



ИССЛЕДОВАНИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ И СРЕЗАХ ТКАНЕЙ НА ОСНОВЕ МЕТОДА КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ И РЕКОНСТРУКЦИИ СПЕКТРАЛЬНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

© 1999 г. А. В. Феофанов[#], А. И. Гришин, И. А. Куделина, Л. А. Шитова*,
Т. А. Кармакова*, Р. И. Якубовская*, М. Эгрет-Шарлье**, П. Вини**

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Московский научно-исследовательский институт им. П. А. Герцена, Москва;

** Центр молекулярной биофизики при Орлеанском университете, Орлеан, Франция

Поступила в редакцию 18.03.99 г. Принята к печати 06.07.99 г.

Представлен метод конфокальной микроспектроскопии и реконструкции спектральных изображений (КОМИРСИ), рассмотрены его основные принципы и дан краткий обзор его применения в исследованиях биологически активных соединений (БАС) в живых клетках и в срезах тканей. Метод КОМИРСИ основан на измерении и анализе спектров флуоресценции или резонансного комбинационного рассеяния в каждой точке исследуемого препарата под микроскопом с субмикронным трехмерным пространственным разрешением и применим для изучения окрашенных флуоресцирующих и нефлуоресцирующих соединений. По сравнению с традиционными подходами на основе оптической микроскопии метод КОМИРСИ открывает возможности идентификации комплексов и микроокружения БАС в интактных клетках и в тонких срезах ткани, а также анализа локализации и количественного распределения изучаемых соединений и их комплексов в клеточных органеллах и тканевых структурах. Использование метода КОМИРСИ в комплексе с традиционными биохимическими и цитологическими подходами способно в значительной степени расширить информативность исследований механизмов действия новых БАС.

Ключевые слова: конфокальная микроспектроскопия; спектральные изображения; митоксантрон; сульфопталоцианин алюминия; октакарбокситфалоцианин кобальта.

Изучение новых биологически активных соединений (БАС), как правило, сопровождается циклом исследований, направленных на выяснение локализации, мишеней и механизмов их действия на клеточном уровне. Ряд традиционных подходов к исследованиям этих соединений на клеточном уровне основан на измерении их флуоресценции. Некоторые БАС обладают собственной флуоресценцией. Другие сами не флуоресцируют, и в этом случае их метят с помощью флуорофоров. К традиционным методам, обеспечивающим измерение флуоресцирующих БАС в клетках, относятся флуоресцентная микроскопия [1], лазер-

ная сканирующая конфокальная флуоресцентная микроскопия (ЛСКФМ) [2] и проточная цитометрия [3].

Флуоресцентная микроскопия и ЛСКФМ дают возможность измерить распределение флуоресцентного сигнала исследуемых БАС в отдельных клетках. Эти методы основаны на детекции интенсивности флуоресценции интегральной по полосе пропускания анализирующего широкополосного фильтра. ЛСКФМ позволяет измерить флуоресценцию от тонкого слоя внутри живой клетки, используя конфокальную схему фильтрации сигнала, – флуоресценция от слоев, находящихся выше и ниже исследуемого, блокируется конфокальной системой и на детектор не попадает. Данный подход обеспечивает трехмерное субмикронное пространственное разрешение и, сохраняя основные свойства, присущие флуоресцентной микроскопии, открывает возможности измерения трехмерного распределения и более точного определения локализации БАС в клетке.

Сокращения: КОМИРСИ – метод конфокальной микроспектроскопии и реконструкции спектральных изображений; БАС – биологически активные соединения; МИТО – митоксантрон; топо-2 – ДНК-топоизомераза II; CoRcC₈ – октакарбокситфалоцианин кобальта; РКР – резонансное комбинационное рассеяние.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-64-55; факс: (095) 336-17-66; e-mail: alexei@nmr.ru).

Проточная цитометрия, основанная на измерении флуоресцентного сигнала, введенного в клетки соединения и светорассеяния клеток, обеспечивает статистически достоверный анализ на популяции клеток.

Сравнительно недавно появившийся метод конфокальной микроспектроскопии и реконструкции спектральных изображений (КОМИРСИ) позволяет идентифицировать молекулярные комплексы и микроокружение изучаемых молекул, измерить количественное распределение этих комплексов и состояний в живых клетках, что существенно расширяет возможности исследования БАС по сравнению с традиционными методами оптической микроскопии [4–10].

Цель данной работы – дать краткий обзор перспективных приложений метода КОМИРСИ и на примере некоторых БАС рассмотреть особенности метода и его возможности в исследованиях на клеточном и тканевом уровнях.

Принцип метода КОМИРСИ. В основе метода КОМИРСИ лежит детальное исследование изменений спектральных характеристик, отражающих состояние БАС в составе молекулярных комплексов и различном микроокружении, с последующей идентификацией этих состояний и комплексов в клетках и срезах тканей.

