

УДК 53.086

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ МЕТОДАМИ ЦИФРОВОЙ ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2019 г. А. А. Жихорева¹, А. В. Белашов^{1*}, Д. А. Горбенко¹, Н. А. Авдонкина², И. А. Балдуева²,
А. Б. Данилова², М. Л. Гельфонд², Т. Л. Нехаева², И. В. Семёнова¹, О. С. Васютинский¹

¹Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Петрова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: belashov.andrey.93@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2018;

после доработки 06.12.2018;

принята в печать 21.01.2019

Статья посвящена исследованию процессов гибели живых клеток и изменению их оптических и морфологических характеристик в результате фотодинамического воздействия, сопровождающегося внутриклеточной генерацией синглетного кислорода. Исследована реакция клеток рака почки, остеогенной саркомы и меланомы кожи на фотодинамическое воздействие. Продемонстрировано изменение их высоты, распределения показателя преломления и среднего фазового набега. Показано, что при дозе облучения 42 Дж происходит некроз клеток рака почки и остеогенной саркомы, в то время как существенных оптических и морфологических изменений в клетках меланомы кожи не наблюдается.

Ключевые слова: цифровая голографическая микроскопия, синглетный кислород, морфология живых клеток, некроз, фотодинамическое воздействие.

DOI: 10.1134/S0207401X19060116

ВВЕДЕНИЕ

Рост заболеваемости злокачественными опухолями и большая частота рецидивов – важнейшие проблемы современной онкологии, которые определяют важность совершенствования методов лечения пациентов с данной патологией. Перспективным является использование фотодинамической терапии (ФДТ), действие которой основано на физико-химических свойствах фотосенсибилизаторов (ФС), способных селективно накапливаться в патологически измененных тканях с повышенным метаболизмом [1] и активироваться путем локального облучения светом с длиной волны, соответствующей пику поглощения молекул ФС. Эта активация вызывает генерацию синглетного (первого возбужденного состояния $a^1\Delta_g$ молекулы O_2) и других активных форм кислорода, губительно действующих на опухолевые клетки, что приводит к резорбции опухоли и аблации в ложе опухолевого очага [2, 3]. В настоящее время ФДТ активно используется в клинической практике как в качестве основного метода лечения, так и в комбинации с другими методами

лечения злокачественных новообразований различных локализаций. В частности, в ряде работ было показано [4–6], что данный подход позволяет проводить эффективное лечение рака шейки матки, пищевода, трахеи и других видов злокачественных опухолей.

К настоящему времени разработано большое количество фотосенсибилизаторов (см., например, [7–10]) и проведены детальные исследования их физических и химических свойств, наиболее важными из которых являются квантовый выход генерации активных форм кислорода, спектр поглощения, стабильность при световом облучении, темновая фототоксичность, скорость элиминации из организма, а также область их внутриклеточной локализации [11–13]. Анализ эффективности ФС для ФДТ обычно включает в себя четыре этапа: 1) исследование фотофизических свойств ФС в растворах; 2) изучение реакции злокачественных клеток на фотодинамическое воздействие (ФДВ) с этими ФС *in vitro* и 3) *in vivo*; 4) проведение клинических исследований их эффективности при ФДТ.

С точки зрения современных исследований реакции клеток на ФДВ важно не только определять дозы и режимы воздействия, при которых происходит гибель клеток, но и надежно разделять механизмы их гибели. Как известно, некроз характеризуется разрушением органелл и плазматической мембраны, что приводит к попаданию внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство и возникновению воспалительных процессов. Апоптоз характеризуется округлением клеток, более плотной упаковкой цитоплазмы и органелл, за которыми следуют интенсивное появление пузырьков на плазматической мембране (блеbbing) и образование отдельных апоптотических тел, которые *in vivo* фагоцитируются макрофагами или соседними нормальными клетками [14, 15].

Дифференциальная диагностика апоптоза или некроза клеток обычно осуществляется путем оценки целостности клеточной мембраны с использованием стандартных флуоресцентных красителей и посредством анализа на конфокальном флуоресцентном микроскопе. Другие подходы основаны на определении морфологических изменений клеток с помощью проточной цитометрии, оптической или электронной микроскопии (ТЕМ) [14]. Однако большинство из используемых методов (ТЕМ-микроскопия, проточная цитометрия) не позволяют оценивать изменения морфологии клеток в динамике, а предоставляют информацию о состоянии клетки в определенный момент времени. Флуоресцентные же методы оперируют со специальными флуоресцентными зондами, которые могут изменять клеточные характеристики.

