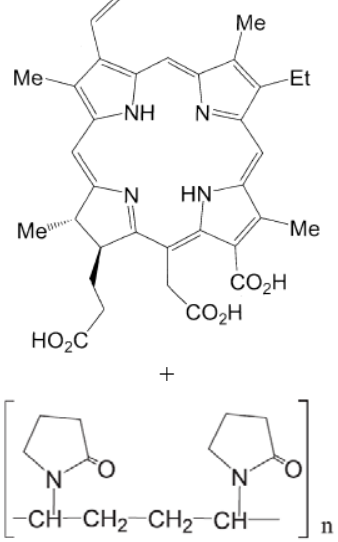
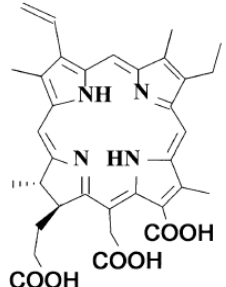
Большой интерес представляет группа производных фталоцианина - нафталоцианины, эти ФС обладают способностью к активному поглощению света в длинноволновой полосе спектра – 750 - 780 нм. Свет с этой длиной волны способен глубоко проникать в биологические ткани. Кроме того они имеют продолжительное время жизни триплетного состояния и эффективно генерируют синглетный кислород. Эти обстоятельства делают нафталоцианины перспективными фотосенсибилизаторами для ФДТ массивных опухолей, а также меланомы кожи. К сложностям работы с этими соединениями относится их высокая гидрофобность и, как следствие, плохая растворимость в воде. Одним из достоинств нафталоцианинов является возможность использования при работе с ними сравнительно недорогих и компактных диодных лазеров.

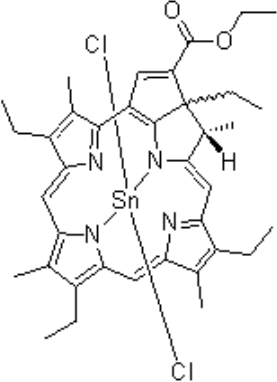
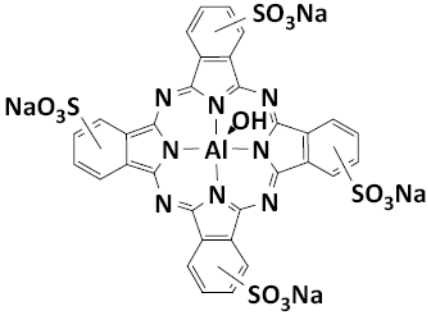
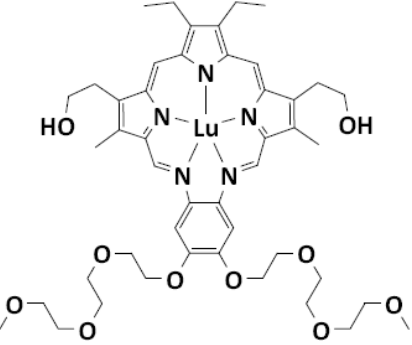
Новыми перспективными ФС для ФДТ являются текзафирины, синтетические вещества, названные так из-за химической формы молекулы, напоминающей флаг штата Техас. Торговые названия этих препаратов – «Lutrin», «Antrin» и «Optrin». Эти вещества активно абсорбируют свет с длиной волны 732 нм, что также позволяет использовать их при массивных опухолях. Период повышенной светочувствительности при системном введении текзафиринов составляет 3 – 7 суток. В настоящее время проводятся клинические испытания ФДТ с этими препаратами при злокачественных новообразованиях, в частности раке молочной железы, а также неопухоловой патологии – атеросклерозе коронарных сосудов и возрастной макулодистрофии.

В таблице 6.1. представлены некоторые характеристики используемых в клинике ФС.

Таблица 6.1. Характеристики некоторых фотосенсибилизаторов, используемых в клинике.

Группа	Фотосенсибилизатор	Химическая формула	Основная длина волны поглощения (нм)	Длительность периода фотосенсибилизации
Порфирины	Олигомер гематопорфирина HpD («Photofrin», «Фотогем»)	 <p>R = -CH=CH₂, -CHOH-CH₃, n = 0-6.</p>	630	До 2 месяцев
	Производное бензопорфирина BPD-MA, вертепорфин («Visudyne»)		690	3 - 7 дней
	δ-аминолевулиновая кислота ALA («Levulan», «Аласенс»)		630	1 - 2 дня
Хлорины	Мезо-тетра-гидроксифенил-хлорин mTHPC, темопорфин («Foscan»)		652-664	До 7 недель

<p>Композиция из трех циклических тетрапирролов хлоринов («Радахлорин»)</p>		<p>654-670</p>	<p>1 - 2 дня</p>
<p>Комплекс натриевой соли хлорина e_6 и низкомолекулярного медицинского поливинилпирролидона («Фотолон»)</p>		<p>666</p>	<p>1 - 2 дня</p>
<p>N-метилглюкаминная соль хлорина e_6 («Фотодитазин»)</p>		<p>662</p>	<p>28 часов</p>

	<p>Этиопурпурин олова SnEt₂ («Purlytin»)</p>		<p>660</p>	<p>1 месяц</p>
<p>Фталоцианины</p>	<p>Сульфированный фталоцианин алюминия AlPcS («Photosens»)</p>		<p>670 - 680</p>	<p>До 9 месяцев</p>
<p>Текзафирины</p>	<p>Текзафирин лютеция («Lutrin», «Antrin», «Optrin»)</p>		<p>732</p>	<p>3 - 7 дней</p>

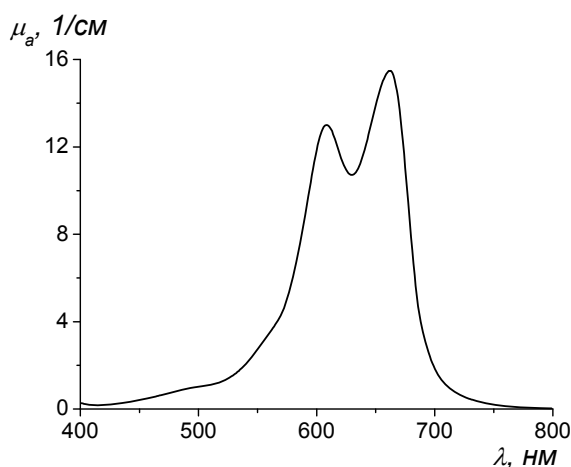
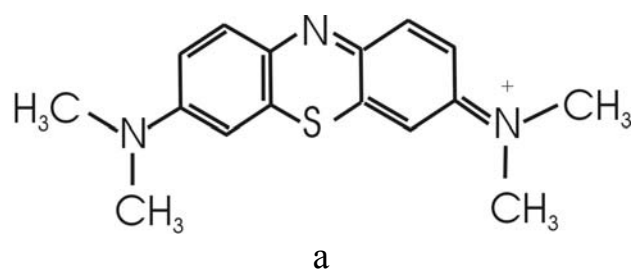


Рис. 6.8. Химическая формула (а) и спектр поглощения водного раствора метиленового синего (б) с концентрацией 50 мкг/мл.

сенсibilизатор для ФДТ рака и инфекционных заболеваний. МС существует в виде мономеров и димеров. В водных растворах мономерная форма поглощает свет в $\lambda_{\text{max}} = 668$ нм, димер - в $\lambda_{\text{max}} = 612$ нм. На рис. 6.8 (а) представлена химическая формула, (б) – спектр поглощения водного раствора МС.

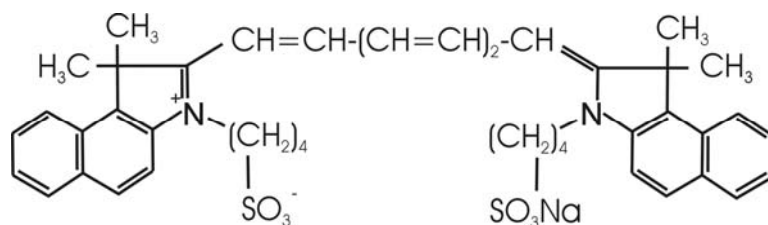
Принцип работы антимикробной ФДТ основан на том, что молекулы ФС прикрепляются к оболочке бактерии, т.к. молекула МС имеет положительный заряд. Облучение светом с длиной волны, соответствующей пику поглощения фотосенсibilизатора, приводит к образованию $^1\text{O}_2$, который разрушает стенки бактериальных и грибковых клеток, приводя к их гибели. Тот факт, что летальная фотосенсibilизация не является видоспецифичной, имеет определенное преимущество: в смешанной инфекции можно уничтожить все имеющиеся микроорганизмы (особенно резистентные к антибиотикам). Кроме того, нет привыкания к ФС (можно проводить повторные курсы при значительной бактериальной обсемененности).

Индоцианиновый зеленый (ИЗ) в качестве красителя широко применяется в различных областях медицины благодаря сильному поглощению в ближней ИК области спектра, низкой токсичности и быстрому выводу из организма. В течение многих лет он применялся только в диагностике в качестве контрастного вещества при визуализации

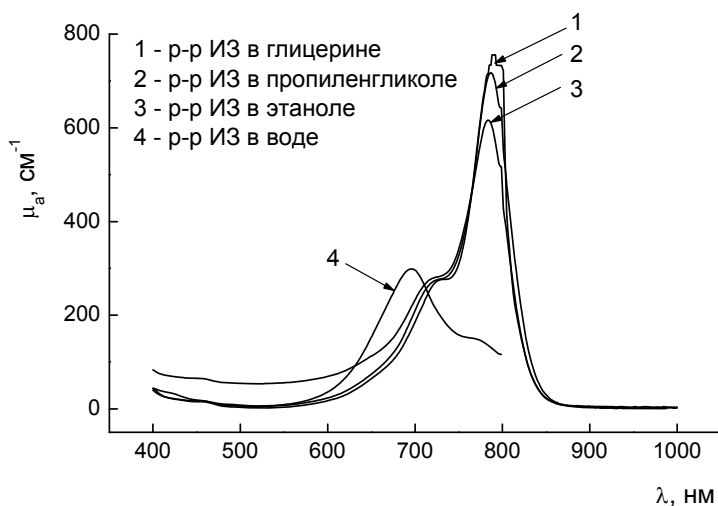
В качестве ФС также используются различные красители: метиленовый синий, толуидиновый синий, индоцианиновый зеленый, янус зеленый и другие. Рассмотрим в качестве примера метиленовый синий и индоцианиновый зеленый.

Метиленовый синий (МС) давно известен как эффективный фотогенератор синглетного кислорода. МС - органический краситель группы тиозиновых красителей; применяется в медицинской практике как антисептическое (обеззараживающее) средство. Также он обладает окислительно-восстановительными свойствами и может играть роль акцептора и донатора ионов водорода в организме; на этом основано его применение в качестве антидота при некоторых отравлениях.