Спектры измеряются с помощью сканирующего конфокального микроспектрометра [7, 11] в каждой точке исследуемой клетки с трехмерным пространственным разрешением. Идентификация внутриклеточных взаимодействий основывается на сравнительном анализе клеточных спектров и спектров, измеренных в *in vitro* – экспериментах, моделирующих образование молекулярных комплексов изучаемого соединения и влияние микроокружения. По результатам модельных исследований определяется оптимальный набор спектров сравнения, наиболее точно описывающий реализующиеся в клетке состояния и взаимодействия исследуемой молекулы. Затем полный двумерный набор клеточных спектров представляется как линейная комбинация спектров сравнения [4, 7, 9, 10]. Коэффициенты разложения описывают для каждой точки клетки состояние исследуемого соединения и присутствие его различных комплексов. Карты распределения по клетке этих состояний и комплексов, называемые спектральными изображениями, характеризуют накопление, микроокружение и взаимодействия изучаемого соединения в различных клеточных доменах и структурах. Положение каждой точки спектрального изображения однозначно соответствует определенной точке на микрофотографии клетки, что облегчает анализ локализации изучаемого соединения в конкретных клеточных структурах.

Следует отметить, что аналогичным образом метод КОМИРСИ может быть использован для исследования БАС в тонких криостатных срезах тканей. Тем самым метод предоставляет уникальную возможность прямого сравнительного анализа молекулярных взаимодействий изучаемого соединения в растворах, клетках и тканях.

Экспериментальные особенности метода КОМИРСИ. На практике для построения спектральных изображений от клетки записывают 40×40 , 50×50 или 60×60 спектров, что требует от 2 до 20 мин в зависимости от концентрации исследуемого соединения в клетке и его флуоресцентных свойств. Спектры флуоресценции измеряют с разрешением 0.5 нм, что обеспечивает надежный спектральный анализ. Использование 100-кратного маслоиммерсионного или водоиммерсионного объектива с большой численной апертурой и конфокальной системы позволяет добиться пространственного разрешения около 0.5 мкм в плоскости объекта и около 1 мкм в направлении оптической оси объектива. В предельном случае каждый спектр записывается от объема 0.2 мкм³, но в реальных экспериментах пространственное разрешение варьируется от 0.5 до 2 мкм³.

Конфокальный сканирующий микроспектрометр обеспечивает возможность изучения БАС в растворах, клетках и срезах тканей. Для проведения измерений под микроскопом требуется около 40 мкл раствора, что почти в 20 раз меньше, чем в случае обычного спектрофлуориметра. Высокая чувствительность микроспектрометра – дополнительный фактор, облегчающий флуоресцентный анализ соединений и комплексов, доступных в ограниченных количествах.

Исследования методом КОМИРСИ могут проводиться на живых или фиксированных клетках. Для экспериментов подходят клетки, растущие как в суспензии, так и в монослое. Необходимо учитывать, что в мелких клетках с характерными размерами менее 8 мкм решение ряда задач, связанных с исследованием локализации БАС в цитоплазматических структурах, значительно затруднено.

На уровне тканей наиболее подходящим объектом для изучения методом КОМИРСИ являются криостатные срезы. Следует учитывать, что обработка тканей фиксирующими агентами, а также гистохимическими красителями может приводить к резкому снижению сигнала и искажению реального распределения изучаемого соединения в результате его вымывания из тканевых структур, агрегации и химической модификации. Поэтому стандартные процедуры фиксации и окрашивания, необходимые для идентификации тканевых структур, выполняются после микроспектральных измерений.