Оптические методы, основанные на регистрации изменений фазы просвечиваемой клетки излучения, являются невозмущающими и позволяют оценивать изменения клеточной структуры в динамике. Самый старый метод из этой группы — фазово-контрастная микроскопия (ФКМ) по-прежнему широко применяется в исследованиях. Этот метод позволяет получать изображения клеток без какого-либо окрашивания с существенно более высоким контрастом, чем обычная световая микроскопия. Однако количественные оценки клеточной морфологии при использовании ФКМ проблематичны.

Существенно более информативными являются методы количественной фазовой микроскопии (quantitative phase imaging), в частности цифровая голография, которые уже хорошо себя зарекомендовали при исследовании различных процессов на клеточном уровне (см., например, [16–24]). В отличие от методов флуоресцентной микроскопии с использованием красителей цифровая голографическая микроскопия и томография не требуют какой-либо подготовки образцов.

Они позволяют исследовать клетки на основе изменений пространственного распределения показателя преломления, которые содержат в себе количественную информацию о важных клеточных характеристиках и распределениях структурных клеточных элементов, часть из которых невозможно определить, исследуя изменения показателя поглощения. В частности, методами цифровой голографической микроскопии и томографии можно определить форму клеток, их толщину, объем, сухую массу, площадь проекции, площадь поверхности мембраны, двумерное (2D) и трехмерное (3D) распределение показателя преломления [23, 24]. Важным преимуществом этих методов является работа с оригинальными образцами без использования каких-либо дополнительных красителей или химических агентов. Также голографические методы дают возможность проведения наблюдений в динамике в течение длительного времени, вплоть до нескольких часов или даже суток. Основные ограничения данного подхода — его высокая чувствительность к вибрациям оптической установки и использование когерентного излучения, которое приводит к формированию когерентного шума, иногда препятствующему качественному восстановлению фазового распределения.

В наших предыдущих работах [17, 25–27] были проведены исследования реакции клеток постоянных клеточных линий HeLa и A549 на ФДВ с использованием коммерческого фотосенсибилизатора хлоринового ряда Радахлорина. Было показано, что при увеличении дозы облучения последовательно реализуются разные механизмы гибели клеток: апоптоз, вторичный некроз, некроз. При этом при сохранении этой последовательности опухолевые клетки различных нозологических форм демонстрировали существенно разный отклик на ФДВ при одних и тех же дозах облучения светом.

Эти исследования, проведенные на традиционных лабораторных клеточных линиях, позволили перейти к исследованиям на культурах малигнизированных клеток, полученных от конкретных пациентов. В настоящей работе была проанализирована эффективность фотодинамического воздействия на клетки солидных опухолей: рака почки, остеогенной саркомы и меланомы кожи.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор локализаций злокачественных новообразований — рака почки, остеогенной саркомы и меланомы определяется актуальностью поиска новых подходов к лечению этих онкологических заболеваний, отличающихся агрессивным течением, частым рецидивированием и развитием метастатической болезни. Материалом для приготовления клеточных культур служили фрагменты опухолевой ткани, полученные хирургиче-

ским путем у пациентов, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Петрова. После механической дезагрегации тканевых образцов в Медимашине (Dako, Дания) клеточную суспензию пропускали последовательно через систему фильтров Filcon с размером пор 70 и 50 мкм (BD Bioscience, USA), после чего помещали ее в питательную среду DMEM/F12 с 20% телячьей эмбриональной сыворотки, содержащей глутамин (365 мг/л), инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селен (5 нг/мл) (Invitrogen, USA), пенициллин (100 ед./мл), стрептомицин (100 мкг/мл) (Sigma, USA), и непрерывно культивировали в газовой смеси 95% воздуха и 5% CO₂, 100%-ной влажности во флаконах по методу Freshney [28]. После достижения монослоя клетки пересевали, используя раствор, содержащий равные доли (0.25%) трипсина и версена (Биолот, Россия). Культивировали клетки непрерывно не менее 10 пассажей.