В последнее время он привлекает внимание как перспективный



а



б

Рис. 6.9. Химическая формула (а) и спектры поглощения растворов индоцианового зеленого в различных растворителях (б) с концентрацией 1 мг/мл.

красителя приходится на 805 нм для крови и 810 нм для эпидермиса человека. Строгое соответствие между длиной волны лазерного излучения и длиной волны максимума поглощения ИЗ обеспечивает высокую селективность фотодинамического воздействия.

МС и ИЗ, «Фотодитазин» и другие ФС активно используются для фотоинактивации бактерий при инфекционных заболеваниях кожи, гайморовых пазух, кишечника, в процессе заживления гнойных, длительно не заживающих ран и трофических язв и др.

Существенно большего терапевтического эффекта удастся добиться при совместном использовании лазерного излучения и различных фотодинамических и фототермических красителей. Перспективным направлением является комбинация ФС с наночастицами с плазмонным резонансом (ПР).

Спектральная настройка ПР наночастиц и соотношения между их эффективностями поглощения и рассеяния осуществляется путем изменения размера, формы, металла и структуры частиц. Развитие технологий синтеза наночастиц за последние 10 – 15 лет предоставило широкий выбор объектов исследований, начиная от хорошо известных теперь золотых наностержней и нанооболочек и заканчивая экзотическими структурами наподобие «наноклеток».

кровенасыщенных органов. В последнее время его применение расширилось и в область фототерапии опухолей.

ИЗ

- трикарбоцианиновый краситель. В зависимости от растворителя и концентрации красителя в растворе максимум поглощения может находиться между 650 и 800 нм (рис. 6.9). Ниже 600 нм он практически не имеет поглощения. В результате связывания молекул ИЗ с органическими молекулами

молекулами биологических тканей его пик поглощения смещается в длинноволновую область. Максимум поглощения

В последние годы появился ряд работ, продемонстрировавших усиление биологической активности различных красителей при совместном применении их с ПР-наночастицами. Как правило, используются металлические наночастицы, к поверхности которых с помощью физической адсорбции или ковалентной пришивки прикреплены фотодинамические красители или антибиотики. Такие наноструктуры называют конъюгатами, а процедуру прикрепления биомакромолекулы к поверхности наночастицы – функционализацией.

С практической точки зрения каждый из типов функционализации наночастиц имеет свои преимущества и недостатки: ковалентная пришивка обеспечивает прочную химическую связь красителя с поверхностью частицы и исключает десорбцию; электростатическое прикрепление, в свою очередь, не требует модификации молекул красителя и существенно проще с химической точки зрения.

Механизм усиления фотодинамического или фототоксического действия молекулярных красителей при конъюгации с ПР-наночастицами является на сегодняшний день дискуссионным. Можно предположить три возможных варианта: 1) усиление взаимодействия молекулы со световой волной за счет усиления поля вблизи поверхности частицы; 2) совместное фотодинамическое действие красителя и фототермическое действие частицы; 3) повышение локальной концентрации красителя при адсорбции конъюгата на поверхности клетки-мишени.

В пользу первого варианта говорят исследования группы Д.А. Рассела (D.A. Russell), в которых удалось добиться повышения квантового выхода синглетного кислорода или монооксида азота при ФДТ. В его работах продемонстрировано удвоение квантового выхода синглетного кислорода с помощью ФС фталоцианина при конъюгации его с золотыми наночастицами.

Эффективность использования совместных фотодинамических и фототоксических свойств конъюгатов продемонстрирована на примере конъюгатов золотых наностержней с метиленовым синим и индоцианиновым зеленым.

Наконец, в пользу концентрационных эффектов говорят работы по увеличению активности антибиотиков в смеси с наночастицами золота.

Конъюгаты ФС с наночастицами можно отнести уже к ФС *третьего поколения*. К этому поколению также относят биологические конъюгаты антител, лизосом и пр.

Последние разработки связаны с созданием новых ФС, обладающих высокой избирательностью их накопления в опухолях. Это обеспечивается несколькими способами:

- 1) применяются полярные ФС, находящиеся в малоактивной агрегированной форме при нейтральных pH, но диссоциирующие на высокоактивные мономерные формы в закисленной среде опухолевых тканей;

- 2) для липофильных ФС используют их способность связываться с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП). Дело в том, что на поверхности опухолевых клеток содержится больше рецепторов ЛПНП. Благодаря этому опухолевые клетки накапливают больше липофильных ФС, связанных с ЛПНП, чем нормальные клетки;
- 3) ФС ковалентно связывают с многомодульными химическими транспортными системами, полученными методами генной инженерии. В этих системах один модуль – лиганд – обеспечивает «узнавание» и специфическое связывание переносчика с интернализируемыми (обеспечивающими эндоцитоз узнаваемого объекта) рецепторами, сверхэкспрессированными на поверхности опухолевых клеток. После поглощения переносчика вместе с красителем и образования эндосомы обеспечивается освобождение системы в цитоплазме при помощи разрушающего эндосому компонента. Модуль ядерной локализации доставляет переносчик в ядро. В результате краситель оказывается не только избирательно связанным с опухолевыми клетками, но и доставлен в наиболее фотохимически лабильную структуру клеток – ядро, где под действием света образуются активные формы кислорода, приводящие к гибели опухолевой клетки.

Несмотря на распространенность, разделение ФС на поколения является достаточно условным, а утверждение, что препараты более нового поколения лучше предыдущих, не всегда оправдано.

Оптимальный ФС должен обладать следующими свойствами:

1. Химическая чистота. Установленная химическая формула.
2. Отсутствие темновой токсичности, стимуляции клеточного деления и мутагенности.
3. Максимальная абсорбция в дальней красной области.
4. Высокий квантовый выход триплетных возбужденных состояний.
5. Высокий квантовый выход фотогенерации синглетного кислорода.
6. Отсутствие непредсказуемых фотопродуктов.
7. Стабильность в организме и при облучении.
8. Гидрофильность, а для гидрофобных ФС – наличие клинически безопасных носителей.
9. Быстрое и селективное накопление в опухолях.
10. Отсутствие накопления в коже, глазах, слизистых оболочках и быстрое выведение из организма (за 1 – 2 сут.).
11. Отсутствие побочных явлений.
12. Низкая цена.

Особенно важны такие свойства ФС, как нетоксичность, высокое поглощение красного света, большой квантовый выход синглетного кислорода, селективное накопление опухолями и быстрое выведение из организма после операции. Многие из сформулированных требований противоречат друг другу, поэтому идеальный ФС, удовлетворяющий всем требованиям, пока не

создан. При создании новых препаратов исследователям приходится идти на компромисс.

Несмотря на наличие достаточно хороших ФС, исследователи продолжают поиски новых, более эффективных.

6.2.2. Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов

Для оптимизации ФД воздействия на ткани и направленного поиска наиболее эффективных ФС необходимо понять механизм их действия на клеточном уровне, выяснить, как структура ФС определяет их физико-химические свойства, а те, в свою очередь, влияют на ФД эффективность. Кроме чисто фотофизических и фотохимических характеристик, таких как коэффициент поглощения красного света или ближнего ИК излучения, квантовый выход триплетных состояний красителя и квантовый выход фотогенерации $^1\text{O}_2$, большое значение имеют свойства ФС, определяющие их взаимодействие с клеткой и механизм клеточной смерти. За свое короткое время жизни $^1\text{O}_2$ диффундирует в клетке не более чем на 10-20 нм. Поэтому он должен оказывать преимущественно локальное воздействие вблизи молекул ФС. Таким образом, локализация сенсibilизатора играет решающую роль в механизме фотоповреждения клетки. Она определяет мишени, которые в первую очередь подвергаются ФД воздействию.

Красители могут проникать в клетку, как путем диффузии, так и в результате эндоцитоза, когда некоторый объем внеклеточной жидкости захва-

тывается внутри эндоцитозных пузырьков, транспортируемых в клетку (схематичное изображение клетки представлено на рис. 6.10).

Диффузионное проникновение ФС в клетку и его внутриклеточная локализация сильно зависят от размеров молекул, полярности (гидрофобность или гидрофильность), суммарного заряда и распределения заряженных групп (симметрич-

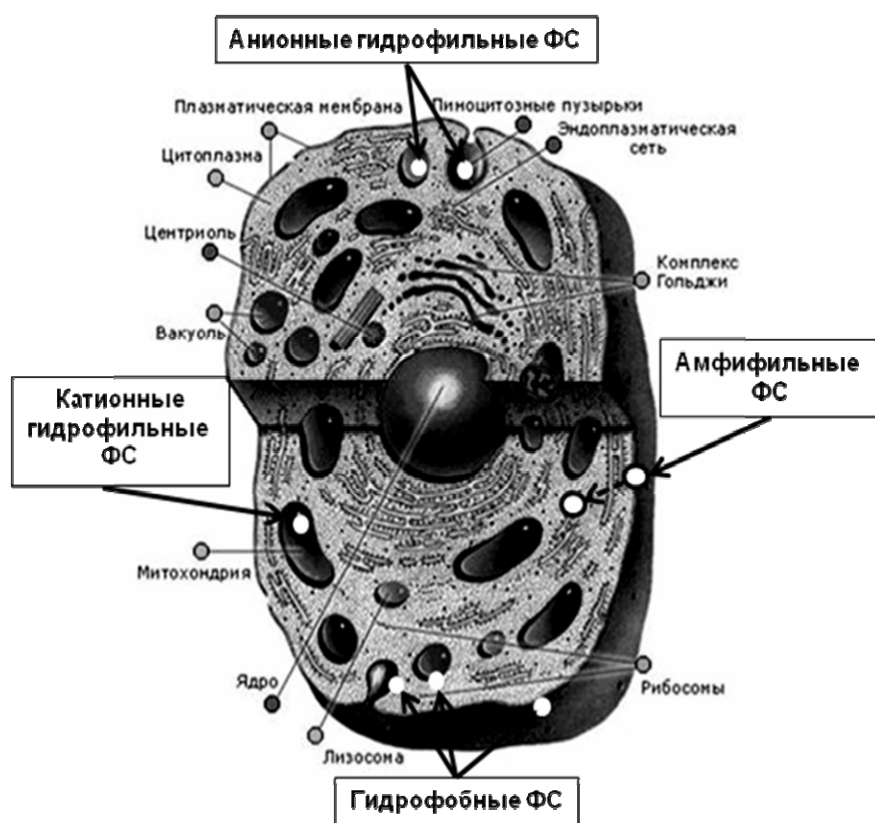


Рис. 6.10. Схематичное изображение животной клетки (по <http://www.megabook.ru/>).

