

В атаку на раковые клетки

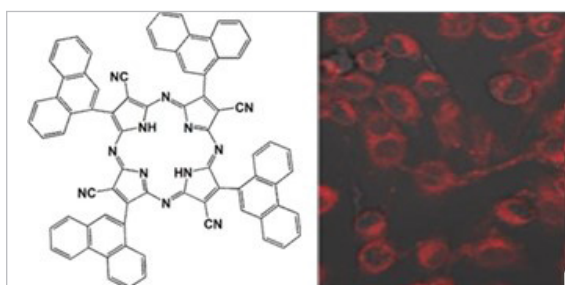
Междисциплинарная команда нижегородских ученых, в состав которой вошли химики, биологи и физики, доказала, что фотосенсибилизаторы на основе цианоарилпорфиразинов показали себя эффективными индукторами иммуногенной смерти раковых клеток. Вовлечение собственной иммунной системы организма в борьбу с онкологией дает надежду победить наиболее агрессивные формы рака



► Лариса Григорьевна Клапшина

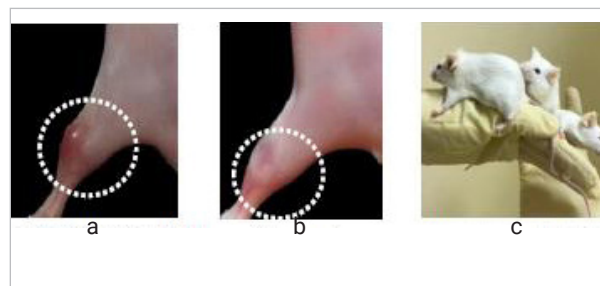
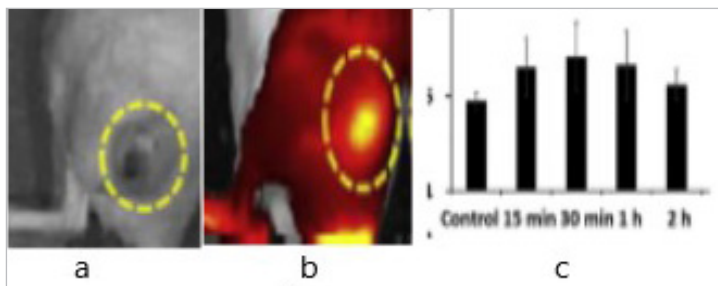
— Хорошо помню тот день, когда на рабочем столе своего аспиранта я увидела раствор необычно яркого изумрудного цвета. Пигментов с такой окраской нам никогда прежде не удавалось получить, хотя мы об этом давно мечтали, — рассказывает старший научный сотрудник Института металлоорганической химии Российской академии наук (ИМХ РАН), к.х.н. Лариса Григорьевна Клапшина. — Дальнейший анализ полученного вещества подтвердил, что его основой является порфиразиновый макроцикл, краситель с очень высоким коэффициентом поглощения света. Известно, что соединения этого класса перспективны в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии онкологических заболеваний (ФДТ). Такие фотосенсибилизаторы генерируют активные формы кислорода, способные убивать раковые клетки при их освещении светом на определенной длине

► Рис. 1. Один из примеров структуры цианоарилпорфиразинов и полученное на конфокальном микроскопе изображение раковых клеток, поглотивших флуоресцентный порфиразин



волны. Уникальность полученного соединения заключалась в том, что впервые нам удалось получить макроциклическое соединение, обрамленное восемью цианогруппами, которые придавали необычные для этого вида соединений электроноакцепторные свойства. Опубликованная тогда в Chemical Communication статья об этом совершенно новом соединении получила статус hot article. Однако, смущала низкая устойчивость данного соединения к влаге воздуха. Введение в обрамление макроцикла четырех ароматических групп позволили решить эту проблему. Кроме того, ароматические группы обеспечили макроциклу еще одно и очень важное в практическом смысле свойство — флуоресценцию в красной области спектра. Новая серия флуоресцентных пигментов, которые мы назвали цианоарилпорфиразинами, действительно представляла большой интерес в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ, поскольку являлась не только генератором частиц, атакующих раковые клетки, но и флуоресцентным биомаркером. Флуоресцентное излучение позволяло визуализировать опухоль внутри организма, поскольку порфиразины обладают свойством селективно накапливаться в опухолевой ткани. Это хорошо видно на рисунке 1.