На полученных клеточных культурах в экспериментах *in vitro* моделировали процесс фотодинамической терапии. В качестве ФС использовали Радахлорин, фотофизические свойства которого были детально исследованы нами ранее [29–31]. Фотосенсибилизатор в концентрации 12.25 мкг/мл добавляли непосредственно в чашки Петри с исследуемыми культурами клеток в культуральной среде DMEM. Далее клетки инкубировали в этом растворе в течение 2 ч при постоянной температуре 37°C. Накопление ФС в клетках происходило за счет диффузии. По истечении 2 ч заменяли культуральную среду с ФС на чистую. Возбуждение молекул ФС осуществляли при облучении непрерывным лазерным излучением на длине волны 660 нм, соответствующей максимуму длинноволновой полосы поглощения Радахлорина, с плотностью мощности 100 мВт/см² в течение 7 мин.

Исследование морфологических параметров клеток *in vitro* проводили с использованием инвертированного голографического микроскопа, построенного по схеме интерферометра Маха–Цандера, схема которого представлена на рис. 1а. Как показано на этом рисунке, предметный пучок проходит через исследуемые клеточные структуры, которые вносят сдвиг в фазу распространяющейся волны, а интерференционная картина опорного и предметного пучков регистрируется с помощью цифровой камеры. Численная обработка полученной голограммы позволяла получить данные о фазовом набеге, который пропорционален показателю преломления клеточных структур и их толщине. Анализ распределений фазового сдвига волнового фронта позволяет исследовать оптические и морфологические параметры клеток и динамику их изменения.

Как известно, при распространении световой волны из среды с показателем преломления n_1 в

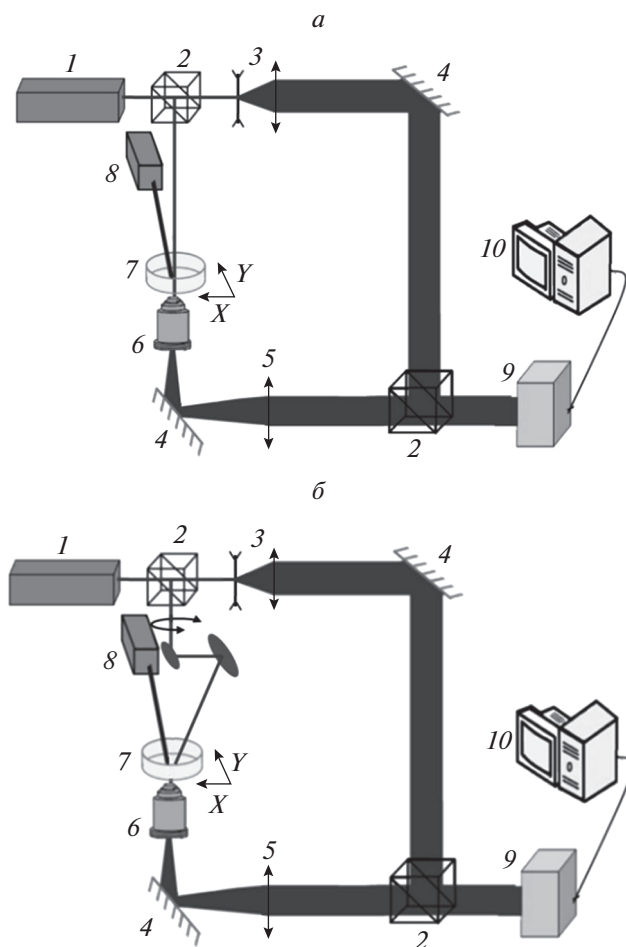


Рис. 1. Оптические схемы цифрового голографического микроскопа (а) и голографического томографического микроскопа (б): 1 – лазер, 2 – делители пучка, 3 – телескопическая система, 4 – зеркала, 5 – линза, 6 – объектив, 7 – образец, 8 – лазер для ФДВ, 9 – цифровая камера, 10 – компьютер.

образце с показателем преломления n_2 и толщиной l фаза волны приобретает сдвиг, равный

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda}(n_1 - n_2)l, \quad (1)$$

где λ – длина волны.

Таким образом, распределение фазы в предметном пучке при прохождении через клеточные структуры изменяется согласно выражению (1). Для численных оценок оптической толщины клеток часто используют величину среднего фазового сдвига $\Delta\varphi$, представляющую собой фазовый сдвиг, усредненный по площади проекции клетки [17, 32]. Как было показано нами ранее [17, 25], этот параметр позволяет судить о механизме гибели клеток и скорости протекания клеточной смерти. Так, при гибели клеток путем некроза, протекающего с разрывом плазматической мембраны и вытеканием внутриклеточной среды на-

ружу, происходит уменьшение толщины и интегрального показателя преломления клетки. Такие клеточные изменения приводят к значительному уменьшению среднего фазового сдвига, причем скорость спада пропорциональна скорости протекания некротических процессов [17]. Апоптоз, наоборот, протекает с увеличением среднего фазового сдвига [25–27].

