

УДК 577.112.3:612.41/.42.086.164

©Коллектив авторов

## **ИНДУЦИРУЕМОЕ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ НАКОПЛЕНИЕ ПОРФИРИНОВ В КЛЕТКАХ СИСТЕМЫ КРОВИ**

***Е.С. Лобанок\*, И.Б. Василевич, А.В. Воробей***

ГНУ “Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси”,  
ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Беларусь; тел.: (017) 2842888;  
факс: (017) 2842359; эл. почта: krzhes@yandex.ru

Исследованы дозовые и кинетические зависимости накопления порфириновых пигментов в лимфоидных клетках и клетках костного мозга при индукции синтеза гема экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой (АЛК). Концентрационная зависимость накопления порфиринов для спленоцитов, тимоцитов, лимфоцитов периферической крови и клеток костного мозга имеет максимум в области 0,7-1,0 мМ АЛК. Скорость образования прото-, копро- и уропорфирина, определяемая типом клеток, минимальна в спленоцитах и наиболее выражена в клетках костного мозга. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной опасности повреждения клеток системы крови при проведении фотодинамической терапии с использованием АЛК.

**Ключевые слова:** гем, порфирины, аминолевулиновая кислота, клетки системы крови.

**ВВЕДЕНИЕ.** 5-Аминолевулиновая кислота (АЛК) является одним из ранних предшественников в цепи биосинтеза гема. Её образование регулируется в митохондриях конечным продуктом, поэтому внутриклеточный уровень АЛК лимитирует количество других предшественников гема – порфириногенов [1-3]. В норме основным источником гема в клетке является его синтез *de novo*. Введение экзогенной АЛК позволяет обойти регуляторную стадию процесса гемообразования и индуцировать накопление в клетках уро-, копро- и протопорфириногенов. Порфириногены могут подвергаться аутоокислению с образованием соответствующих порфиринов, которые накапливаясь в клетках, способны выступать в роли сенситизаторов фотоповреждений различных клеточных компонентов. Это явление в настоящее время используется для разработки методов фотодиагностики и фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических и ряда других заболеваний [4-9]. Однако при введении в организм АЛК синтез порфиринов может активироваться не только в опухолевых, но и в

---

\* - адресат для переписки

ответственных за реализацию противоопухолевых реакций иммунокомпетентных клетках, что при проведении ФДТ чревато их повреждением и снижением противоопухолевых реакций организма. Так, ранее нами было показано изменение рецепторных функций лимфоцитов при не летальных дозах фотодинамического воздействия [10]. В связи с этим целью работы явилось исследование дозовых и кинетических зависимостей накопления порфириновых пигментов в лимфоидных клетках и клетках костного мозга (КМ) при индукции синтеза гема экзогенной АЛК в условиях *in vitro*.

**МЕТОДИКА.** Объектом исследования служили лимфоциты периферической крови (ЛПК), спленоциты, тимоциты и клетки КМ беспородных крыс массой 120-150 г обоего пола. Лимфоциты выделяли методом градиентного центрифугирования гепаринизированной крови в растворе фиколл-урографина с плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> [11]. Для получения спленоцитов и клеток КМ селезенку и костномозговую стержень, вымытый из бедренной кости забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР) гомогенизировали, клеточную суспензию фильтровали через капроновое сито, наслаивали на смесь фиколл-урографина ( $\rho = 1,080$  г/см<sup>3</sup>), центрифугировали при 300 g в течение 20-30 мин, с интерфазы снимали клетки. Суспензионную культуру тимоцитов готовили стандартным методом [12]. Клетки дважды отмывали в ЗФР и инкубировали в той же среде в концентрации  $4 \cdot 10^6$  кл/мл и  $1-2 \cdot 10^7$  кл/мл при температуре 37°C, в течение 1-20 ч без или в присутствии АЛК. Число клеток подсчитывали в камере Горяева, их жизнеспособность оценивали по прокраске эозином.

Порфирины из образцов (клетки + среда) экстрагировали по методу Rimington [13]. К 1 мл клеточной суспензии ( $1-2 \cdot 10^7$  кл/мл) добавляли смесь этилацетата с уксусной кислотой (4:1) до конечного объема 3 мл и выдерживали 20 ч при 4°C. Из полученного экстракта, переводя его последовательно в растворы 0,1, 0,5 и 1,0 М соляной кислоты выделяли отдельные пигменты - уро- (УП), копро- (КП) и протопорфирин (ПП). Количество УП, КП и ПП оценивали по интенсивности флуоресценции гидрохлоридных растворов при длинах волн возбуждения 405, 399,5, 407 нм и регистрации 596, 594, 601 нм, соответственно.