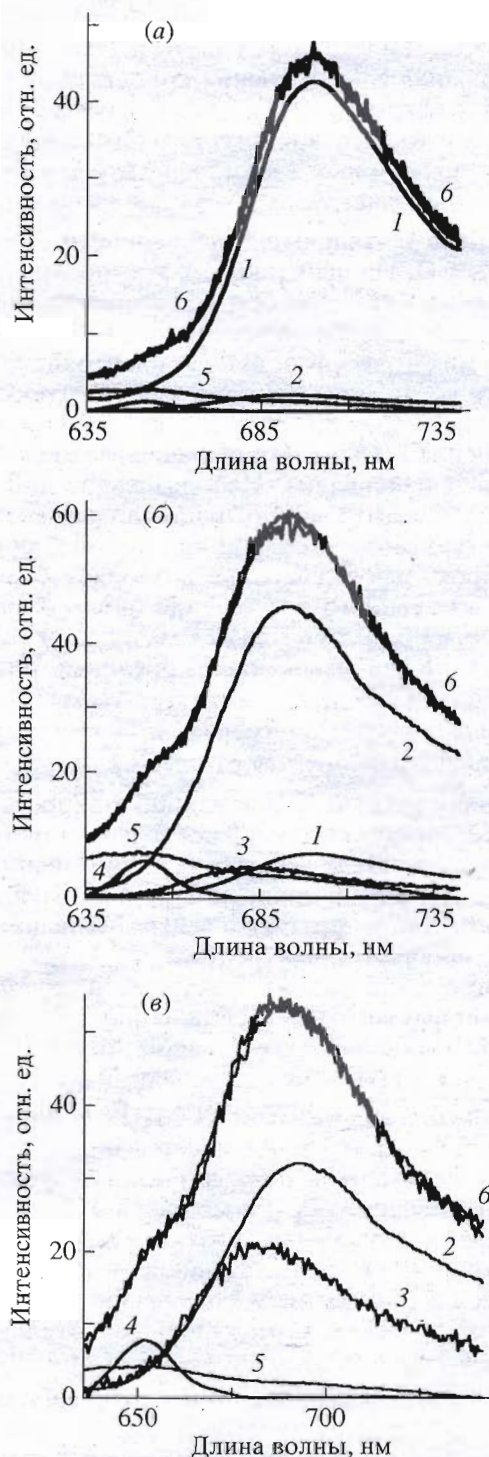
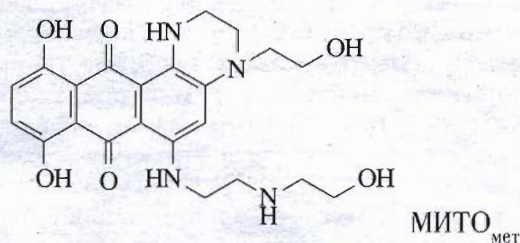
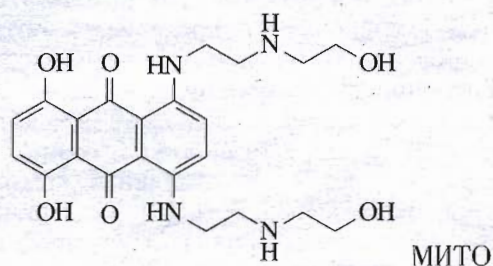


Рис. 1. Анализ внутриклеточных спектров МИТО с использованием метода КОМИРСИ.

Примеры представления спектров МИТО, измеренных в ядре (а) и в разных областях цитоплазмы (б, в) живой клетки K562, в виде линейной комбинации модельных спектров сравнения, описывающих МИТО_{НК} (1), МИТО_{фоб} (2), МИТО_{моно} (3), МИТО_{мет} (4) и собственную клеточную флуоресценцию (5). Перекрывающиеся спектры (б) показывают степень совпадения экспериментальных и расчетных спектров. Интенсивности модельных спектров (1–5) соответствуют их вкладу в расчетные спектры.

Исследование противоопухолевого препарата митоксантрона в клетках K562. Методом КОМИРСИ исследованы накопление, распределение и молекулярные взаимодействия митоксантрона (МИТО), эффективного противоопухолевого препарата, в эритроидных лейкозных клетках человека K562 [4, 9, 10].

В основе анализа МИТО в клетках лежат детальные модельные эксперименты по изучению влияния на спектры флуоресценции МИТО взаимодействий с молекулярными мишенями (ДНК, РНК, ДНК-топоизомераза II (топо-2), комплекс ДНК-топо-2, некоторые другие белки), концентрационно-зависимой агрегации, кислотности среды, гидрофобности микроокружения [9]. С использованием процедуры математического моделирования спектров, измеренных от внутриклеточного МИТО (рис. 1), показано, что метод КОМИРСИ позволяет идентифицировать и изучать в живых клетках следующие состояния и комплексы МИТО: МИТО_{моно} – свободный или связанный через аминоалкиламинные боковые цепи с молекулами клетки мономерный МИТО, находящийся в полярном внутриклеточном окружении; МИТО_{фоб} – МИТО, связанный с гидрофобными клеточными структурами; МИТО_{НК} – три типа комплексов с нуклеиновыми кислотами, которые дают идентичные спектры флуоресценции: МИТО–ДНК, тройные комплексы МИТО–ДНК–топо-2 и комплексы двуцепочечная РНК–МИТО; МИТО_{мет} – нафтохиноксалиновый метаболит МИТО, образующийся в результате окислительного действия клеточных ферментов и связанный с акцепторными группами молекул клетки (рис. 1).



Структуры МИТО и его нафтохиноксалинового метаболита МИТО_{мет}.