Анализ среднего фазового сдвига позволяет также судить о динамике изменения сухой массы клеточных структур. Как было показано в работе [33], фазовый сдвиг в живой клетке напрямую зависит от ее сухой массы – массы обезвоженной клетки (DM), которая может быть оценена с помощью следующего выражения:

$$DM = \frac{10\lambda}{2\pi\alpha} \overline{\Delta\phi S_c},$$

где $\alpha = (\mu_p - \mu_s)c/C$, μ_p – показатель преломления белковых компонентов, μ_s – показатель преломления растворителя, C – количество сухой массы белков на 100 мл растворителя, S_c – площадь проекции клетки. Анализируя динамику изменения сухой массы, можно судить о механизме клеточной гибели. Так, некроз протекает с выходом содержимого клетки наружу и, соответственно, с уменьшением сухой массы, а при апоптозе сухая масса клетки не изменяется.

Существенным развитием метода цифровой голографической микроскопии является голографическая томография, позволяющая получать трехмерные распределения показателя преломления клеточных структур и определять такие важные характеристики клеток, как объем, площадь поверхности, площадь проекции и сухая масса. В наших исследованиях использовался голографический томографический микроскоп 3D Cell Explorer (Nanolive), базовая схема которого приведена на рис. 16. Томографический микроскоп представляет собой инвертированный голографический микроскоп, в котором предметный пучок падает под углом к плоскости образца. В ходе эксперимента изменение угла падения происходит с фиксированным шагом, при этом на каждом шаге регистрируется голограмма. Численная обработка массива экспериментальных данных, основанная на трехмерном фурье-преобразовании и теореме о центральном сечении, позволяет получить трехмерное распределение показателя преломления клеток и клеточных структур [34]. На основе полученных распределений показателя преломления реконструируется поверхность клетки и определяются другие ее характеристики.

В наших экспериментах образцы клеточных культур инкубировали в растворе ФС, затем проводили регистрацию контрольных изображений фазового сдвига клеток и трехмерных распределений показателя преломления. После этого осу-

ществляли облучение клеток с последующим наблюдением динамики изменения их характеристик в течение 90 мин на основе серии голограмм и/или голографических томограмм образцов, которые снимали с шагом в 15 мин. Сканирование образцов позволило получить данные по 30–50 клеткам. После обработки полученных голограмм определяли основные характеристики клеток до и после фотодинамического воздействия.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработка экспериментальных данных позволила определить динамику изменения среднего фазового сдвига, сухой массы, средней высоты клетки и распределения показателя преломления в клетках трех нозологических форм опухолей. На рис. 2 представлены статистические данные по среднему фазовому сдвигу в исследуемых клеточных культурах до ФДВ и через 1 ч после него. Сравнение выборок среднего фазового сдвига клеток до и после ФДВ проводили с помощью статистического теста Манна–Уитни с уровнем значимости $p \leq 0.01$. Как видно из рис. 2, средний фазовый сдвиг клеток рака почки и остеосаркомы статистически уменьшается после ФДВ. Различие в фазовом сдвиге для клеток меланомы человека до и через 1 ч после терапии оказалось статистически недостоверным.

Как было сказано ранее, значительное уменьшение среднего фазового сдвига характерно для гибели клеток путем некроза. Таким образом, можно сделать вывод, что в наших экспериментальных условиях клетки рака почки и остеосаркомы гибнут путем некроза. Отсутствие изменений клеток меланомы кожи свидетельствует о большей резистентности этой опухоли к ФДВ.

Более детальные исследования изменения клеток после ФДВ проводились на образцах рака почки. Использование голографического томографического микроскопа позволило отследить динамику изменения распределения показателя преломления, средней высоты и сухой массы клеток рака почки. На рис. 3 представлены z-срезы распределения показателя преломления группы клеток до ФДВ и спустя 15 и 30 мин после него. На этом рисунке хорошо видно образование пузырей на плазматической мембране и вытекание внутриклеточной среды наружу после ФДВ, что характерно для гибели клеток путем некроза.