Количество накапливаемых в клетках ПП, КП и УП определяли после добавления к клеточным суспензиям 0,1–2,5 мМ АЛК в ЗФР. Кинетику АЛК-индуцируемого синтеза порфиринов регистрировали в течение 1-20 часов. Суммарное содержание и выход пигментов из клеток в среду инкубации определяли по интенсивности флуоресценции клеточных суспензий и супернатантов, полученных после центрифугирования образцов при 300 g и перевода в 1,5 М HCl.

В работе использовали КП III ("Sigma"), ПП монометилловый эфир ("Serva"), октаметилловый эфир УП III ("Sigma"), АЛК ("Serva"), фиколл ("Фармация"), урографин ("Schering"), другие реактивы марок х.ч. и ч.д.а. производства "Реахим" (Россия).

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре JY-3CS ("Jobin Ivo", Франция). Результаты экспериментов обрабатывали статистически по общепринятым методам вариационной статистики [14]. Данные считали достоверными при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В норме синтез гема в клетках строго регулируется и происходит с такой скоростью, что количество его промежуточных продуктов уро-, копро- и протопорфириногена, а также АЛК и свободных порфиринов в тканях здорового организма весьма низкое [15]. Из лимфоидных клеток и клеток КМ крыс экстрагируются три типа порфиринов - УП, КП и ПП, соответствующие порфириногенам, участвующим в цепи биосинтеза гема (таблица). По содержанию в исследуемых клетках преобладает ПП. Уровень КП и УП по сравнению с ПП в спленоцитах и тимоцитах в 5-6 раз меньше. В клетках КМ отношение концентрации ПП к КП равно 5, а ПП к УП больше 7.

Таблица. Содержание порфиринов в суспензиях клеток системы крови (пмоль/10<sup>8</sup> кл.).

Клетки	ПП	КП	УП
Спленоциты	20,1 ± 2,4	3,7 ± 0,9	3,4 ± 0,6
Тимоциты	24,7 ± 4,5	4,1 ± 0,9	4,0 ± 1,3
Клетки костного мозга	31,0 ± 3,3	5,9 ± 1,0	4,2 ± 0,9

При введении в среду инкубации экзогенной АЛК в клетках появляется избыток порфириногенов, которые неферментативным путем превращаются во флуоресцирующие порфирины. Увеличение интенсивности порфириновой флуоресценции в суспензиях различных типов иммунокомпетентных клеток наблюдается практически сразу после добавления АЛК (37°C). Зависимости накопления порфиринов от концентрации АЛК для разных типов клеток имеют максимум в области 0,7-1,0 мМ (рис. 1). При концентрации АЛК выше 1,5 мМ наблюдается замедление процесса порфиринообразования. Скорость АЛК-индуцируемого синтеза ПП, КП и УП определяется типом клеток и до 12 ч имеет линейную зависимость от времени (рис. 2). Насыщение на кривой временной зависимости при оптимальных значениях АЛК происходит через 18-20 ч. Инкубация клеток в ЗФР при 37°C без добавления аминокислоты приводит к увеличению на 3-5% (за 2-4 ч) внутриклеточного содержания ПП.

С, отн. ед.