ное или асимметричное), способности к образованию водородных связей, подверженности агрегации и т.д. Кроме того, локализация ФС в клетке зависит от времени инкубации, состава внеклеточной среды, например, от присутствия в ней сыворотки крови или белков.

Гидрофобные ФС, такие как гиперидин или mTHPC («Foscan») локализуются преимущественно в перинуклеарной области, богатой митохондриями, цистернами эндоплазматического ретикулаума, комплексами Гольджи, лизосомами и многочисленными везикулами. Их также обнаруживают в плазматической мембране. Они легко проникают в липидную фазу мембран, но выход из нее в водную среду затруднен. Такие вещества могут далее переноситься из плазматической мембраны к внутриклеточным органеллам с помощью амфифильных³⁷ белков цитозоля, например шаперонов³⁸. Они могут захватывать ФС экспонированными гидрофобными участками, и после диффузии к внутриклеточным органеллам перегружать ФС в липидные мембраны, обладающие большим сродством к гидрофобным веществам. Затем цикл может повторяться. Другой механизм внутриклеточного транспорта – перенос в составе мембран пиноцитозных пузырьков. В этом случае облучение не может заставить ФС покинуть мембраны.

Проникновению в клетку полярных ФС препятствует липидный бислой клеточной мембраны. Они с трудом попадают в мембрану, но легко из нее выходят. Для анионных красителей дополнительным барьером служит отрицательный заряд клеточной поверхности. Поэтому гидрофильные анионные ФС, такие как N-аспартил-хлорин e_6 (NPe₆), сульфированные тетрафенилпорфирины (TPPS_{3,4}), AlPcS_{3,4} («Photosens») и некоторые производные порфирина попадают в цитоплазму, главным образом, путем эндоцитоза.

Амфифильные вещества с асимметричным распределением полярных и неполярных групп в молекуле лучше проникают в клетки и более эффективно фотосенсибилизируют их. Они одновременно и водо-, и жирорастворимы. Встретив биомембрану, они встраиваются в нее с помощью своей липофильной части, а затем легко выходят в цитозоль, диффундируют, а потом могут встроиться в мембраны цитоплазматических органелл.

Фталоцианины алюминия с разной степенью сульфирования, т.е. присоединения отрицательно заряженной сульфогруппы – SO₃⁻, различаются гидрофильностью или гидрофобностью. Так, анионные производные AlPcS₃ и AlPcS₄ локализуются преимущественно в лизосомах. Для более гидрофобного AlPcS₂ характерно как гранулярное, так и диффузное распределение, а для AlPcS₁ – диффузное, обусловленное связыванием красителя с цитоплазматическими структурами – белками, рибонуклеопротеидами, везикулами и

³⁷ Амфифильный иначе дифильный (англ. *amphiphilic*) — обладающий одновременно гидрофильными и гидрофобными свойствами.

³⁸ Шапероны (англ. *chaperones*) - специфические белки, обеспечивающие правильное сворачивание (фолдинг) полипептидных цепей белков в клетках эукариот. Шапероны необходимы для эффективного формирования третичной структуры полипептидных цепей других белков.

т.д. подобные закономерности были обнаружены для производных гемато- и протопорфиринов и сульфированных мезо-тетрафенилпорфинов.

Катионные красители, например, бензофенотиазин или некоторые производные порфирина селективно локализуются в митохондриях, матрикс которых имеет высокий отрицательный потенциал порядка 200 мВ относительно цитозоля. При этом более эффективны амфифильные катионные ФС, такие как родамин 123 или производное метиленового синего MBD. За счет липофильной части молекулы они пересекают плазматическую мембрану и проникают в цитоплазму, а затем благодаря своему положительному заряду втягиваются в митохондрии. Так у фибробластов мембранный потенциал порядка – 75 мВ относительно окружающей среды, а разность потенциалов между митохондриальным матриксом и цитозолем – 180 мВ. Расчет с использованием уравнения Нернста³⁹ показал, что концентрация хорошо пересекающего мембраны катионного красителя в цитозоле в 18 раз выше, чем в среде, а в митохондриях – в 1000 раз выше, чем в цитозоле. Поскольку объем митохондрий составляет около 15% от объема клетки, то подавляющее большинство красителя концентрируется в митохондриях. Это значительно увеличивает фототоксичность.

Порфириновые ФС, такие как HpD и «Photofrin», локализуются преимущественно в митохондриях, хотя также попадают в другие органеллы и плазматическую мембрану. Это обусловлено их специфическим связыванием с периферическими бензодиазепиновыми рецепторами в участках слияния наружной и внутренней митохондриальной мембран. Особый случай – протопорфирин IX, эндогенно образующийся в клетках из δ -аминолевулиновой кислоты. Он синтезируется в митохондриях и первоначально фотосенсибилизирует только эти органеллы, но через 1 – 2 часа выходит из митохондрий и диффузно распределяется в цитоплазме, а затем начинает выходить из клеток и появляется в инкубационной среде.

Локализация ФС в клетке также зависит от их концентрации и времени инкубации. Например, при 10-минутной инкубации TPPS_{2a} накапливается в плазматической мембране, а при более длительной (> 1 ч) – в лизосомах. «Photofrin» после 3-часовой инкубации накапливается преимущественно в плазматической мембране клеток эпидермоидной карциномы человека, а после 24-часовой – главным образом в аппарате Гольджи.

Облучение клеток повреждает мембраны клеточных органелл, что может привести к перераспределению ФС из мест первоначального связывания в другие компартменты. Например, производные тетрафенилпорфина гидрофобный TPPS_{2o} и амфифильный TPPS_{2a} после облучения диффузно распределяются в цитоплазме, а анионный TPPS₄ попадает в ядро. Также наблюдается

³⁹ В общем виде уравнение Нернста-Планка описывает диффузию ионов в растворе или гомогенной незаряженной мембране. В условиях электрохимического равновесия уравнение Нернста показывает, что разность потенциалов на мембране определяется соотношением концентраций данного иона в двух соприкасающихся растворах. При температуре 20°C уравнение Нернста для одновалентных ионов имеет вид: $\Delta\varphi = 58 \lg (c_1/c_2)$.

фотоиндуцированное перераспределение анионных производных фталоцианина цинка из лизосом в цитоплазму и затем в клеточное ядро. Это может иметь большое значение в фотоповреждении клеток, т.к. клеточные ядра очень чувствительны к фотоповреждению, которое может происходить даже, когда флуоресценция сенсibilизатора в ядре практически отсутствует.

Порфирины, хлорины, фталоцианины, нафталоцианины и т.п. предоставляют широкие возможности для создания разнообразных ФС с заданными свойствами. Можно значительно и гибко менять их структуру, включая строение и размер макроциклов, боковых заместителей, а также центральные атомы металла. Так, расширение ароматических циклов усиливает делокализацию электронных облаков и сдвигает спектры поглощения света в дальнюю красную и инфракрасную области. Меняя структуры боковых групп, можно в широких пределах менять гидрофобность и гидрофильность молекул, придавать им амфифильность, влиять на их способность к агрегации и добиваться желательной внутриклеточной локализации. Принято считать, что только мономерные порфирины, а не их агрегаты биологически активны. Но в мембранах порфириновые агрегаты, не связанные ковалентными связями, могут расщепляться на более активные мономеры. Наличие электрически заряженных групп или больших аксиальных лигандов⁴⁰ предотвращает агрегацию ФС, которая сильно снижает фотодинамический эффект.

Прижизненные красители-ФС, селективно локализующиеся в определенных внутриклеточных структурах, необходимы не только для ФДТ, но и для исследовательской практики цитологов. С их помощью можно избирательно воздействовать на определенные клеточные структуры с тем, чтобы изучить их роль в тех или иных клеточных функциях. Таких высокоселективных сенсibilизаторов известно немного. К ним можно отнести гидрофильные ФС, локализующиеся в лизосомах, такие как лизилхлорин p_6 ; TPPS_{2a}, который сенсibilизирует цитоплазматическую мембрану при кратковременной инкубации; катионные амфифильные ФС, такие как родамин 123, производное метиленового синего MBR или Mito Tracker Red, селективно сенсibilизирующие митохондрии.

Высокоселективную фотосенсibilизацию можно осуществить, когда, связываясь с изучаемой структурой, краситель приобретает новые свойства. Так, янус зеленый в окисленной форме избирательно окрашивает митохондрии за счет окисления его цитохромной системой, а в цитоплазме он восстанавливается до бесцветной лейкоформы. Это позволяет селективно воздействовать сфокусированным лазерным лучом на отдельные митохондрии в окрашенной живой клетке.

⁴⁰ Лиганды (от лат. *ligo* — привязываю), в комплексных соединениях молекулы или ионы, непосредственно связанные с центральным атомом. Большая группа лигандов – биологически важные соединения (аминокислоты, пептиды, белки, пурины, порфирины, коррины, макролиды) и их синтетические аналоги (краун-эфир, крипанды), а также полимеры с донорными атомами и хелатообразующими группировками.

6.2.3. Направленная доставка фотосенсибилизаторов

Процесс доставки ФС к опухолевым клеткам и их эффективного фотоповреждения делится на два этапа:

- а) доставка ФС, внутривенно введенного в кровеносное русло, к опухоли;
- б) транспорт ФС внутрь клетки к наиболее чувствительным клеточным структурам.

Для эффективного переноса ФС разработаны различные носители. При внутривенном введении ФС связываются с белками крови, и только небольшая их часть оказывается в свободном состоянии. Молекулы красителей связываются с белками за счет электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных и водородных взаимодействий. По данным одних авторов, гидрофобные ФС: производные гематопорфирина (HrD), фталоцианин цинка (ZnPc), этиопурпурин олова (SnEt₂) транспортируются преимущественно липопротеинами высокой плотности (ЛПВП). Некоторые хлорины и тетрафенилпорфины (N-аспартилхлорин e₆ - NPe₆, мезо-тетра-гидроксибензил-хлорин – mTHPC, тетрафенилпорфин TPPS₃ или TPPS₄) переносятся в основном альбумином, а хлорин (Chle₆) и сульфированный фталоцианин алюминия (AlPcS₂) примерно в равной степени связываются с альбумином и ЛПВП. Другие авторы отмечают, что большая роль в переносе таких гидрофобных ФС, как гематопорфирин, производное бензопорфирина - BPD-MA, AlPc или ZnPc, отводится липопротеинам низкой плотности (ЛПНП). Одна молекула ЛПНП может переносить до 1000 молекул гидрофобного ФС. Они не фагоцитируются клетками крови и длительно циркулируют в кровеносном русле.

В настоящее время ведутся работы по направленной доставке ФС в клетки. В качестве их носителей используются липосомы, полимерные наночастицы, квантовые точки и антитела.