В ходе эксперимента были получены и усреднены по данным для 30–50 клеток значения сухой массы, реконструированы трехмерные поверхности клеток рака почки и рассчитана средняя высота клеток до и после ФДВ (рис. 4). Как видно, средняя высота и сухая масса клетки уменьшаются в течение 1 ч после ФДВ, что также подтверждает гибель клетки путем некроза, сопровождающегося

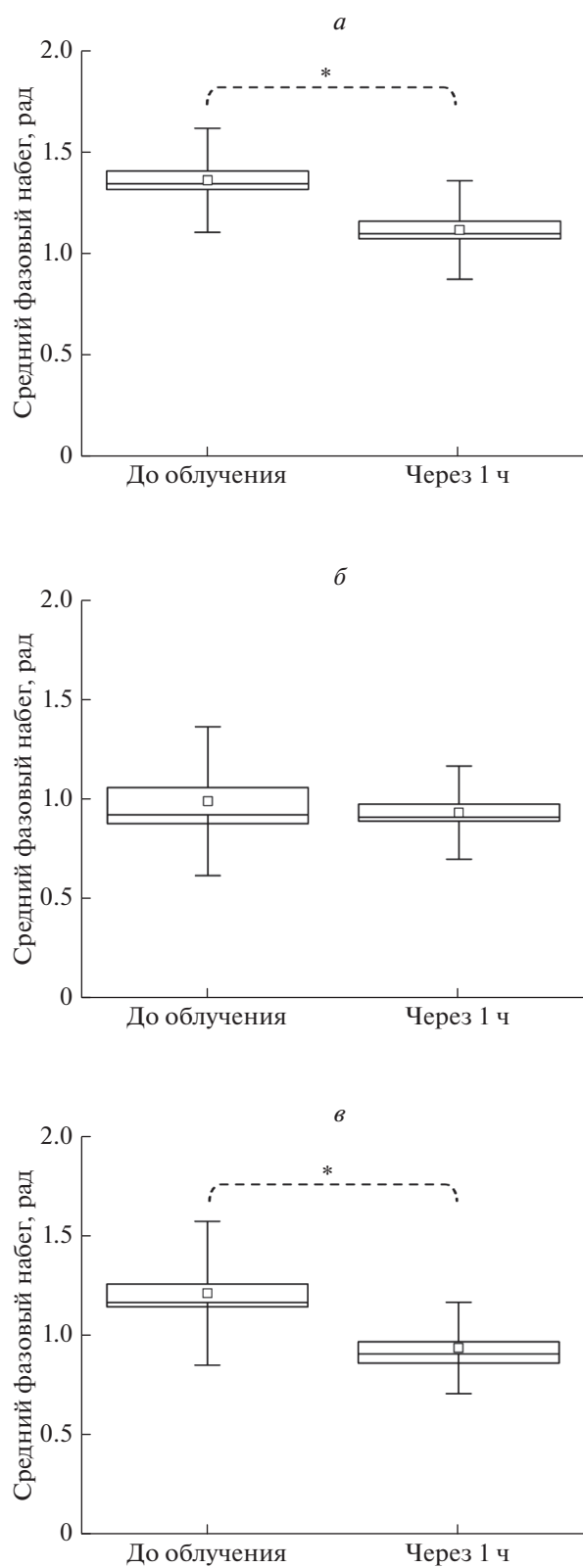


Рис. 2. Графики распределения среднего фазового сдвига до и через 1 ч после ФДВ для клеток: *a* – рака почки, *б* – меланомы кожи, *в* – остеогенной саркомы. Звездочка соответствует доверительной вероятности $< 5\%$.