Стало понятно, что пора налаживать междисциплинарные связи, то есть привлекать к работе с нашими соединениями биологов и биофизиков. Нам очень повезло, что мы познакомились с группой молодых ученых, работающих в области биофотоники на базе Института прикладной физики Российской академии наук (ИПФ РАН). В то время группу возглавляла нынешний ректор Нижегородского государственного университета имени Лобачевского (ННГУ) Елена Вадимовна Загайнова, и это было для нас началом долговременного и очень плодотворного междисциплинарного сотрудничества с этой командой. К настоящему времени синтезировано и охарактеризовано не менее 40 цианоарилпорфиразинов с самыми разнообразными ароматическими группами, обрамляющими макроцикл. Мы обнаружили, что природа ароматических заместителей в макроцикле сильно влияет на его фотодинамические свойства. Таким образом, возникает возможность тонкой настройки эффективности фотосенсибилизатора. Особенно привлекательны соединения с высокой фотоиндуцированной токсичностью по отношению к раковым клеткам



и минимальной цитотоксичностью при отсутствии освещения. Темновая цитотоксичность некоторых из полученных нами фотосенсибилизаторов более, чем на два порядка ниже, чем фотоиндуцированная цитотоксичность. Это позволяет рассчитывать на безопасность использования таких соединений для фотодинамической терапии, поскольку они токсичны лишь для клеток опухоли, подвергающихся интенсивному лазерному облучению. На клеточных культурах и мышиных моделях было показано, что полученные нами соединения являются эффективными фотосенсибилизаторами для ФДТ.

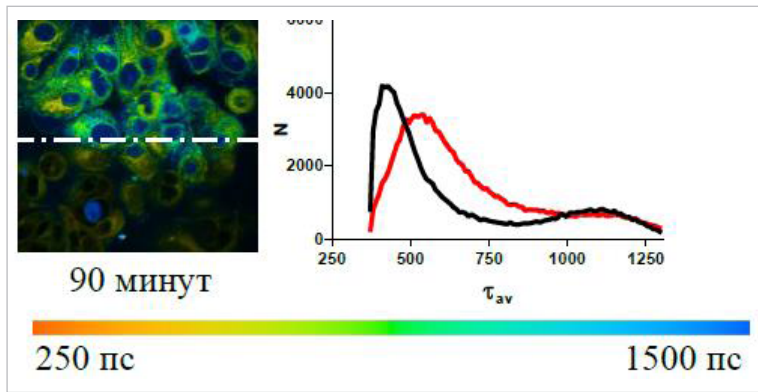
На платформе полученных в ИМХ РАН флуоресцентных порфиразиновых пигментов нижегородскими учеными были разработаны бимодальные агенты биоимиджинга, позволяющие визуализировать онкологическое образование в организме двумя независимыми методами: измеряя интенсивность флуоресценции порфиразина (флуоресцентный биоимиджинг) и используя магнитные свойства его металлокомплекса с гадолинием (магнитно-резонансный биоимиджинг). На рисунке 2 показано полученное сотрудниками Приволжского исследовательского медицинского университета флуоресцентное изображение модельной опухоли экспериментального животного (мыши) после внутривенного введения раствора порфиразинового флуорофора. Рядом приводится динамика изменения магнитно-резонансного сигнала в опухоли после введения лекарства, также указывающая на наличие опухоли.