Липосомы – искусственные бислойные или многослойные мембранные пузырьки, изготовленные обычно из фосфолипидных молекул (рис. 6.11). Если в их состав входят белки, то они называются протеолипосомами, представляющими собой хорошую модель биологических мембран. Гидрофильные ФС входят внутрь липосом, а гидрофобные включаются в липосомную мембрану. Липосомы облегчают транспортировку гидрофобных ФС по кровеносным сосудам. Это улучшает фармакокинетику и повышает их фототоксичность.

Липосомы могут связываться с липопротеинами плазмы крови, в частности с ЛПНП, и это повышает селективность доставки ФС в опухоль, т. к. трансформированные клетки имеют больше рецепторов ЛПНП, чем нормальные. Для направленной доставки к опухолевым клеткам в липосомную мембрану также можно включить антитела, факторы роста⁴¹ и другие моле-

⁴¹ *Факторами роста* называют группу белковых молекул, индуцирующих синтез ДНК в клетке. Кроме того они способны стимулировать рост, пролиферацию и/или дифференци-

кулы, которые могут распознаваться клетками-мишенями. После связывания с рецепторами или антигенами на поверхности мишени гидрофобный ФС переходит из липосомной мембраны в плазматическую мембрану клетки-мишени, а также транспортируется внутрь клетки в составе эндосомных пузырьков.

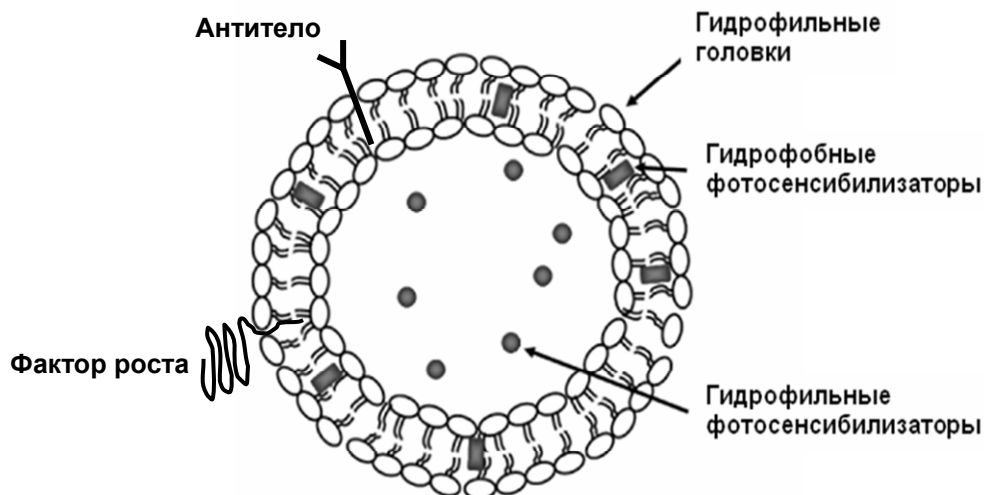


Рис. 6.11. Схема переноса гидрофильных и гидрофобных фотосенсибилизаторов с помощью липосом.

Другой способ доставки – присоединение ФС к полимерным микро- и наносферам или нанокapsулам. *Микро- и наносферы* являются цельными матрицами, на полимерной поверхности которых распределяется активное вещество. В *нанокapsулах* полимерная оболочка образует полость, заполненную жидкостью. Полимерные микро- и наночастицы можно получить из естественных либо синтетических полимеров, каковыми являются полисахариды, полимолочная и полигликолевая кислоты, полилактиды, полиакрилаты, акрилполимеры, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и его аналоги, и др. Полимерные материалы характеризуются набором ценных свойств для лекарственного транспорта, как биосовместимость, способность к биodeградации, функциональная совместимость.

Хлорин e_6 , ковалентно присоединенный к шарикам из полистирола диаметром в 1 мкм, фагоцитируется клетками карциномы. При этом его фототоксичность становится выше, чем у свободного хлорина e_6 , у которого, однако, на порядок больший квантовый выход фотогенерации активных форм кислорода. Включение ФС в полимерные биodeградирующие наночастицы может увеличивать количество переносимого вещества (рис. 6.12). При этом, варьируя материалы, можно добиться желаемых свойств носителя. Так, покрытие полиэтиленгликолем наночастиц из полилактата для предотвращения связывания ретикулоэндотелиальной системой позволило повысить их дос-

ровку живых клеток. Как правило, это пептидные или стероидные гормоны. Факторы роста функционируют как сигнальные молекулы для взаимодействия между клетками.

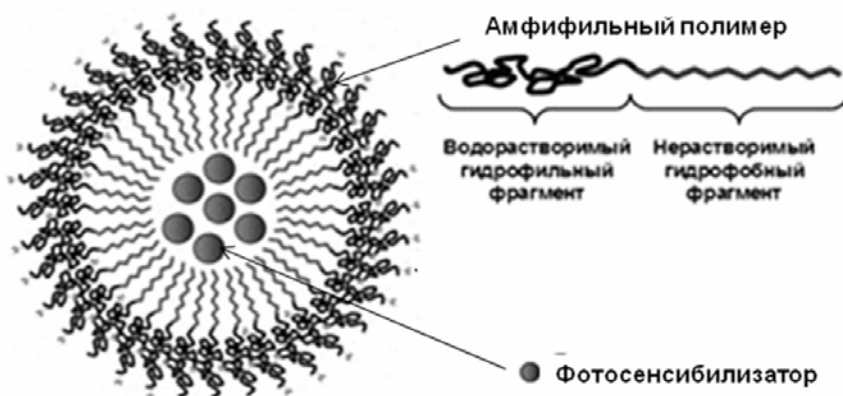


Рис. 6.12. Схема переноса гидрофобного фотосенсибилизатора с помощью полимерных наночастиц (по www.amphio.ru).

связывания их с моноклональными антителами, специфичными к антигенам на поверхности раковых клеток. *Моноклональные антитела* - антитела, вырабатываемые иммунными клетками, принадлежащими к одному клеточному клону, то есть произошедшими из одной плазматической клетки-предшественницы. В случае их использования в качестве лекарства, их название оканчивается на *-mab* (от английского «*monoclonal antibody*»). В этих веществах ФС комбинируют с антителом, обеспечивая возможность адресовать его непосредственно злокачественной ткани. Таким образом, могут осуществлять несколько подходов: либо ФС напрямую присоединяется к антителу, либо формируется конъюгат на основе так называемой модульной транспортной системы, содержащей умножитель с присоединенными молекулами ФС, который в свою очередь конъюгирован к антителу (рис. 6.13).

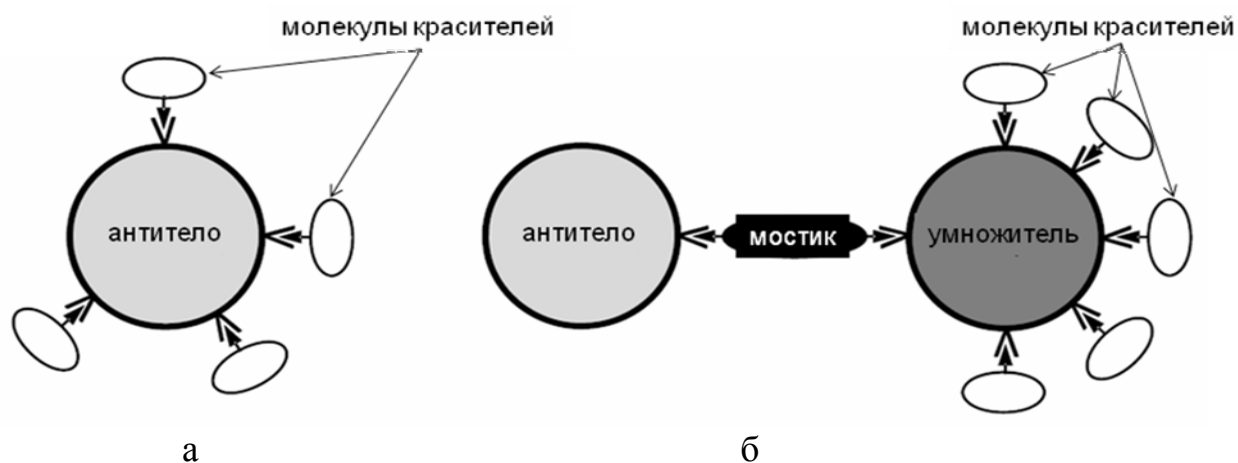


Рис. 6.13. Подходы связывания фотосенсибилизатора с моноклональным антителом: (а) прямая конъюгация красителя с антителом и (б) построение модульной транспортной системы (по Jasinski S., 2009).

Оба подхода имеют преимущества и недостатки. С одной стороны, первый подход проще реализуется с точки зрения синтеза, однако, существует риск существенно повлиять на свойства антител, поскольку для удовлетворительного терапевтического результата требуется присоединение более одного

тавку в опухоли. Включение гиперрицина в наночастицы из поливинилпирролидона повысило его фототоксичность в отношении нервных клеток.

Также изучается возможность направленной доставки ФС путем

сенсibilизатора. Такое прямое конъюгирование может понизить активность участка, который является мишенью, или даже привести к разворачиванию или другим изменениям конформации белка, вызывающим полную потерю активности.

С другой стороны, создание модульной транспортной системы часто является весьма трудоемким за счет ее значительно более сложной структуры. Тем не менее, в этом случае полностью сохраняются функции антитела и возможность модулировать фотоактивность, за счет варьирования количества и видов присоединяемых красителей. Оба подхода в настоящее время активно исследуются.

Например, пиррофеофорбид *a* и его конъюгаты могут использоваться для создания модульной транспортной системы. Система включает умножитель дендро-[60]фуллерен, несущий красители (пиррофеофорбид *a*) в качестве сенсibilизаторов, конъюгированный к моноклональному антителу («Rituximab»⁴²), которое является мишенью ФДТ (рис. 6.14).