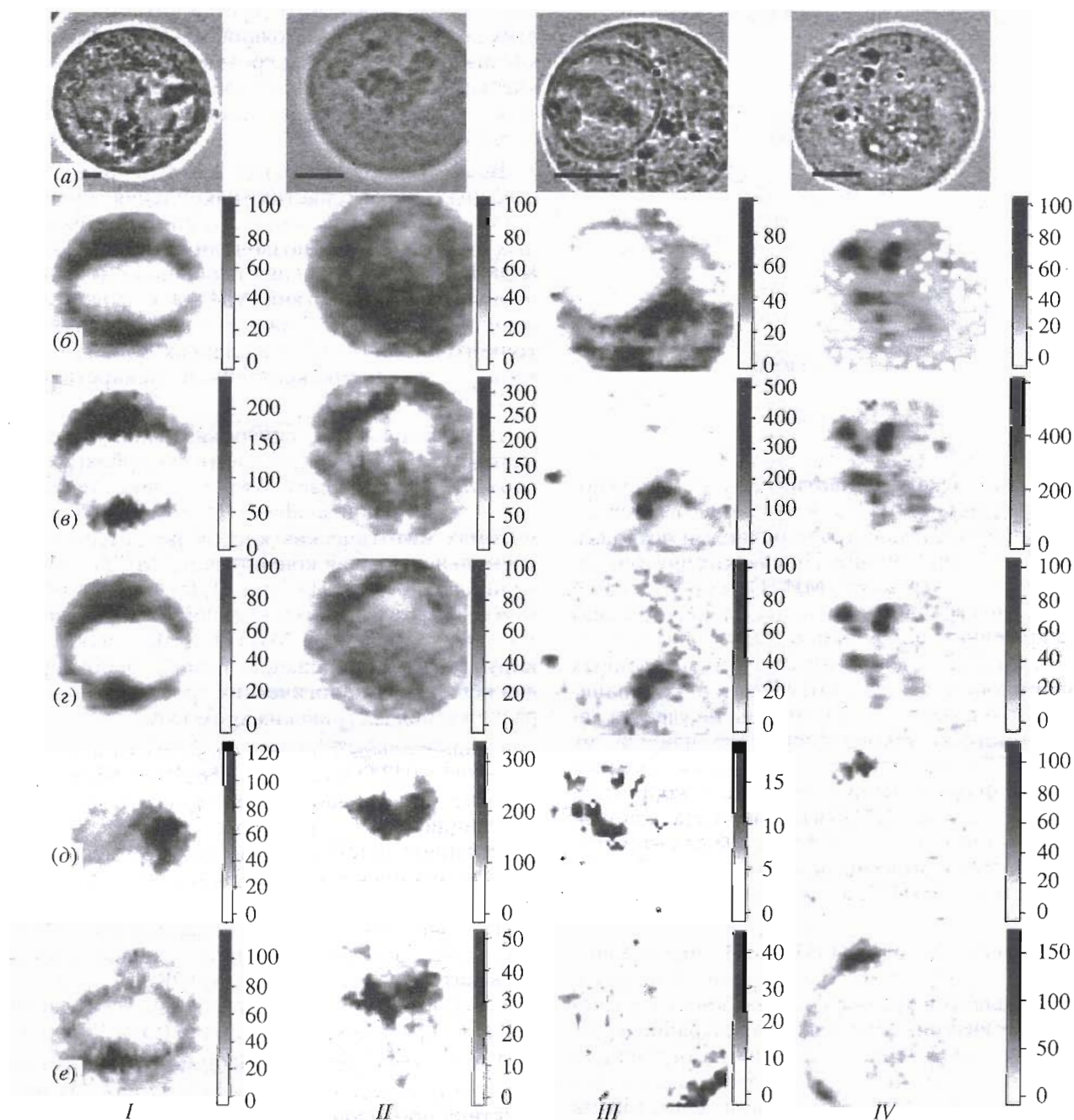
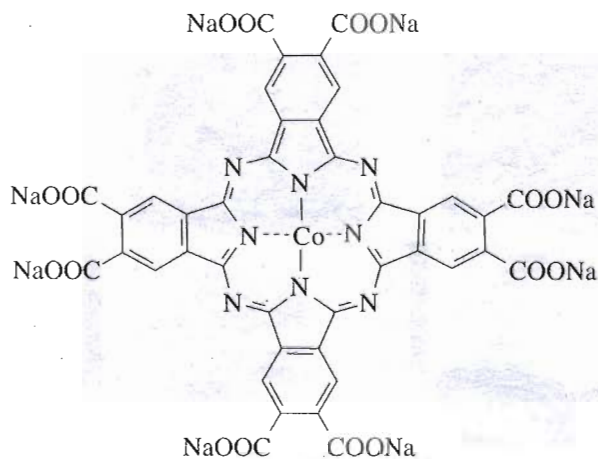


Рис. 2. Исследование локализации МИТО в живых клетках K562 (I, II) и в клетках K562R с множественной лекарственной устойчивостью (III, IV) с помощью метода КОМИРСИ. (а) – микрофотографии клеток (метка – 5 мкм). Распределение в клетках собственной клеточной флуоресценции (б), МИТО_{моно} (в), МИТО_{мет} (г), МИТО_{НК} (д) и МИТО_{Фоб} (е). Шкалы в, д, е – мкМ; шкалы б, г – относительные единицы. Спектральные изображения живых клеток K562 (I, II) и клеток K562R с множественной лекарственной устойчивостью (III, IV). Клетки инкубировали с 10 мкМ/л МИТО в течение 1 ч. В колонках II и IV представлены митотические клетки.

Одновременно метод КОМИРСИ позволяет идентифицировать в клетках области локализации клеточных порфиринов, которые определяют собственную флуоресценцию клетки в красном диапазоне спектра.