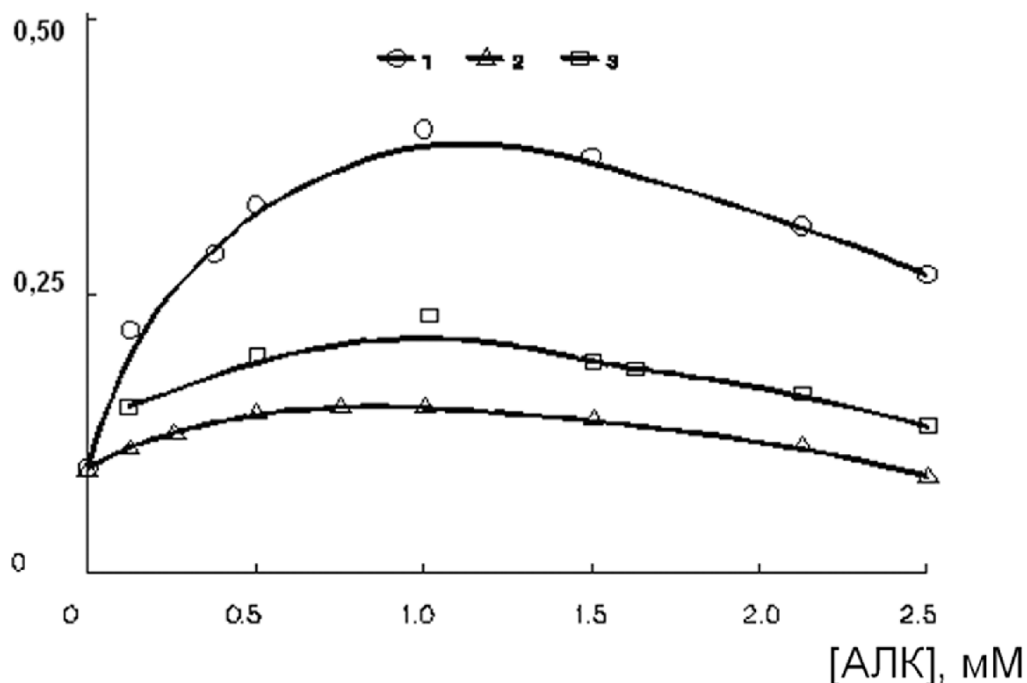


Рисунок 1.

Зависимость содержания порфиринов в суспензиях клеток КМ (1), спленоцитов (2) и тимоцитов (3), инкубированных 4 ч с АЛК от концентрации АЛК ( $4 \times 10^6$  кл/мл, ЗФР, 37°C, 0,8 мМ АЛК).

$\lambda_{\text{возб}} = 405$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 601$  нм; 1,5 М НСl; С, отн.ед. - концентрация, относительные единицы; [АЛК], мМ - количество АЛК.

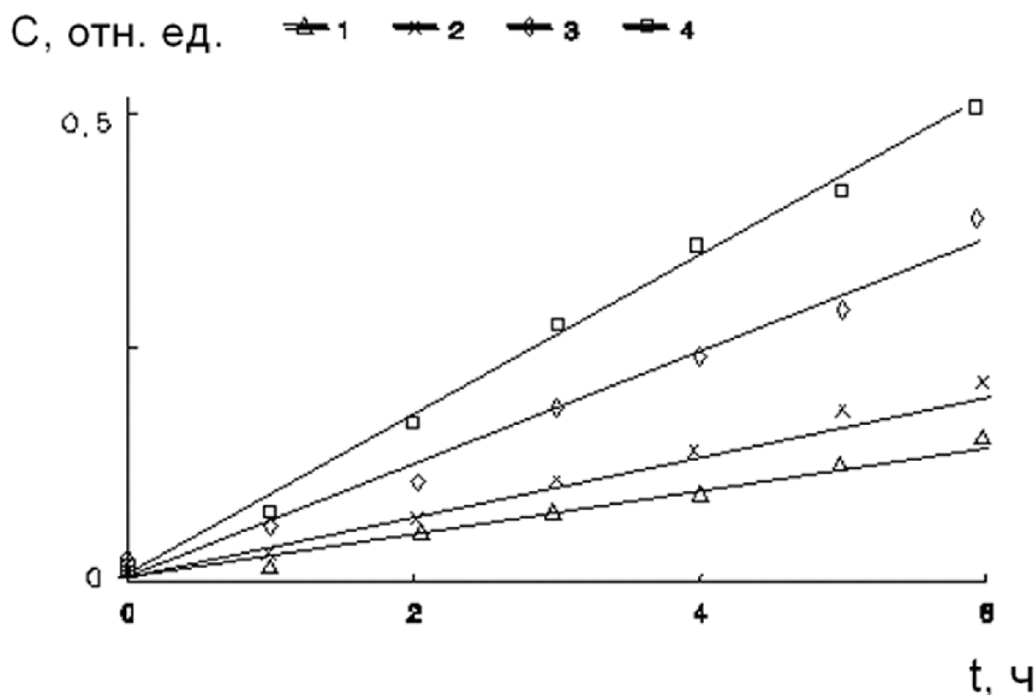


Рисунок 2.

Зависимость содержания порфиринов в суспензиях спленоцитов (1), тимоцитов (2), ЛПК (3) и клеток КМ (4) от времени после добавления в инкубационную среду АЛК ( $4 \times 10^6$  кл/мл, 3ФР,  $37^\circ\text{C}$ , 0.8 мМ АЛК).  $\lambda_{\text{возб}} = 405$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 601$  нм, 1,5 М НСl; С, отн.ед. - концентрация, относительные единицы; t, ч - время, часы.