По словам Ларисы Клапшиной, молодым сотрудником кафедры биофизики ННГУ Наталье Юрьевне Шилигиной и Артуру Борисовичу Воловецкому после проведения большой серии экспериментов *in vivo* на мышиных моделях на базе Института биологии и биомедицины (ИББМ) ННГУ с использованием лазерной аппаратуры, разработанной в ИПФ РАН, удалось показать, что фотодинамическое воздействие полученных пигментов на онкологическое образование не только останавливает рост опухолей, но и приводит к их полной регрессии в течение трех недель, что подтверждается гистологическими анализами. При этом 70% экспериментальных животных (мышей) были полностью излечены, что является блестящим результатом по выживаемости для такой агрессивной и метастазирующей формы онкологического заболевания, как C26 (карцинома толстой кишки мыши) (рисунок 3).

— Конечно, высокая фотодинамическая активность полученных нами пигментов является важным достижением, хотя теоретически такой результат всегда можно ожидать для соединений, относящихся к классу тетрапиррольных красителей,— продолжает Лариса Григорьевна.— Однако, в процессе исследований наши макроциклы показали такие фотофизические свойства, которые никак нельзя было предположить для соединений этого ряда. Было обнаружено, что интенсивность их флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния очень сильно зависят от вязкости окружающей среды. Более того, локальную вязкость микроокружения молекулы пигмента можно было рассчитать, используя простые математические уравнения, связывающие значение локальной вязкости с интенсивностью флуоресценции и величиной времени жизни возбужденного состояния флуорофора. Такие соединения получили название молекулярных флуоресцентных роторов, поскольку воздействие света индуцирует сильную сегментальную подвижность внутри таких молекул в средах с низкой вязкостью, что приводит к падению интенсивности флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния. Увеличение вязкости среды подавляет этот эффект. Таким образом, порфиразиновый фотосенсибилизатор, помещенный в живую клетку, может обеспечить уникальную оптическую информацию о внутриклеточной вязкости и даже вязкости отдельных клеточных составляющих, так называемых компартментов. Нужно отметить, что внутриклеточная вязкость — важнейший физиологический параметр клетки, характеризующий ее функциональный статус. От вязкости зависит скорость бимолекулярных реакций, определяющих жизненно важные метаболические процессы, протекающие в клетках. В частности, показано, что отклонение этого параметра от нормы для клеточных мембран может быть связано с различными патологиями — такими, как атеросклероз, диабет, болезнь Альцгеймера и даже онкология. Различные динамические процессы в опухолях в ходе терапии могут быть отслежены в режиме реального времени благодаря оптическому мониторингу внутриклеточной вязкости. Известно, что при фотодинамической терапии имеет место очень сильное возрастание этого жизненно важного параметра, и мы действительно многократно это наблюдали на разнообразных клеточных культурах, подвергавшихся фотодинамическому воздействию в

▲ Слева:
Рис. 2.
Использование цианоарил-порфиразиновых комплексов иттербия в качестве бимодальных агентов диагностики в экспериментах *in vivo*;
a и b (соответственно) — фотографии экспериментальных животных (опухоль обозначена пунктирной линией) до и после внутривенного введения и последующего облучения порфиразина на длине волны света 630 нм); c — характерное изменение магнитно-резонансного сигнала в районе опухоли

Справа:
Рис. 3.
Экспериментальная опухоль через сутки (А) и через четыре недели (В) после ФДТ с использованием цианоарил-порфиразина. (С) — полностью выздоровевшие животные, подвергшиеся ФДТ в присутствии цианоарил-порфиразина



▲ Рис. 4. Конфокальное изображение клеток, загруженных цианоарилпорфиразином. Пунктирная линия разделяет клетки до ФДТ (снизу) и после ФДТ (сверху) через 90 минут после облучения на длине волны 594 нм (50 Дж/см²). Псевдоцветная палитра отображает времена жизни в диапазоне от 250 до 1500 пс

присутствии наших соединений. Проведение таких исследований стало возможно благодаря уникальной установке FLIM, позволяющей в процессе терапевтического воздействия получать конфокальные изображения клеток, представляющих собой цветную «карту» распределения молекул красителя внутри клетки по времени жизни возбужденного состояния. На рисунке 4 видно, что через 90 минут после фотодинамического воздействия, индуцированного порфиразиновым красителем в облучаемой зоне культуры опухолевых клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), регистрируется увеличение среднего времени жизни возбужденного состояния фотосенсибилизатора τ_{av} . Гистограмма распределения времени жизни после ФДТ (красная линия) значительно сдвигается в сторону увеличения (с 370 до 530 пс), что указывает на значительное сгущение внутриклеточной среды, приводящее к гибели раковых клеток.