Модельные эксперименты выявили, что в гидрофобном окружении происходит двукратное усиление флуоресценции, а при образовании комплексов с нуклеиновыми кислотами – почти двукратное тушение флуоресценции МИТО, что

Структура CoPcC₈.

значительно искажает картину внутриклеточного распределения МИТО, измеренную на основе интегрального сигнала традиционными методами оптической микроскопии. При низких внутриклеточных концентрациях МИТО существенный вклад в интегральный сигнал дает флуоресценция эндогенных порфиринов. Спектры флуоресценции МИТО, его комплексов и эндогенных порфиринов перекрываются настолько значительно, что разделить эти сигналы не удастся даже с помощью узкополосных анализирующих фильтров. Таким образом, только анализ полных спектров флуоресценции позволяет корректно описать состояние МИТО в каждой точке клетки, учесть влияние различных факторов на интенсивность спектров эмиссии, и установить реальное распределение МИТО, а также его комплексов в клетках (рис. 2).

На основе метода КОМИРСИ предложены методики определения концентрации препарата и его комплексов в разных отделах клетки, расчета средних внутриклеточных концентраций и статистически достоверного анализа на ограниченной выборке клеток [10]. Для этого в условиях полностью идентичных условиям регистрации спектральных изображений измеряется калибровочная зависимость интенсивности сигнала исследуемого соединения от концентрации в растворе, вводятся коэффициенты, учитывающие изменение интенсивности сигнала препарата в различных комплексах и состояниях.

В случае МИТО с применением измеренных калибровочных зависимостей рассчитаны двумерные карты (спектральные изображения) количественного распределения МИТО_{моно}, МИТО_{фоб} и МИТО_{нк} в клетках, а также карты относительно распределения МИТО_{мет} метаболита и собственной клеточной флуоресценции (рис. 2). На основе анализа спектральных изображений охарак-

теризованы области гетерогенного накопления этих комплексов и состояний МИТО в отдельных клетках, рассчитаны их средние концентрации по клетке, в цитоплазматической области, в ядре (для митотических клеток в хромосомах) и нуклеолах [10].

Возможности измерения и сравнения количественных характеристик накопления противоопухолевого соединения и его комплексов в разных отделах клеток позволили применить метод КОМИРСИ для изучения особенностей молекулярных взаимодействий МИТО в синхронизированных клетках K562 на различных стадиях клеточного цикла [8, 12] и в клетках K562R, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью [13].

В исследованиях синхронизированных клеток методом КОМИРСИ, в частности, обнаружено, что МИТО вызывает блокирование митоза в клетках на стадии анафазы. Показано, что в хромосомах митотических клеток реализуется экстремально высокая концентрация МИТО, интеркалированного в ДНК (рис. 2, II), и это, по-видимому, ведет к эффективному образованию тройных комплексов МИТО-ДНК-топо-2, блокируя функционирование топо-2, необходимое для решения топологических проблем в процессе расхождения сестринских хромосом.

Сравнительный анализ накопления и взаимодействий МИТО в клетках K562R и K562 выявил на фоне общего снижения внутриклеточной концентрации МИТО в клетках с множественной лекарственной устойчивостью резкое уменьшение связывания препарата с ДНК и с гидрофобными клеточными структурами, а также изменение областей внутриклеточной локализации МИТО (рис. 2, III, IV). Эти особенности сохраняются также в митотических клетках K562R, где несмотря на отсутствие ядерной мембраны связывание МИТО в хромосомах очень мало (рис. 2, IV).

Таким образом, метод КОМИРСИ на основе анализа распределения и молекулярных взаимодействий противоопухолевых соединений в клетках дает возможность получать дополнительную информацию о механизмах их цитотоксического действия, а также изучать клеточные механизмы реализации феномена множественной лекарственной устойчивости.

Исследование локализации нефлуоресцирующего октакарбоксифталоцианина кобальта в клетках. Возможность измерения спектров с высоким разрешением позволяет применять метод КОМИРСИ для исследования нефлуоресцирующих соединений, при условии, что они имеют интенсивное электронное поглощение в видимой области. В этом случае с использованием эффекта резонансного комбинационного рассеяния (РКР)