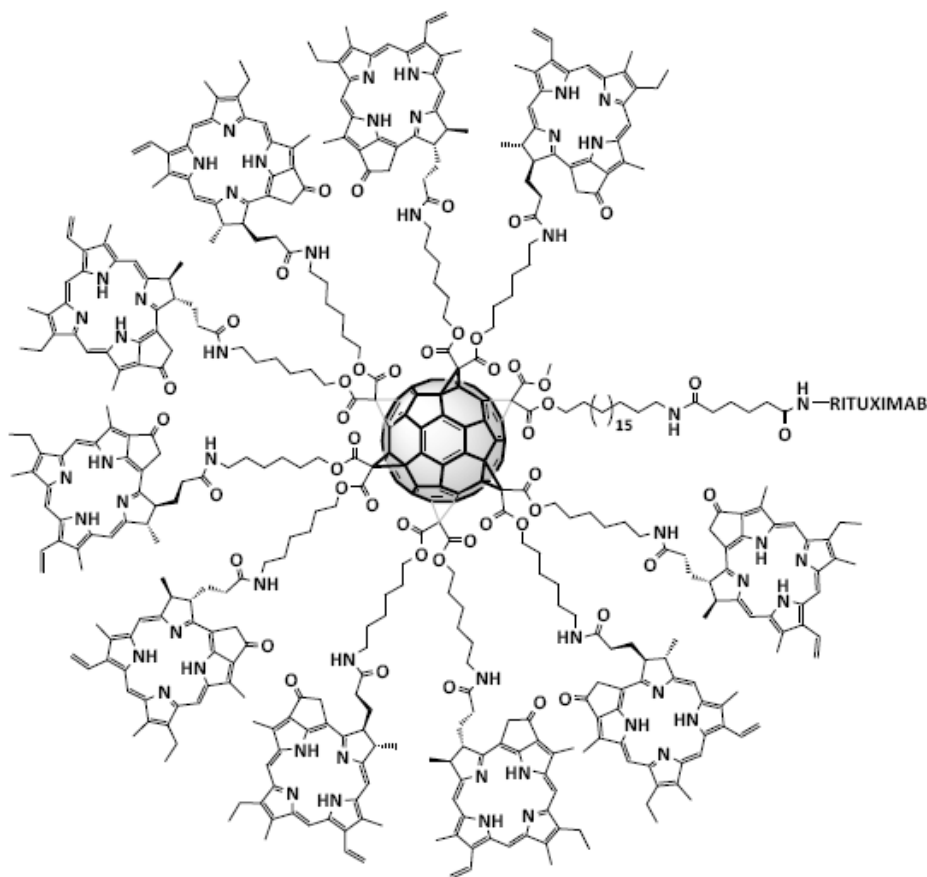


Рис. 6.14. Структура модульной транспортной системы на основе дендро-[60]фуллерена, несущего молекулы пиррофеофорбида *a* в качестве сенсibilизаторов, конъюгированного к моноклональному антителу «Rituximab» (Rancan F. et al, 2007).

⁴² Генно-инженерные технологии позволяют создавать гибридные антитела мышь/человек. Наиболее ранней версией таких гибридных антител являются химерные антитела. В химерных антителах константные регионы имеют человеческое происхождение, а переменные получены от мыши. Типичный пример химерного антитела — «Rituximab».

Альтернативой этому подходу является использование молекул, способных отыскивать опухоль, благодаря наличию специфических рецепторов. К ним относятся белок трансферрин, некоторые гормоны, например, стероиды или инсулин, эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor – EGF), фолиевая кислота.

Все делящиеся клетки нуждаются в большом количестве железа, которое переносится железотранспортирующим белком трансферрином. В некоторых раковых клетках особенно много специфических рецепторов трансферрина. Так, ковалентное связывание хлорина e_6 с трансферрином, сохраняющее такой же квантовый выход $^1\text{O}_2$, как у свободного хлорина e_6 , усилило накопление клетками хлорина e_6 и повысило его фототоксичность в 10-40 раз.

Рецепторы стероидных гормонов находятся в цитоплазме. После связывания гормона они перемещаются в ядро и начинают регулировать экспрессию⁴³ определенных генов. Исключением являются эстрогены, чьи рецепторы постоянно локализируются внутри ядра. Поэтому, связывая стероидные гормоны, особенно эстрогены, с ФС, можно непосредственно воздействовать на клеточное ядро. Недавно были синтезированы несколько конъюгатов диметилового эфира хлорина e_6 с C17- α -алкинилэстрадиолом, которые специфически связывались с рецепторами эстрадиола (гормона, относящегося к группе эстрогенов и являющегося наиболее активным из них) и позволяли эффективно убивать клетки рака груди человека MCF-7, обладающие рецепторами эстрадиола. Аналогично, конъюгаты эстрадиола и феофорбида a позволяли доставить ФС в ядро, вызвать повреждения ДНК и гибель клеток рака груди человека и сосудистого эндотелия более эффективно, чем свободный феофорбид a .

Многие клетки, включая раковые, обладают также рецепторами фолиевой кислоты, которая необходима для их деления. Связывание фолата (производного фолиевой кислоты) с рецептором инициирует эндоцитоз и может усилить захват конъюгированного с фолатом ФС. Было показано, что конъюгаты тетрафенилпорфирина с фолатом транспортировались в раковые клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Они отличались большей фототоксичностью, чем свободный ФС. Липосомы, заполненные водорастворимым ФС AlPcS_4 , с поверхностью которых было связано одно из производных фолата, эффективно доставляли AlPcS_4 к клеткам и также отличались повышенной фототоксичностью.

Факторы роста, такие как инсулиноподобный фактор роста 1 или EGF, также могут инициировать эндоцитоз после связывания с поверхностными

⁴³ *Экспрессия гена* - программируемый геномом процесс биосинтеза белков и/или РНК. При синтезе белков экспрессия гена включает транскрипцию – синтез РНК с участием фермента РНК-полимеразы; трансляцию - синтез белка на матричной рибонуклеиновой кислоте, осуществляемый в рибосомах, и (часто) посттрансляционную модификацию белков.

рецепторами. Повышенная экспрессия их рецепторов характерна для ряда раковых клеток. Конъюгат EGF с алюмофталоцианином $AlPcS_2$ отличался 8-кратной фототоксичностью по сравнению со свободным сенсибилизатором, а с кобальтовым фталоцианином $CoPcS_2$ – 100-кратной.

В последние годы стали конструироваться более сложные системы доставки ФС в клетки. Так в комплексе $Sn(IV)Chl e_6$ – ЧСА – EGF, сывороточный альбумин человека ЧСА служит носителем ФС, а эпидермальный фактор роста EGF стимулирует его поглощение клеткой. Созданы еще более сложные и биологически обоснованные модульные конструкции. Для доставки ФС в ядро соединяется белок-носитель (им служит бычий сывороточный альбумин, бактериальная β -галактозидаза или химерный полипептид P10), ФС (хлорин e_6), лиганд, стимулирующий эндоцитоз и проникновение ФС в лизосомы (инсулин или EGF) и специальный пептид – сигнал ядерной локализации (СЯЛ), который распознается и связывается с белками, транспортирующими этот комплекс в ядро. Такие комплексы обеспечивают доставку ФС в ядро и повышение фотодинамической эффективности более, чем в 2000 раз по сравнению с исходным хлорином e_6 . Однако они сначала попадают в эндосомы и ранние лизосомы, из которых может выйти только небольшая часть захваченных белков. Чтобы увеличить выход комплекса из лизосом, в него включен ослабленный штамм аденовируса Ad5 без канцерогенного участка. Аденовирусы обладают способностью повреждать лизосомную мембрану и выходить в цитозоль. Аналогичными свойствами обладает также дифтерийный токсин DTox или кислый синтетический пептид GALA. Добавление в конструкцию данных компонентов еще больше повышает фотодинамическую эффективность.

6.3. Клеточные механизмы фотодинамической терапии

6.3.1. Фотодинамическое воздействие на клеточные структуры

Плазматическая мембрана – первый барьер на пути ФС в клетку. Перед тем, как попасть в клетку, ФС сорбируются на плазматической мембране и, надолго или нет, задерживаются в ней. Гидрофильные ФС сильнее сенсибилизируют клеточную поверхность, в частности, связанные с мембраной белки и гликопротеины, а липофильные – липидный бислой и гидрофобные участки интегральных или погруженных в мембрану белков.

Биомембраны особенно чувствительны к фотодинамическому воздействию. ФД повреждение плазматической мембраны происходит быстро, в первые минуты воздействия. Синглетный кислород и другие АФК инициируют в них цепные процессы перекисного окисления липидов. Особенно легко окисляются ненасыщенные жирные кислоты и холестерин. 1O_2 может присоединяться по месту двойных связей в липидах (L) с образованием гидропероксидов LOOH. Кроме того, в результате перекисного окисления липидов клетке

образуются радикальные продукты типа $L\cdot$, $LOO\cdot$, $OLOO\cdot$ и $OLO\cdot$. Долгоживущие гидропероксиды в отличие от короткоживущих радикалов могут транспортироваться в мембранах на большие расстояния, а их перенос между органеллами распространяет окислительный стресс по всей клетке.

Перекисное окисление повышает жесткость липидного бислоя, вызывает образование межмолекулярных липид-липидных и липид-белковых сшивок, что приводит к образованию локальных дефектов и пор в липидных бислоях.

Другой критической мишенью в мембранах, еще более важной для нарушения клеточных функций, являются мембранные белки. На их фотоповреждение тратится до 70% синглетного кислорода, генерируемого в клетке, тогда как на окисление аскорбата⁴⁴ – 17%, а липидов – менее 1%.

Крупные мембранные белки, такие как ионные каналы или транспортные АТФ-азы, весьма чувствительны к ФД воздействию. Ионные каналы теряют селективность, а транспортные АТФ-азы инактивируются. Снижение максимальной проводимости мембраны для ионов Na^+ и K^+ свидетельствует о повреждении натриевых и калиевых ионных каналов. Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} - и Ca^{2+} -АТФ-азы ингибируются. В результате неспецифической утечки ионов и ингибирования их транспорта происходит падение ионных градиентов и деполяризация клеток. Кроме того, ФД воздействие повреждает мембранные рецепторы и нарушает процессы сигнальной трансдукции⁴⁵, адгезии клеток⁴⁶ и другие мембранные функции.

Продолжительная фотосенсибилизация вызывает повышение проницаемости плазматической мембраны, за чем следует набухание клетки, некроз и лизис.

ФД воздействие гидрофильных ФС $AlPcS_4$, $TPPS_{2a}$, $TPPS_4$, $LuTex$ или NPe_6 быстро разрушает мембраны лизосом. Накопленные в лизосомах ФС выходят в цитозоль и перераспределяются в клетке. При этом они неспецифически окрашивают цитоплазму и могут проникать в различные органеллы и даже клеточное ядро.

Такие процессы лежат в основе метода фотохимической интернализации, т.е. введения в клетку гидрофильных веществ: белков, токсинов, лекарственных препаратов, нуклеиновых кислот, которые сами не могут проникнуть в нее. Эти вещества вводятся вместе с лизосомотропным ФС. После эндоцитоза переносимое вещество вместе с ФС попадает в эндосомные пу-

⁴⁴ Аскорбат – соль аскорбиновой кислоты, обладает значительными антиоксидантными свойствами.