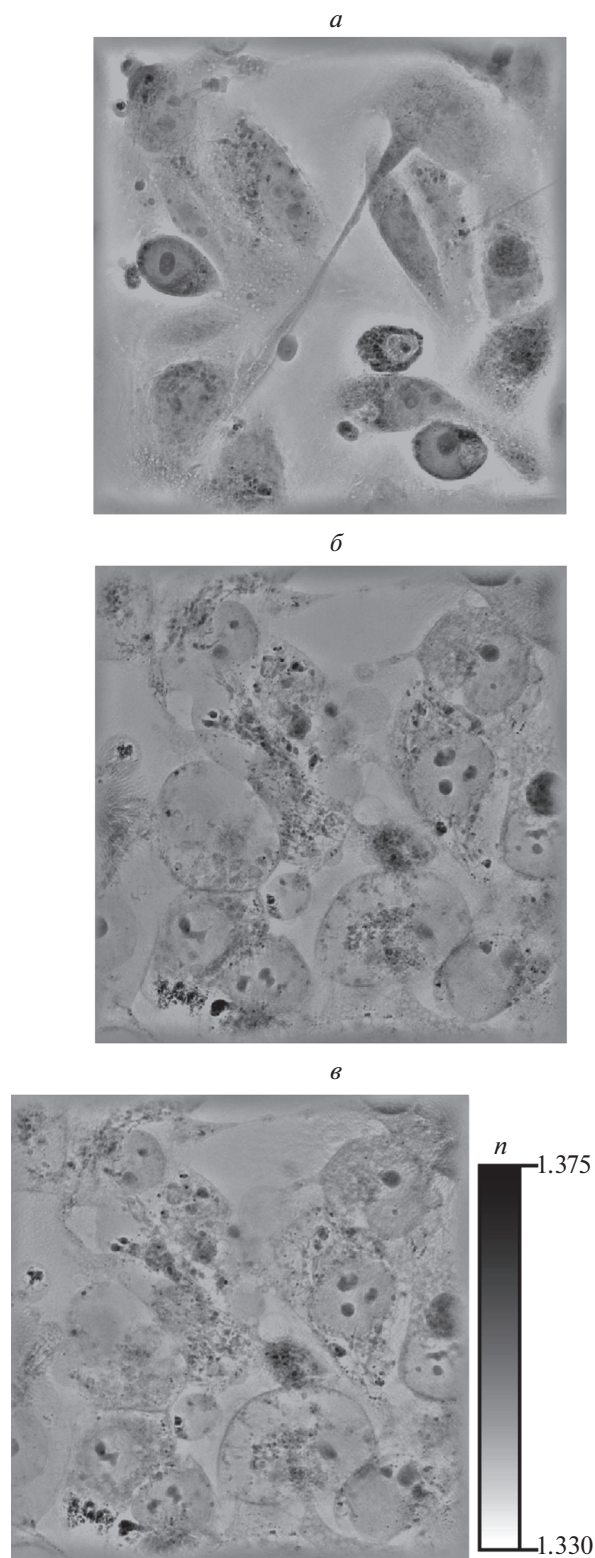


Рис. 3. Распределение показателя преломления n в клетках рака почки: *a* – до ФДВ, *б* – через 15 и *в* – через 30 мин после ФДВ.