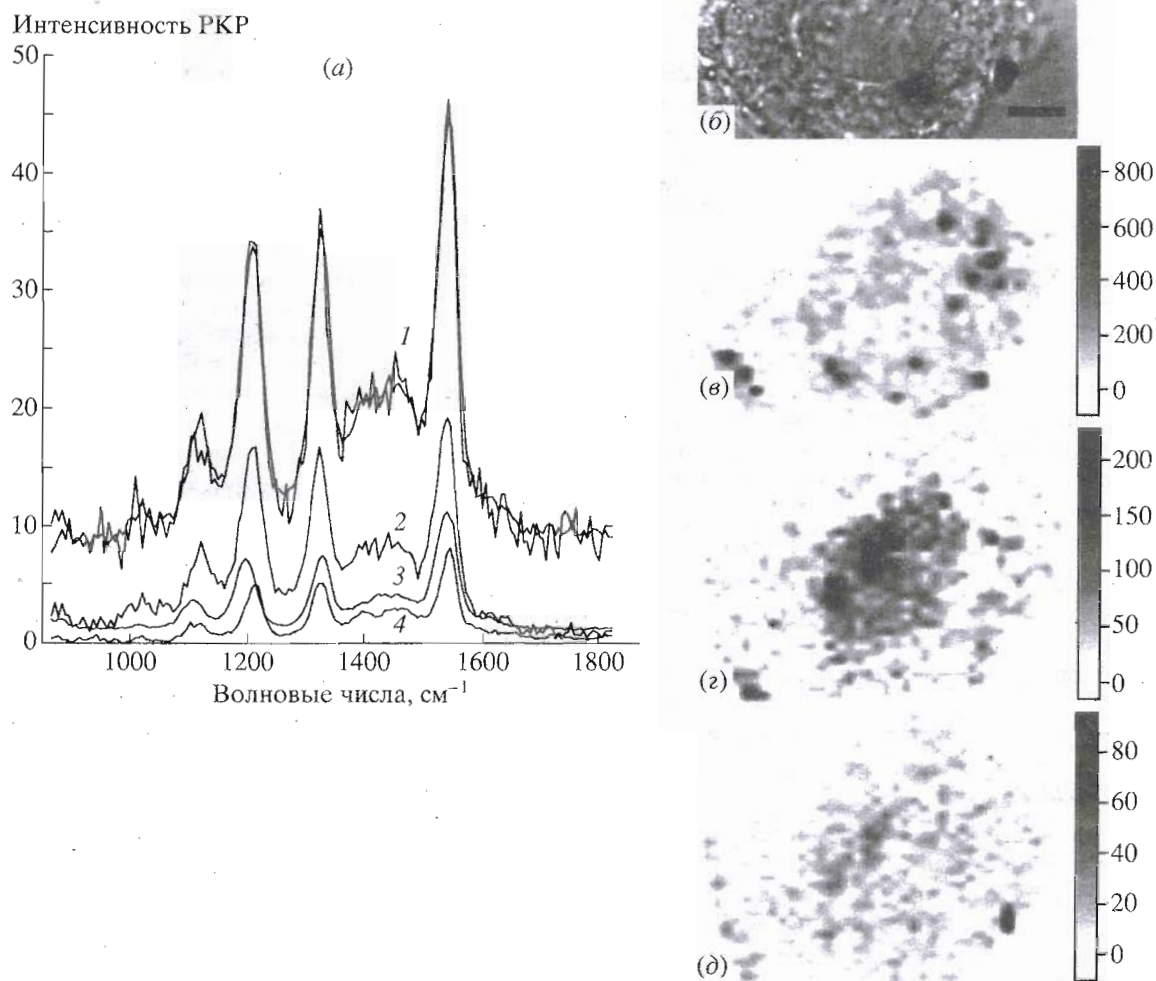


Рис. 3. Исследование локализации CoPcS_8 в живых клетках аденокарциномы легкого человека A549 с помощью метода КОМИРСИ на основе эффекта РКР. (а) – пример разложения внутриклеточного РКР-спектра CoPcS_8 (1) на линейную комбинацию модельных спектров сравнения, описывающих мономерный CoPcS_8 (2), агрегированный CoPcS_8 (3) и комплексы CoPcS_8 с белками (4). Перекрывающиеся экспериментальный (1) и расчетный спектры позволяют оценить точность анализа. Относительные интенсивности модельных спектров (2–4) соответствуют их вкладу в расчетный спектр. (б) – микрофотография клетки (метка – 5 мкм). Распределения в клетке мономерного CoPcS_8 (в), комплексов CoPcS_8 с белками (г) и агрегированного CoPcS_8 (д). Шкалы в, г – мкг/мл; шкала д – относительные единицы. Клетки инкубировали с 400 мкг/мл CoPcS_8 в течение 3 ч.

регистрируются внутриклеточные колебательные спектры изучаемой молекулы.

Метод КОМИРСИ на основе спектроскопии РКР был применен для исследования октакарбоксифталоцианина кобальта (CoPcS_8) – каталитического компонента нового класса цитостатиков – бинарных систем [14]. Биологическое действие подобных соединений в настоящее время практически не изучено. Первоначально исследования

внутриклеточной локализации CoPcS_8 проводились на фиксированных клетках A549 аденокарциномы легкого человека [15, 16]. Последующие эксперименты позволили уточнить локализацию, концентрацию и охарактеризовать взаимодействия CoPcS_8 в живых клетках (рис. 3).