⁴⁵ Сигнальная трансдукция (от англ. *signal transduction*) - передача сигнала. В молекулярной биологии термин относится к любому процессу, при помощи которого клетка превращает один тип сигнала или стимула в другой.

⁴⁶ Адгезия (от лат. *adhaesio* - прилипание). Клеточная адгезия — не просто соединение клеток между собой, а такое их соединение, которое приводит к формированию определенных правильных типов гистологических структур, специфичных для данных типов клеток. Специфичность клеточной адгезии определяется наличием на поверхности клеток белков клеточной адгезии - интегринов, кадгеринов и др.

зырьки и эндосомы. Последующее освещение вызывает разрушение их мембран и выход данного вещества в цитозоль.

Гидрофобные ФС, локализующиеся в мембранах клеточных органелл, например, гиперин, mTHPc («Foscan»), фталоцианин Pс₄, фталоцианин цинка, а также «Photofrin» обычно накапливаются в перинуклеарной области, богатой мембранными органеллами, - митохондриями, эндоплазматическим ретикулумом (ЭР) и аппаратом Гольджи (АГ), а также транспортными пузырьками. Соответственно эти органеллы являются потенциальными мишенями для ФД воздействия.

ФС, локализующиеся в митохондриях, считаются наиболее эффективными. Митохондрии очень чувствительны к ФД воздействию. К тому же они являются одной из главных мишеней цитотоксического действия порфиринов. Порфирины липофильны и обладают большим сродством к митохондриальным мембранам. Но кроме простой диффузии имеется специфический механизм транспорта порфиринов в митохондрии, где из протопорфирина IX синтезируется гемм – кофермент митохондриальных цитохромов и других гемсодержащих белков. Порфирины связываются с периферическими бензодиазепиновыми рецепторами (PBR – peripheral benzodiazepine receptor), расположенными в зоне контакта наружной и внутренней митохондриальных мембран, и переносятся в матрикс, где они взаимодействуют с кардиолипинами внутренних митохондриальных мембран.

ФД воздействие резко усиливает генерацию АФК в митохондриях. Первичная генерация синглетного кислорода и других АФК при фотовозбуждении порфиринов усиливается вторичной генерацией «митохондриальных» АФК. При этом происходит как перекисное окисление липидов, так и инактивация важнейших митохондриальных ферментов. В результате этих процессов ингибируется клеточное дыхание, разобщается окислительное фосфорилирование⁴⁷, падает митохондриальный потенциал и снижается синтез АТФ.

На ультраструктурном уровне фотоиндуцированные изменения митохондрий отмечаются, как правило, раньше, чем изменения структуры плазматической мембраны, ядра или других органелл. Митохондрии набухают, в них происходит просветление матрикса и разрушение крист.

Микротрубочки наряду с другими элементами цитоскелета – актиновыми нитями и промежуточными филаментами – придают определенную форму клеткам, а также участвуют в организации цитоплазмы, подвижности внутриклеточных органелл и сегрегации хромосом в митозе⁴⁸. По микротру-

⁴⁷ *Окислительное фосфорилирование* - осуществляющийся в живых клетках синтез молекул аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) из аденозиндифосфорной (АДФ) и фосфорной кислот за счёт энергии окисления молекул органических веществ (субстратов). В результате в клетках накапливается АТФ - важнейшее макроэргическое соединение, расходуемое затем на обеспечение энергией различных процессов жизнедеятельности.

⁴⁸ *Митоз* (от греч. *mítos* - нить), кариокинез, не прямое деление клетки, наиболее распространённый способ воспроизведения (репродукции) клеток, обеспечивающий тождественное распределение генетического материала между дочерними клетками и преемст-

бочкам транспортируются клеточные компоненты. Их динамичная структура является результатом одновременной сборки и разборки. ФД действие некоторых ФС («Photofrin II», TPPSn, AlPcS₄, BPD-MA и других) может разрушать микротрубочки в интерфазных⁴⁹ или делящихся клетках. Фотосенсибилизация также повреждает мономерный тубулин⁵⁰ и ингибирует сборку микротрубочек. Поэтом предполагается, что наряду с плазматической мембраной и внутриклеточными органеллами тубулин и микротрубочки являются одной из мишеней для ФД воздействия. Воздействие на них в делящихся клетках предотвращает формирование митотического веретена и приводит к нарушению митоза. Не вступившее в деление клетки затем умирают. Другие важные следствия разрушения микротрубочек – нарушение внутриклеточного везикулярного транспорта и формы клеток.

ФД ингибирование сборки микротрубочек зависит от гидрофильности ФС: гидрофобные сенсibilizatory не связывались с тубулином и не фотосенсибилизировали микротрубочки.

ФД воздействие эффективно повреждает ДНК в растворах. Однако ФС порфиринового ряда – производные гематопорфирина HpD и «Photofrin», алюмофталоцианины ChlAlPc, AlPcS₂, AlPcS₄ или Pc₄, mTHPc – практически не попадают в клеточное ядро, не повреждают генетический аппарат, не вызывают мутаций и не являются канцерогенами. Но при этом ФД обработка снижает митотический индекс⁵¹ и индекс деления ядер в опухолевых клетках. Показано, что ингибирование деления опухолевых клеток, индуцированное ФД воздействием ALA, сопровождается уменьшением числа и исчезновением частиц ядрышкового организатора. Ультраструктурное исследование показало, что в апоптотных клетках происходит уменьшение и исчезновение фибриллярных центров, что также отражает снижение биосинтетической активности ядрышек.

6.3.2. Реакции клеток на внешние воздействия

Повреждение и смерть клеток – сложные многостадийные процессы. Сначала клетка активно сопротивляется, стараясь сохранить свою жизнеспособность, но по исчерпанию защитного потенциала она теряет свои основные функции, и развиваются процессы, приводящие к ее смерти. Внешние воздействия сначала атакуют определенные клеточные структуры, в которых

венность хромосом в ряду клеточных поколений. Биологическое значение митоза определяется сочетанием в нём удвоения хромосом путём продольного расщепления их и равномерного распределения между дочерними клетками (сегрегации хромосом).

⁴⁹ *Интерфаза* (от лат. *inter* - между и фаза), интеркинез, стадия жизненного цикла клетки между двумя последовательными митотическими делениями.

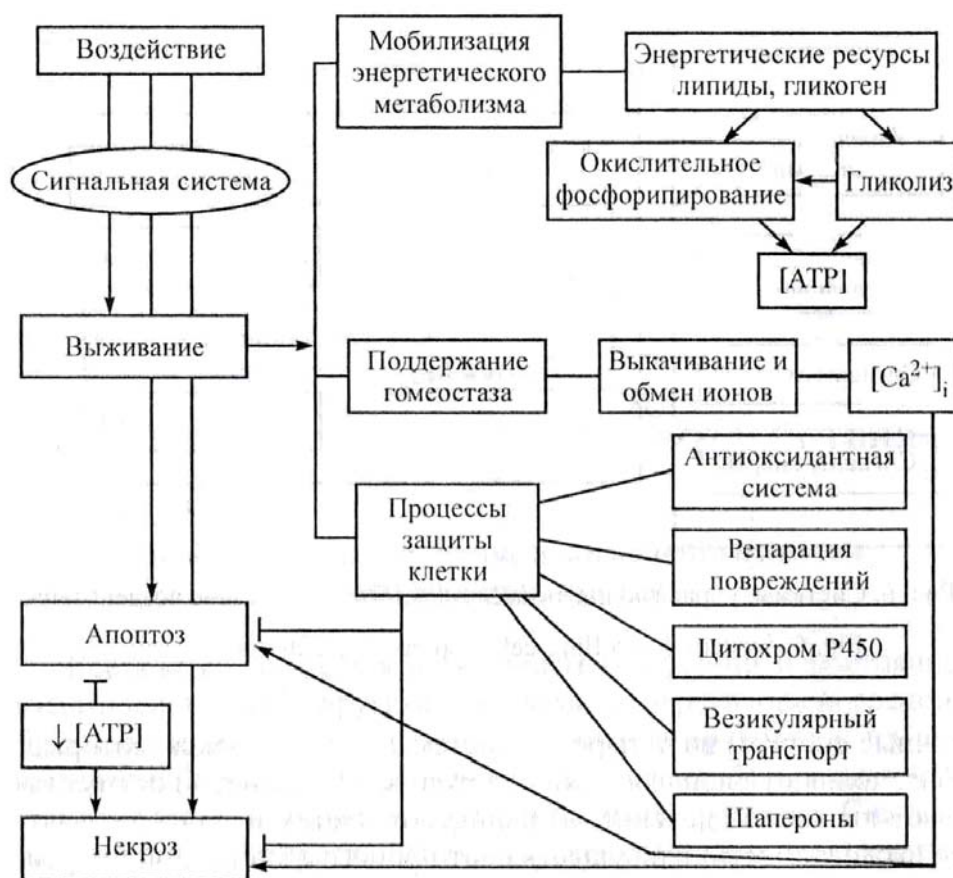
⁵⁰ *Тубулин* - это белок, из которого построены микротрубочки. В них, а также в цитоплазме клеток он находится в форме димера, состоящего из двух форм - α - и β -тубулина. Рост микротрубочек осуществляется только за счет присоединения димеров тубулина.

⁵¹ *Митотический индекс* (от англ. *mitotic index*, MI, %) - процент делящихся клеток от общего числа проанализированных клеток.

развиваются первичные повреждения. Затем зона повреждения расширяется и постепенно захватывает всю клетку. Одновременно в клетке происходят защитные процессы, сначала локальные, а затем глобальные, вовлекающие практически все клеточные компоненты. При рассмотрении реакций клеток на повреждающие воздействия основной интерес представляют комплексы выживаемости и смерти клеток.

В состав *комплекса выживаемости* можно отнести следующие подсистемы, обеспечивающие жизнедеятельность и защиту клеток (схема 6.1):

Схема 6.1. Клеточные системы, участвующие в реакции клеток на повреждение (Узденский А.Б., 2010).



- 1) общий метаболизм, в том числе его важнейшее звено – комплекс биоэнергетических процессов;
- 2) системы поддержания гомеостаза, в частности внутриклеточных концентраций важнейших ионов: H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Они включают ионные насосы, ионные каналы и обменники. Связывание ионов биополимерами и депонирование их во внутриклеточных органеллах вносит вклад в эти процессы;
- 3) защитные механизмы, включающие подсистемы:
 - а) детоксикации АФК и перекисей липидов (антиоксиданты, каталаза, пероксидазы, супероксиддисмутаза и т.п.);

- b) ферменты детоксикации чужеродных молекул, такие как цитохром P-450;
- c) системы репарации ДНК;
- d) белки теплового шока (шапероны);
- e) везикулярный транспорт, залечивающий механические повреждения плазматической мембраны;
- f) белки множественной лекарственной устойчивости MRP (multidrug resistance proteins).