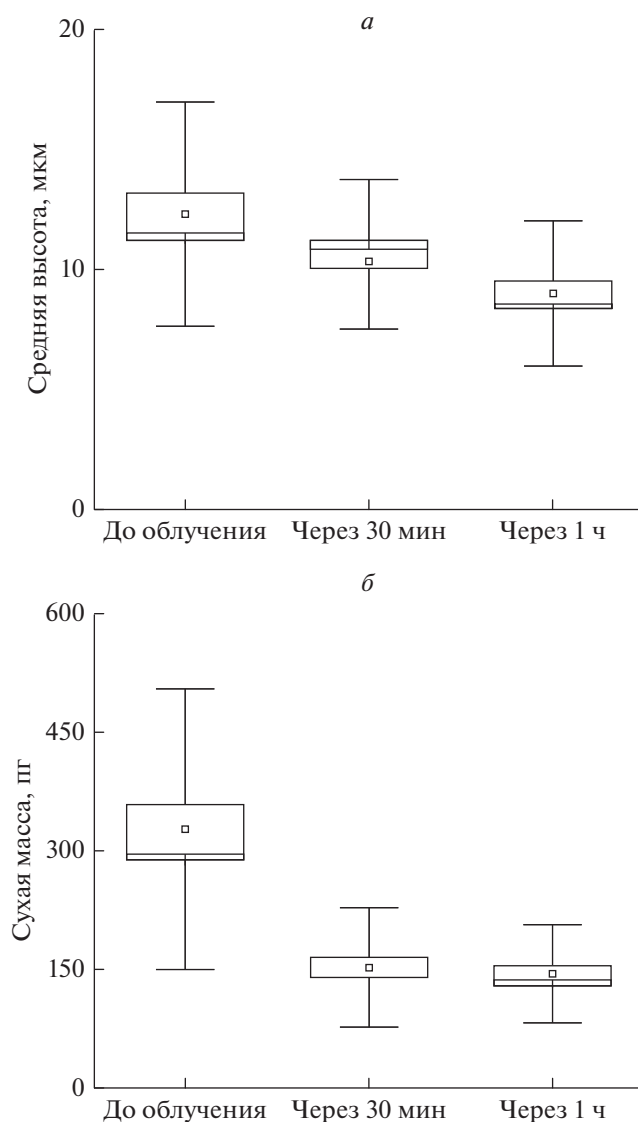


Рис. 4. Средняя высота (а) и сухая масса (б) клеток рака почки до ФДВ, через 30 мин и через 1 ч после ФДВ.

разрывом мембраны и вытеканием внутриклеточной среды в межклеточное пространство.

На рис. 5 представлены огибающие гистограмм распределения показателя преломления n клеток рака почки до ФДВ и через 30 и 60 мин после него. Как видно, распределение показателя преломления клетки сдвигается в сторону уменьшения после ФДВ. Изменение показателя преломления может быть связано с трансформацией внутриклеточных структур и изменением оптических свойств клеток при их гибели путем некроза.

ВЫВОДЫ

Таким образом, показано, что при одинаковой дозе фотодинамического воздействия изменения

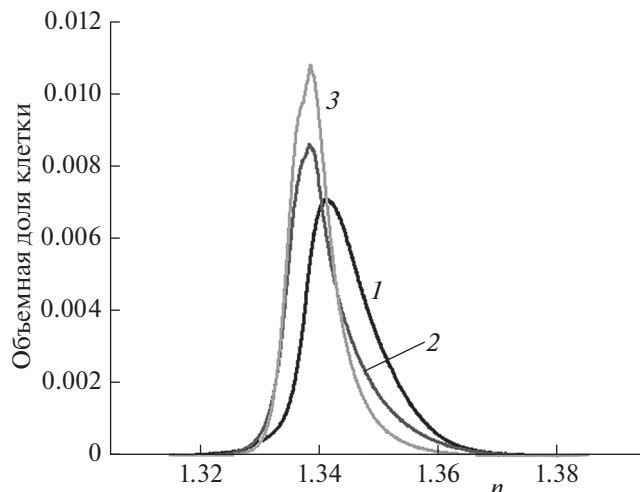


Рис. 5. Огибающие гистограмм распределения показателя преломления n клеток рака почки до ФДВ (1) и через 30 и 60 мин (2 и 3) после него.

среднего фазового сдвига регистрирующего волнового фронта в клетках рака почки, остеогенной саркомы и меланомы существенно различны. При этом уменьшение фазового сдвига в клетках рака почки и остеогенной саркомы статистически доказано, что может ассоциироваться с гибелью клеток посредством некроза. Отсутствие изменений клеток меланомы свидетельствует о большей резистентности этого вида рака к фотодинамической терапии.

Было показано, что использование цифровой голографической микроскопии позволяет оценить эффективность фотодинамического воздействия на клетки злокачественных опухолей человека путем анализа динамики среднего фазового набега. Исследование дополнительных морфологических и оптических параметров клеток рака почки методом голографической томографии показало, что при используемой дозе происходит фотохимически опосредованная гибель опухолевых клеток путем некроза. При этом наблюдалось значительное уменьшение средней высоты клетки и сухой массы, что связано с разрывом мембраны и вытеканием внутриклеточной среды наружу. Зарегистрировано изменение распределений показателя преломления в клетках рака почки при ФДВ.

Полученные результаты и разработанные методики могут быть использованы для анализа резистентности солидных опухолей к ФДТ, а также для подбора доз ФС и доз светового облучения для конкретных пациентов с разными видами рака.