АЛК-индуцируемое накопление пигментов наиболее выражено в клетках КМ (рис. 2). Количество образуемого в них ПП за 4 ч инкубации с АЛК превышает уровень накопления данного пигмента за то же время в ЛПК более чем в 1,2 раза, в тимоцитах и спленоцитах - в 1,6 и 3,0 раза, соответственно. Аналогичные различия между отдельными популяциями клеток наблюдаются и по накоплению КП и УП (рис. 3). Меньшим, чем в других типах клеток оказывается накопление порфиринов в ответ на АЛК в спленоцитах. В процессе АЛК-индуцируемого синтеза в клеточных суспензиях не только возрастает количество фотодинамически активных пигментов, но и изменяется их процентное отношение. Для всех клеток в течение первых 12 ч культивирования характерно увеличение доли ПП, в последующие 8 ч вклад УП в суммарное количество внутриклеточных пигментов увеличивается более чем в 2 раза. Через 18-20 ч формируется определенная картина распределения порфиринов между клетками и инкубационной средой. Популяции иммунокомпетентных клеток и клеток КМ значительно различаются по этим характеристикам. Полученные данные свидетельствуют о том, что промежуточные продукты синтеза гема, в частности уропорфириноген и копропорфириноген оказываются не доступными соответствующим оксидазам. Иначе наблюдалось бы преимущественное накопление одного из порфиринов. Причиной такого разобщения субстратов с ферментами, скорее всего, является выход образуемых пигментов из митохондрий в цитоплазму, а также из клеток во внеклеточную среду. После инкубации клеток с АЛК в течение 2 ч нами зарегистрировано появление порфириновой флуоресценции в инкубационной среде. Распределение порфиринов между клетками и средой имеет временную зависимость. В течение

первых 4 ч культивирования клеток с АЛК наиболее значительный выход пигментов (до 25%) наблюдается из спленоцитов, хотя именно эти клетки характеризуются самым низким уровнем накопления безметалльных порфиринов. В тоже время, в среде инкубации клеток КМ, проявляющих более высокую скорость АЛК-индуцируемого синтеза пигментов к этому времени определяется только 10-11% пигментов. Анализ спектров возбуждения и флуоресценции супернатантов свидетельствуют о том, что из клеток выходят преимущественно КП и УП. При увеличении времени выдерживания клеток с АЛК процент порфиринов в инкубационной среде возрастает, что вероятно обусловлено изменением проницаемости плазматических мембран вследствие токсических темновых эффектов АЛК, отмечаемых рядом авторов [16]. Тем не менее, даже при длительной инкубации (до 20 ч), более 50% АЛК-индуцируемых порфиринов остается связанными с внутриклеточными компонентами.

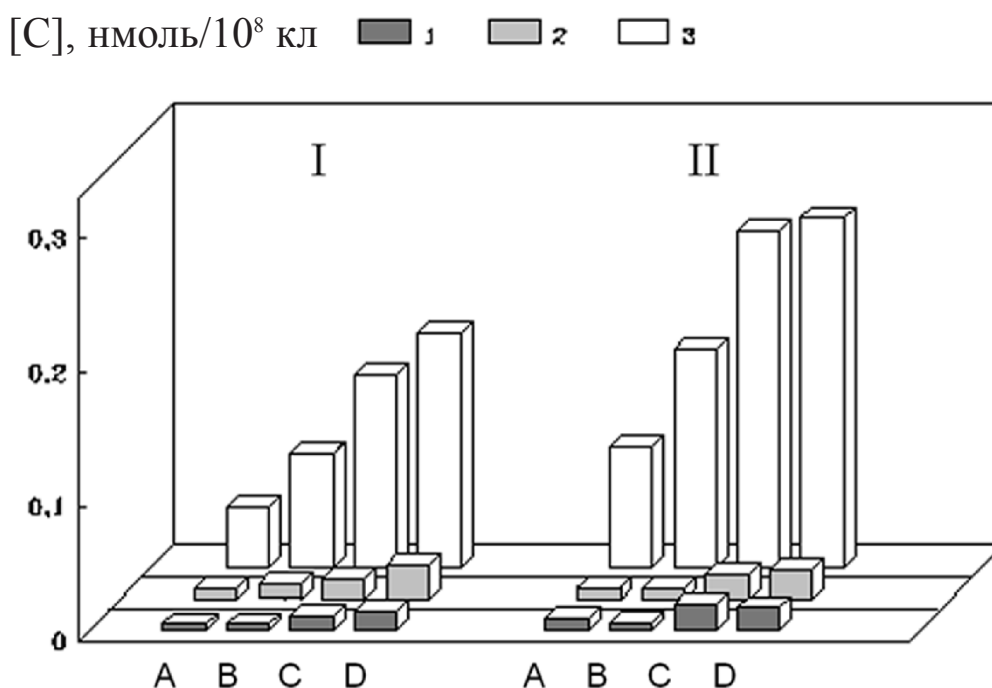


Рисунок 3.