На основе модельных экспериментов по спектрам РКР в клетках идентифицированы мономерный свободный CoPcS_8 , агрегированный

СоРсС₈ и СоРсС₈, связанный с белками клетки, и изучено их внутриклеточное распределение. При коротких временах (менее 1–2 часов) инкубации клеток с препаратом обнаружено диффузное распределение СоРсС₈ в цитоплазме и доминирующее накопление его в ядре. Присутствие в цитоплазме мелких включений размером от 1 до 3 мкм, в которых концентрация СоРсС₈ возрастает по мере увеличения времени инкубации клеток, потребовало идентификации этих клеточных органелл (рис. 3).

Если плазматическая и ядерная мембраны, цитоплазматическая область, ядро, нуклеоли распознаются визуально, то для наблюдения цитоплазматических органелл (аппарат Гольджи, митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум) необходимо введение селективных флуоресцентных проб. С использованием акридинового оранжевого, избирательно окрашивающего лизосомы в красный цвет, по совпадению областей локализации обоих соединений доказано усиление лизосомального накопления СоРсС₈ при длительных временах инкубации клеток с препаратом.

Таким образом, измерение спектральных изображений изучаемого соединения в присутствии селективных меток, позволяет проводить прямую идентификацию органелл, преимущественно накапливающих препарат. Это в свою очередь открывает возможность использовать метод КОМИРСИ для исследования путей транспорта БАС в клетках.

Исследование фотосенса в растворах, живых клетках и тканях. В настоящее время методом КОМИРСИ ведутся широкие исследования БАС, предназначенных для фотодинамической терапии рака. Фотодинамическая терапия, как метод лечения злокачественных новообразований, получила активное развитие сравнительно недавно, в связи с чем в этой области существует ряд проблем, связанных с изучением механизмов действия используемых и новых препаратов. В частности, для оптимизации режима фотодинамического воздействия, необходимо знать, при каких условиях достигается максимальное внутриклеточное накопление фотосенсибилизатора, как долго препарат удерживается в клетках, какие клеточные органеллы служат мишенями для реализации фототоксического эффекта.

Фотосенс – новый фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии рака на основе смеси ди-, три- и тетрасульфатированных фталоцианинов алюминия [17]. Изучение клеточного транспорта фотосенса с помощью метода КОМИРСИ [16] показало, что проникновение препарата в опухолевые клетки человека в культуре происходит за время менее 1 мин (данные не показаны). Уже через 10 мин инкубации формируется харак-

терная картина его относительного распределения в клетках. В течение первых 30 мин инкубации внутриклеточная концентрация фотосенса быстро увеличивается, выходит на насыщение (10–20% от концентрации фотосенса в среде) и в последующие несколько часов возрастает очень слабо. На всех стадиях инкубации фотосенс локализован как в цитоплазме, так и в ядре (см., например, рис. 4). Выведение препарата из клеток происходит медленно. Значительная доля фотосенса удерживается в цитоплазме и, в меньшей степени, в ядрах клеток в течение не менее 29 часов после удаления его из внешней среды.

Фотосенс – многокомпонентный препарат, и максимумы спектров флуоресценции его составляющих отличаются всего на несколько нанометров. Тем не менее, на основе результатов модельных экспериментов в растворах и анализа на клеточном уровне индивидуальных компонентов препарата с помощью метода КОМИРСИ удалось количественно охарактеризовать поведение ди-, три- и тетрасульфатированных производных фталоцианина алюминия в составе фотосенса в клетках (рис. 4). Показано, что дисульфатированный компонент и большая часть трисульфатированного производного в цитоплазме находятся в свободном состоянии. Часть трисульфатированного и большая доля тетрасульфатированного компонентов в цитоплазме связаны с белками и мембранными структурами. В ядре практически весь фотосенс связан с белками. Обнаружено, что уровень накопления в клетке и распределение в клеточных структурах зависят от степени сульфатирования молекулы. При увеличении числа заряженных групп снижается способность фталоцианина алюминия проникать в клетку, но возрастает тенденция накапливаться в ядре.

С помощью метода КОМИРСИ с применением селективных меток клеточных органелл в настоящее время ведутся исследования по идентификации компартментов преимущественного накопления фотосенса на разных этапах клеточного транспорта и анализ мишеней фотодинамического воздействия препарата. По предварительным данным, облучение клеток в присутствии фотосенса приводит к разрушению лизосом и подавлению митохондриальной активности, при этом повреждение плазматической мембраны не происходит.

Методом КОМИРСИ нами проводится изучение распределения фотосенса в тканях животных после внутривенного введения препарата. Данный подход позволяет оценить биологическое распределение препарата в различных структурах ткани и предположить основные механизмы патоморфоза злокачественных новообразований при фотодинамической терапии.