А.В. Белашов и А.А. Жихорева выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку в рамках гранта № 18-32-00364.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Siboni G., Amit-Patito I., Weizman E. et al.* // *Cancer Lett.* 2003. V. 196. № 1. P. 57.
2. *Красновский А.А.* // *Биофизика.* 2004. Т. 49. № 2. С. 305.
3. *Gollnick S.O., Brackett C.M.* // *Immunol. Res.* 2010. V. 46. № 1–3. P. 216.
4. *Foroulis C.N., Thorpe J.A.* // *J. Cardiothorac Surg.* 2006. V. 29. № 1. P. 30.
5. *Gross S.A., Wolfsen H.C.* // *Gastrointest. Endosc. Clinics.* 2010. V. 20. № 1. P. 35.
6. *Гельфонд М.Л., Арсеньев А.И., Барчук А.С.* // *Рос. биотерапевт. журн.* 2004. Т. 3. № 2. С. 49.
7. *Соловьева А.Б., Савко М.А., Глаголев Н.Н. и др.* // *ЖФХ.* 2018. Т. 92. № 8. С. 1351.
8. *Соловьева А.Б., Котова С.Л., Тимашев П.С.* // *ЖФХ.* 2003. Т. 77. № 1. С. 104.
9. *Abrahamse H., Hamblin M.R.* // *Biochem. J.* 2016. V. 473. № 4. P. 347.
10. *Chen Q., Tian S., Zhu J. et al.* // *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2016. V. 16. № 6. P. 763.
11. *Beltukova D.M., Semenova I.V., Smolin A.G. et al.* // *Chem. Phys. Lett.* 2016. V. 662. P. 127.
12. *Jung H.S., Lee J.H., Kim K. et al.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 29. P. 9972.
13. *Hackbarth S., Röder B.* // *Photochem. & Photobiol. Sci.* 2015. V. 14. № 2. P. 329.
14. *Elmore S.* // *Toxicol. Pathol.* 2007. V. 35. № 4. P. 495.
15. *Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H.* // *J. Photochem. and Photobiol., B.* 2009. V. 96. № 1. P. 1.
16. *Lee K., Kim K., Jung J.* // *Sensors.* 2013. V. 13. № 4. P. 4170.
17. *Belashov A.V., Zhikhoreva A.A., Belyaeva T.N. et al.* // *Optics Lett.* 2016. V. 41. № 21. P. 5035.
18. *Belashov A.V., Zhikhoreva A.A., Bepalov V.G. et al.* // *JOSA B.* 2017. V. 34. № 12. P. 2538.
19. *Zhikhoreva A.A., Belashov A.V., Bepalov V.G. et al.* // *Biomed. Optics Express.* 2018. V. 9. № 11. P. 5817.
20. *Mir M., Bhaduri B., Wang R. et al.* // *Progress in Optics.* 2012. V. 57. P. 133.
21. *Marquet P., Depeursinge C., Magistretti P.J.* // *Neuro-photonics.* 2014. V. 1. № 2. P. 020901.
22. *Ban S., Min E., Baek S. et al.* // *Biomed. Optics Express.* 2018. V. 9. № 3. P. 921.
23. *Girshovitz P., Shaked N.T.* // *Ibid.* 2012. V. 3. № 8. P. 1757.
24. *Cao R., Xiao W., Wu X. et al.* // *Ibid.* 2018. V. 9. № 1. P. 72.
25. *Belashov A.V., Zhikhoreva A.A., Belyaeva T.N. et al.* // *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care VI – International Society for Optics and Photonics.* 2018. V. 10685. P. 1068505.
26. *Semenova I.V., Belashov A.V., Belyaeva T.N. et al.* // *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XVI – International Society for Optics and Photonics.* 2018. V. 10497. P. 104970D.
27. *Belashov A.V., Zhikhoreva A.A., Belyaeva T.N. et al.* arXiv preprint arXiv: 1810.12779. 2018.
28. *Freshney R.I.* *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.* N.Y.: John Wiley & Sons, 2015.
29. *Belik V.P., Gadzhiev I.M., Semenova I.V. et al.* // *Spectrochim. Acta, Part A.* 2017. V. 178. P. 181.
30. *Beltukova D.M., Belik V.P., Vasyutinskii O.S. et al.* // *Optics and Spectroscopy.* 2018. V. 124. № 1. P. 49.
31. *Beltukova D.M., Vasyutinskii O.S., Glazov A.L. et al.* // *Optics and Spectroscopy.* 2017. V. 122. № 2. P. 229.
32. *Pavillon N., Kühn J., Moratal C. et al.* // *PLoS ONE.* 2012. V. 7. № 1. P. e30912.
33. *Barer R.* // *Nature.* 1952. V. 169. № 4296. P. 366.
34. *Zhao S.R., Halling H.A.* // *Proc. 1995 IEEE Nuclear Science Sympos. and Medical Imaging Conf. Record.* IEEE, New Jersey, USA, 1995. V. 2. P. 1287.