Содержание порфиринов в суспензиях спленоцитов (А), тимоцитов (В), ЛПК (С) и клетках КМ (D), инкубированных 2 (I) и 4 (II) ч в присутствии АЛК (ЗФР, 37°C, 0,8 мМ АЛК).

1 - УП, 2 - КП, 3 - ПП; [C], нмоль/10<sup>8</sup> кл - концентрация в 10<sup>8</sup> клеток;

p≤0,05 как между сравниваемыми группами клеток (А, В, С, D) при инкубации 2 ч, так и отдельными типами клеток при инкубации 2 и 4 ч.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** В клетках системы крови с использованием флуоресцентного метода определено содержание основных видов эндогенных порфиринов – УП, КП и ПП. Внутриклеточное количество ПП в несколько раз превышает уровень УП и КП. При добавлении в суспензию лимфоидных клеток и клеток КМ экзогенной АЛК в них инициируется синтез гема и наблюдается накопление эндогенных порфиринов, которые могут выступать при проведении ФДТ в качестве сенсibilizаторов повреждений клеточных компонентов и клеток. Скорость АЛК-индуцируемого синтеза и количество образуемых фотодинамически активных пигментов в разных типах клеток системы крови существенно различаются, что, вероятно, обусловлено их метаболической и функциональной активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ponka P. (1999) Am. J. Med. Sci., **318** (4), 241-256.
2. Rimington C. (1989) J. Clin. Biochem., **27**, 473-486.
3. Sassa S. (1990) in Hematology (Williams ed.) N.-Y.: McGraw-Hill, pp. 322-329.
4. Grebenova D., Cajthamlova H., Bartosova J. et al. (1998) J. Photochem. Photobiol. B. Biol., **47**, 74 -81.
5. Keltz C.J., Brown N.J., Reed M.W.R., Ackroyd R. (2002) Photoch. Photobiol. Sci., **1**, 158-168.
6. Malik Z., Lugaci H. (1987) Br. J. Cancer, **56**, 589-595.
7. Rebeiz N., Aerkins S., Rebeiz C.A. et al. (1996) Cancer Res., **56**, 339-344.
8. Wolf P., Fiuk Puches R., Cerroni L., Kerl H. (1994) J. Am. Acad. Dermatol., **31**, 678-680.
9. Tan W.C., Fulljames C., Stone N., Dix A.J., Shepherd N., Roberts D.J.H. (1999) J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **53**, 75-80.
10. Шевченко А.А., Лобанок Е.С., Воробей А.В. (1993) Биополимеры и клетка, **6**, 69-72.
11. Хейфиц Л.В., Абалкин В.А. (1973) Лаб. дело, №10, 579-581.
12. Клаус Дж. (1980) Лимфоциты. Методы, Мир. М.
13. Rimington C. (1963) Acta Med. Scand., **179**, 11-24.
14. Рокицкий П.Ф. (1967) Биологическая статистика, Высшая школа, Минск.
15. Sassa S. (1999) in: Angle the most up-to-date Hematology-Medicine series (Takaku F., eds.), №19, pp. 11-17.
16. Hryhorenko E., Reittenhouse-Diakun K., Harvery N. et al. (1998) Photochem. Photobiol, **67**, 565-572.

Поступила: 25. 09. 2009.

ACCUMULATION OF PORPHYRINS IN CELLS OF SYSTEM OF BLOOD INDUCED BY 5-AMINOLAEVULINIC ACID

*E.C. Lobanok, I.B. Vasilevich, A.V. Vorobey*

The Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus,  
ul. Akademicheskaya, 27, Minsk, 220072 Belarus; tel.: (017) 2842888; fax: (017) 2842359;  
e-mail: krzhes@yandex.ru

The levels and rates of accumulation of porphyrins in lymphoid cells and bone marrow cells treated with exogenous 5-aminolaevulinic acid (ALA) were studied. The dependence of the quantity of porphyrins accumulated in cell on ALA concentrations in the medium had maximum at 0.7-1.0 mM ALA for all the cell types studied (splenocytes, thymocytes, peripheral blood lymphocytes and bone marrow cells). The rate of accumulation of uro-, copro- and protoporphyrins depended on cell types. The lowest and the highest levels were found in splenocytes and highest in bone marrow cells respectively. It is suggested that photodynamic therapy employing ALA is potentially dangerous for blood cells.

**Key words:** heme, porphyrins, aminolaevulinic acid, blood cells.