Когда эти механизмы не справляются с защитой, клетки умирают. Согласно современной классификации, выделяется три основных типа клеточной смерти: апоптоз (тип I), аутофагия (тип II) и некроз (тип III).

Апоптоз - это запрограммированная смерть клетки, осуществляемая по имеющейся в клетках программе особым комплексом клеточных белков, когда клетка получает специальные сигналы, инициирующие ее смерть, или длительно подвергается сравнительно слабому повреждающему действию. Программа апоптоза находится под контролем системы внутриклеточной сигнализации, способной как усилить, так и затормозить, или заблокировать апоптоз. В отличие от других типов клеточной смерти, при апоптозе основные деструктивные процессы сначала протекают в клеточном ядре при сравнительно сохраненных клеточных органеллах. Наиболее характерные апоптотические процессы: межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина⁵², сжатие и фрагментация клеточного ядра (кариопикноз и кариорексис соответственно), «пузырение» поверхностной мембраны. После этого клетки распадаются на окруженные мембраной фрагменты – апоптозные тельца, содержащие интактные органеллы и фрагменты ядер, которые затем фагоцитируются фибробластами, лейкоцитами, эпителиоцитами и другими соседними клетками (рис. 6.15, стадии 1-4). В отличие от некроза, апоптоз не приводит к развитию воспаления и последующему формированию рубца.

Для реализации апоптоза необходимы целостность плазматической мембраны и достаточный уровень АТФ. Это решающие факторы, определяющие программу клеточной смерти. Если мембрана повреждена и/или низок уровень АТФ, то клетки погибают от некроза, если нет – возможен апоптоз. Кроме того, необходимы ионы Ca^{2+} и синтез некоторых белков.

Основным исполнительным механизмом апоптоза является комплекс гидролитических ферментов: протеаз, нуклеаз, липаз, осуществляющих разборку клеточных структур. Эта система запускается каскадами каспаз – специальных протеиназ, расщепляющих в белках пептидную связь между аспарагиновой кислотой и цистеином.

⁵² *Хроматин* (от греч. *chroma*) - вещество хромосом, находящееся в ядрах растительных и животных клеток; во время деления клетки формируется в определённые видимые структуры в хромосомах. Конденсация хроматина - наиболее характерное проявление апоптоза. Хроматин конденсируется по периферии, под мембраной ядра, при этом образуются четко очерченные плотные массы различной формы и размеров.

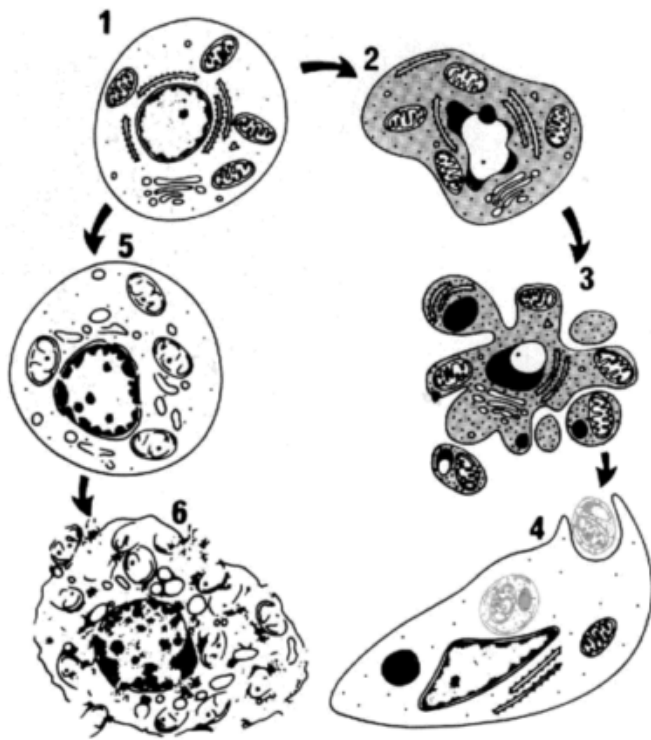


Рис. 6.15. Последовательность ультраструктурных изменений при апоптозе (справа) и некрозе (слева): 1 – нормальная клетка; 2 – начало апоптоза; 3 – фрагментация апоптотической клетки; 4 – фагоцитоз апоптотических телец окружающими клетками; 5 – гибель внутриклеточных структур при некрозе; 6 – разрушение клеточной мембраны (www.medport.info).

Активация протеолитического каспазного каскада может инициироваться как снаружи, так и изнутри клетки. Во втором случае сигналы для запуска апоптоза могут исходить из внутриклеточных органелл – митохондрий, ЭР и лизосом. Митохондрии играют центральную роль в активации ферментных каскадов, ведущих к апоптозу. При повреждении митохондрий из их межмембранного пространства могут высвободиться белки-активаторы апоптоза: цитохром *c* и др. Митохондриальный путь апоптоза обычно индуцируется при окислительном стрессе.

При повреждении лизосом из них могут выходить протеолитические белки катепсины, которые либо непосредственно активируют

каспазу, либо активируют белок, способствующий выходу цитохрома *c* из митохондрий и запуску апоптоза по митохондриальному пути.

В результате повреждения цистерн ЭР из них может высвободиться Ca^{2+} , стимулирующий кальпаин, который активирует каспазы и дальнейшие проапоптотические пути.

Аутофагический тип клеточной смерти также как и апоптоз сформировался в ходе эволюции. В общих чертах этот процесс как неотъемлемая составляющая клеточной активности был описан в 1960-х гг. К. Де Дювом (Ch. de Duve) с сотрудниками из Рокфеллеровского университета. Последовательность аутофагии представлена на рис. 6.16. Дефицит питательных веществ, кислорода или факторов роста стимулирует процесс сборки аутофагосом⁵³. Из макромолекул, находящихся в цитоплазме образуется бислоидная мембранная структура – фагофора. Фагофора увеличивается в размерах и обволакивает часть цитоплазмы с содержащимися в ней нефункциональными

⁵³ *Аутофагосомы* — органеллы, присутствующие в цитоплазме любой клетки, — удаляют из нее поврежденные органеллы, белки и другие вещества, а также патогенные микроорганизмы.

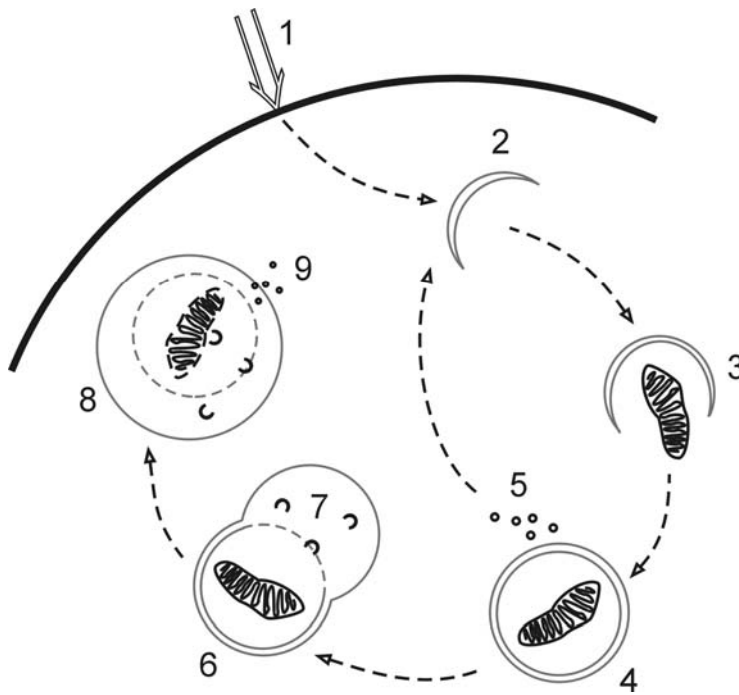


Рис. 6.17. Последовательность процесса аутофагии: 1 – индукция (процесс аутофагии ускоряется в ответ на сигналы, посылаемые белками клеточной мембраны); 2 – нуклеация (образование фагофоры); 3 – обволакивание материала, подлежащего обработке (митохондрии); 4 – образование органеллы; 5 – высвобождение белков; 6 – слияние; 7 – содержащиеся в мембране лизосомы ферменты расщепляют внутреннюю мембрану аутофагосомы; 8 – «переваривание»; 9 – повторное использование материала органелл.

или излишних органелл.

Аутофагия может приводить к гибели клеток двумя путями. Первый из них состоит в неограниченном «переваривании» содержимого цитоплазмы вплоть до гибели клетки, второй заключается в стимулировании апоптоза. Смерть клетки связывают с аномальным накоплением в цитоплазме аутофагосом. В отличие от апоптоза, при котором происходит быстрая разборка клетки, аутофагия – медленный процесс. Она управляется специальной системой сигнальных белков, кодируемых семейством Atg-генов (*autophagy-related genes*), которые регулируются протеинкиназой mTOR (*the mammalian target of rapamycin*). Поэтому аутофагию, как и апоптоз, считают программируемой клеточной смертью.

Третий тип клеточной смерти – *некроз* охарактеризуется как «неспецифическая реакция клеток на повреждение». Он обычно считается пассивным процессом, не потребляющим энергии и не требующим синтеза новых белков. Традиционно считается, что некроз – многоступенчатый, неуправляемый процесс, не поддающийся фармакологической коррекции. Это катастрофическая клеточная смерть, неспецифически вызываемая интенсивными повреж-

белками или органеллами. Затем бислоенная мембрана замыкается сама на себя, при этом в цитоплазму высвобождаются белки, принимавшие участие в формировании аутофагосомы. При слиянии аутофагосом с лизосомами образуются аутофаголизосомы, в которых их содержимое «переваривается».

Химические компоненты «переваренного» материала, в первую очередь аминокислоты, возвращаются в цитоплазму для повторного использования.

«Самопоедание» клетки давно известно и обычно рассматривается как элемент клеточной защиты, освобождения клетки от поврежденных

дающими факторами самой разной природы. К типичным некротическим воздействиям относятся осмотический лизис, АФК и факторы, вызывающие повышение уровня ионов Ca^{2+} в цитозоле. При некрозе изменения сначала развиваются в цитоплазме, а затем захватывают ядро. Внутриклеточные органеллы и вся клетка набухают, округляются, а затем клеточная мембрана разрывается, и клетки лизируют (рис. 6.15, стадии 5 и 6). В отличие от апоптоза и аутофагии, для некроза не найдено особых биохимических маркеров.