Казалось бы, вклад фундаментальной химической науки в данном направлении исследований исчерпан: мы открыли новое обширное семейство флуоресцентных тетрапиррольных макроциклов с необычными фотофизическими свойствами, перспективных в качестве сенсibilizаторов ФДТ, выявили основные принципы дизайна макроцикла, обеспечивающие максимальный фотодинамический эффект и безопасность для здоровых тканей в отсутствие облучения. Теперь дело за специалистами в области медицины и биотехнологий заставить эти соединения работать на благо людей. Совсем недавно в рамках выполнения гранта, финансируемого Российским научным фондом (проект № 18-15-00279), под руководством известного бельгийского ученого профессора Дмитрия Вадимовича Крысько и доктора биологических наук, директора ИББМ ННГУ Марии Валерьевны Ведуновой сотрудницы Института кандидаты биологических наук Татьяна Александровна Мищенко, Ирина Владимировна Балалаева, Елена Владимировна Митрошина и магистр кафедры нейротехнологий Виктория Дмитриевна Турубанова в сотрудничестве с экспертами в области иммунологии Гентского университета начали исследования механизмов клеточной смерти при ФДТ опухолей головного мозга. Исследовались известные в России фотосенсибилизаторы на основе

тетрапиррольных макроциклов, уже нашедших коммерческое применение. Руководитель проекта счел интересным включить в список исследуемых соединений новые флуоресцентные пигменты, разработанные в ИМХ РАН и прошедшие биологическое тестирование в Нижнем Новгороде. Мы были очень рады предоставить наши соединения в распоряжение высококвалифицированных биофизиков и иммунологов и гордимся тем, что фотосенсибилизаторы на основе цианоарилпорфиразинов показали себя эффективными индукторами иммуногенной смерти раковых клеток. Вовлечение собственной иммунной системы организма в борьбу с тяжелой болезнью дает надежду победить наиболее агрессивные формы онкологии, включая рак мозга.

Следует отметить, что одной из важнейших проблем современной онкологии является сильная резистентность (сопротивляемость) некоторых наиболее тяжелых и метастазирующих форм онкологических заболеваний в отношении любых, даже самых жестких, видов противоопухолевой терапии.

— Наши порфиразины преподнесли нам новый сюрприз, который мотивировал нас, химиков ИМХ РАН, продолжить именно химические фундаментальные исследования в этой области. Мы обнаружили, что цианогруппы и двойные связи, в пиррольных фрагментах макроцикла, легко блокируют тиольные (S-H) группы. Биомолекулы, содержащие S-H-группы, представляют собой важнейшие антиоксиданты, защищающие организм от окислительных стрессов. Эти группы являются активными центрами ряда ферментов, катализирующих жизненно важные метаболические процессы. В последние годы появилось большое количество публикаций, содержащих данные о способности определенных раковых клеток перепрограммировать деятельность жизненно важных ферментов в ходе онкогенеза, подчиняя их деятельность целям собственного роста, самообновления и метастазирования опухоли, несмотря на самое жесткое терапевтическое воздействие. Именно этим объясняется труднопреодолимая резистентность многих опухолей любым методам лечения. По словам авторитетного американского онколога Ралфа ДеБардиниса, если метаболические процессы создают преимущества для раковых клеток, это означает, что такие метаболические процессы надо сделать мишенью для терапии. Возможность подавления репрограммированных метаболических реакций блокированием внутриопухолевых тиольных групп с помощью наших порфиразинов вселила в нас надежду внести посильный вклад в решение проблемы резистентности онкологических заболеваний терапевтическому воздействию. Так что впереди у нас новый цикл исследований, — завершает рассказ Лариса Григорьевна. ☺