Основные некротические процессы включают:

- 1) нарушение целостности плазматической мембраны и мембран внутриклеточных органелл;
- 2) проникновение воды в клетку;
- 3) падение ионных градиентов, декомпартментализацию и перераспределение низкомолекулярных соединений в клетке;
- 4) повышение уровня ионов кальция в цитозоле, которые активируют кальцийзависимые фосфолипазы, протеиназы и нуклеазы;
- 5) инактивацию ферментов, торможение биосинтетических процессов и снижение общего уровня метаболизма;
- 6) набухание и деградацию внутриклеточных органелл. В митохондриях – разрушение крист, падение мембранного потенциала и разобщение окислительного фосфорилирования. Временная активация гликолиза поддерживает клеточную энергетику до исчерпания запасов гликогена;
- 7) деструкцию цитоскелета, набухание и округление клетки;
- 8) лизис.

Эти повреждения взаимно усиливают друг друга, они практически не репарируют и необратимы.

По современным представлениям, одним из ключевых факторов, инициирующих некроз, является повышение уровня ионов кальция в цитозоле выше 10^{-4} - 10^{-3} М. Это может быть результатом проникновения Ca^{2+} в клетку через поврежденную плазматическую мембрану или открытые кальциевые каналы, а также высвобождение депонированного Ca^{2+} из митохондрий и ЭР. Цитоплазматический кальций активирует кальпаины – кальцийзависимые цистеиновые протеиназы, способствующие разрушению лизосомальных мембран и мобилизации лизосомальных ферментов, в частности, неспецифических протеаз катепсинов, называемых киллерными или исполнительными протеазами. Катепсины разрушают белки цитоскелета и клеточных мембран и, тем самым, нарушают их целостность.

Таким образом, смерть клетки – сложный и продолжительный процесс. По современным представлениям, критическим событием клеточной смерти, приводящим к необратимой утрате жизнедеятельности, является необратимая утрата целостности плазматической мембраны. До сих пор не вполне ясно, как повреждаются клеточные мембраны. В принципе возможны следующие повреждающие процессы:

- перекисное окисление липидов под влиянием АФК с последующим образованием различных дефектов: мембранных пор, липид-липидных и белок-липидных сшивок;
- повреждение мембранных белков: рецепторов, ионных каналов, ионных насосов, переносчиков ионов и метаболитов в результате окисления аминокислот, образования липид-белковых, внутри- или межбелковых сшивок;
- протеолитическое разрушение мембранных белков активированными протеазами, например, каспазами, катепсинами и кальпаинами;
- ферментативное разрушение мембранных липидов фосфолипазами.

6.3.3. Смерть клеток при фотодинамическом воздействии

ФД воздействие может индуцировать как некроз, так и апоптоз в зависимости от силы и интенсивности воздействия, а также от того, какие клеточные структуры повреждаются в первую очередь. Один и тот же ФС может вызывать некроз или апоптоз в зависимости от концентрации и времени инкубации. Так, после кратковременной инкубации (порядка 1 часа) «Photofrin», прежде всего, накапливался в плазматической мембране, и последующее освещение вызывало преимущественно некроз. После продолжительной инкубации (24 часа), когда краситель распределялся по всей клетке и сосредотачивался в митохондриях, доминировал апоптоз. Предполагается, что для ФДТ воздействие на митохондрии оптимально, т.к. оно эффективно индуцирует апоптоз, предпочтительный с медицинской точки зрения.

Фотоповреждение митохондрий может привести к следующим процессам, участвующим в апоптотической смерти клетки:

- падение производства АТФ;
- высвобождение ионов Ca^{2+} ;
- генерация АФК, в частности, супероксид-аниона $\bullet O_2^-$;
- высвобождение цитохрома *c* и запуск апоптоза.

ФС, локализующиеся в плазматической мембране, обычно сенсibiliзируют ее фотоповреждение и индуцируют некроз. Но иногда ФД воздействие с их участием может приводить к апоптозу.

ФД повреждение лизосом может вызвать выход в цитоплазму гидролитических ферментов, повреждение цитоплазматических структур и смерть клеток. Но все же оно не является критическим цитотоксическим событием. Возможно, лизосомные гидролазы фотоинактивируются в лизосомах еще до их выхода в цитозоль. К тому же они теряют активность в цитозоле при $pH = 7.0 - 7.2$. Поэтому локализующиеся в лизосомах гидрофильные ФС обычно менее эффективны, чем гидрофобные, накапливающиеся в мембранах и диффузно окрашивающие цитоплазму. Квантовый выход вызываемой гидрофильными ФС фотодинамической инактивации клеток, как правило, ниже, чем для гидрофобных сенсibiliзаторов, попадающих в митохондрии. Это

показано на примере гематопорфиринов, тетрафенилпорфиринов и сульфированных фталоцианинов.

ФС, локализующиеся в лизосомах, обычно индуцируют некроз, но иногда они могут вызывать апоптоз. Фотоповреждение лизосом приводит к высвобождению из них катепсинов, способных превращать прокаспазу в активную каспазу. Катепсины также могут активировать проапоптотический белок Bid, отрезая от него пептидный фрагмент. Укороченный белок tBid способствует олигомеризации белков в наружной мембране митохондрий и формированию из них мегаканалов, через которые могут выходить цитохром *c* и другие проапоптотические белки.

ЭР и КГ играют центральную роль в синтезе и процессинге клеточных белков, а также в поддержании ионного гомеостаза. Они участвуют и в процессах клеточной смерти. Гидрофобные ФС, такие как mTHPC или гипериперин, преимущественно локализуются в этих органеллах. Поэтому они являются первичными мишенями их ФД действия. Так, ультраструктурное исследование показало высокую чувствительность КГ в изолированных нервных клетках к действию «Photosense», вызывающему деградацию КГ: набухание и фрагментацию цистерн, а также снижение общего их числа.

Из фотоповрежденных цистерн ЭР и КГ высвобождаются ионы Ca^{2+} , белки Bid, каспаза и другие молекулярные стрессовые сигналы, которые могут воздействовать на митохондрии и запускать каскады, ведущие к смерти клеток.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном учебном пособии изложены современные взгляды и теории, касающиеся различных методов фототерапии. В качестве введения в курс кратко рассмотрены механизмы действия света на биологические системы и затронуты фундаментальные основы фотобиологических процессов. Ряд глав посвящен фотобиологическим процессам, протекающим в коже под действием света различных длин волн, рассмотрены методы фотохимиотерапии, лечения желтухи новорожденных с помощью света и другие методы фотомедицины. Однако основное внимание уделено методу фотодинамической терапии злокачественных образований. В частности, подробно рассмотрены основные принципы метода, механизмы разрушения опухолей, дана оценка фотосенсибилизаторов первого, второго и третьего поколений, указаны перспективные направления развития.

Автор выражает благодарность за полезные советы и обсуждение работы доктору физико-математических наук профессору В.В. Тучину, доктору биологических наук профессору Г.С. Терентюку и кандидату химических наук доценту А.Б. Правдину.

8. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Академик: Словари и энциклопедии на Академике: <http://dic.academic.ru/>
2. Биологическое значение УФ-излучения: <http://tmeister.ru/info/ultraviolet.shtml>
3. Биофизика / Под ред. В.Г. Артюхова – М.: Академический Проект; Екатеринбург: Деловая книга, 2009, 294 с.
4. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов / М.: Дрофа, 2006, 285 с.
5. Гейниц А.В., Сорокатый А.Е., Ягудаев Д.М., Трухманов Р.С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // Лазерная медицина, Т. 11, № 3, С. 42-46, 2007.
6. Красновский (мл) А.А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород // Биофизика, Т. 49, № 2, С. 305-321, 2004.
7. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия: Пер. с англ.– М.: Прогресс, 1992.
8. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения // СОЖ, № 8, С. 32-40, 1996.
9. Открытая астрономия 2.6. Глава 5.1.2. Солнечный спектр <http://college.ru/astronomy/course/design/index.htm>
10. Потапенко А.Я. Действие света на человека и животных // СОЖ, № 10, С. 13-21, 1996.
11. Потапенко А.Я. Псоралены и медицина – 4000 летний опыт фотохимиотерапии // СОЖ, Т. 6, № 11, С. 22-29, 2000.
12. Потапенко А.Я., Малахов М.В., Кягова А.А. Фотобиофизика фурукумаринов // Биофизика, Т. 49, № 2, С. 322-338, 2004.
13. Ремизов А.Н., Максина А.Г., Потапенко А.Я. Медицинская и биологическая физика / М.: Дрофа, 2003, 560 с.
14. Рябов М.В. Фотосенсибилизаторы, применяемые для ФДТ: <http://lasermedicine.narod.ru/pdt/Supply/sensitizers.html>
15. Соболев А. С. Модульные нанотранспортеры противораковых лекарств, придающие им клеточную специфичность и большую эффективность // Успехи биологической химии, Т. 49, С. 389-404, 2009.
16. Странадко Е.Ф., Иванов А.В. Современное состояние проблемы фотодинамической терапии рака и неопухолевых заболеваний // Биофизика, Т. 49, № 2, С. 380-383, 2004
17. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях / Москва: ФИЗМАТЛИТ, 2010, 488 с.
18. Тучина Е.С., Тучин В.В., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. Индуцированное ИК лазерным излучением фототоксическое воздействие конъюгатов плазмонно-резонансных наночастиц с красителем индоцианиновым зеленым на

- бактерии *Staphylococcus aureus* // Квант. электр., Т. 41, № 4, С. 354-359, 2011.
19. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / С.-Пб.: Наука, 2010, 327 с.
 20. Химическая энциклопедия on-line: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/>
 21. Хлебцов Н.Г. Оптика и биофотоника наночастиц с плазмонным резонансом // Квантовая Электроника, Т. 38, № 6, С. 504-529, 2008.
 22. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. Клинические аспекты фотодинамической терапии / Калуга: Издательство научной литературы Н.Ф.Бочкаревой, 2009, 204 с.
 23. Developmental Biology and Genetics <http://mglinets.narod.ru/slova6/autophagy.htm>
 24. Jasinski S. Semi-natural and synthetic chiral cycloketo-porphyrin systems. Approaching novel photosensitizers // PhD dissertation, Friedrich Alexander University Erlangen-Nurnberg, Nurnberg, 2009, 205 p.
 25. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles // Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer, Vol. 111, P. 1–35, 2010.
 26. Rancan F., Helmreich M., Mölich A., Ermilov E.A., Jux N., Röder B., Hirsch A., Böhm F. Synthesis and in vitro testing of a pyropheophorbide-*a*-fullerene hexakis adduct immunconjugate for photodynamic therapy// Bioconjugate Chem., Vol. 18, P. 1078-1086, 2007.

Учебное издание

Элина Алексеевна Генина

МЕТОДЫ БИОФОТОНИКИ: ФОТОТЕРАПИЯ

Учебное пособие