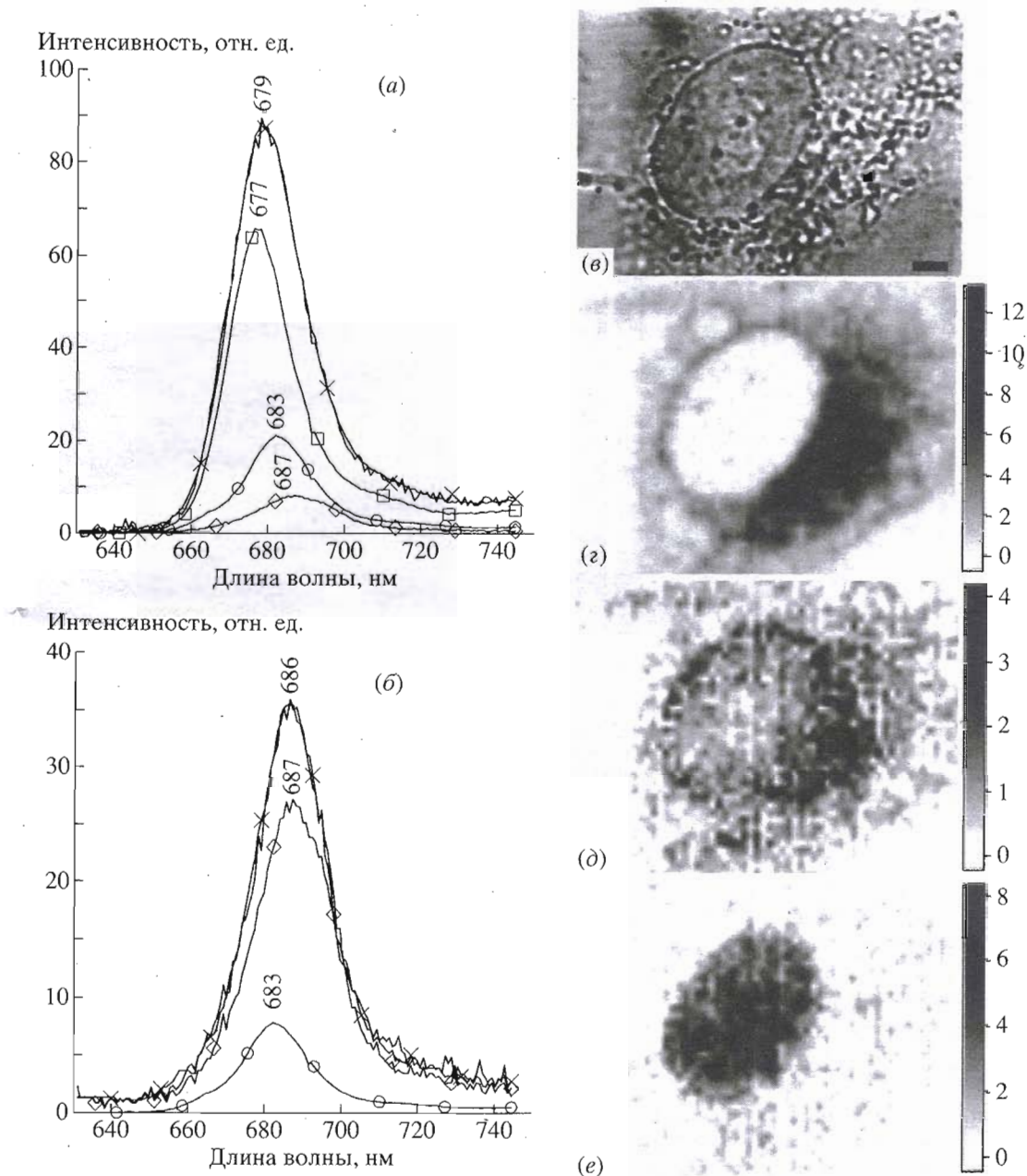


Рис. 4. Исследование локализации фотосенса в живых клетках аденокарциномы легкого человека A549 с помощью метода КОМИРСИ. (а, б) – примеры представления спектров флуоресценции фотосенса, измеренных в цитоплазме (а) и в ядре (б) живой клетки аденокарциномы легкого человека A549, в виде линейной комбинации модельных спектров сравнения. Квадратами, кружками и ромбами обозначены модельные спектры свободного дисульфатированного компонента, свободного трисульфатированного компонента и связанного фотосенса, соответственно. Крестиками обозначены перекрывающиеся экспериментальный и расчетный спектры. Относительные интенсивности модельных спектров соответствуют их вкладу в расчетный спектр. (в) – микрофотография клетки (метка – 5 мкм). Распределения в клетке свободного дисульфатированного компонента (г), свободного трисульфатированного компонента (д) и связанного фотосенса (е). Шкалы г–е – мкг/мл. Клетки инкубировали с 20 мкг/мл фотосенса в течение 1 ч.

При исследовании криостатных срезов тканей перевивной опухоли Эрлиха мышей, обнаружено, что фотосенс преимущественно накапливается в окружающей опухоль соединительной ткани, где его содержание в несколько раз выше, чем в опу-

холевых клетках (рис. 5). При этом исключительно высокой степенью накопления отличаются клетки макрофагально-моноцитарной природы. По сравнению с соединительной тканью в стенках сосудов фотосенс присутствует в меньших ко-

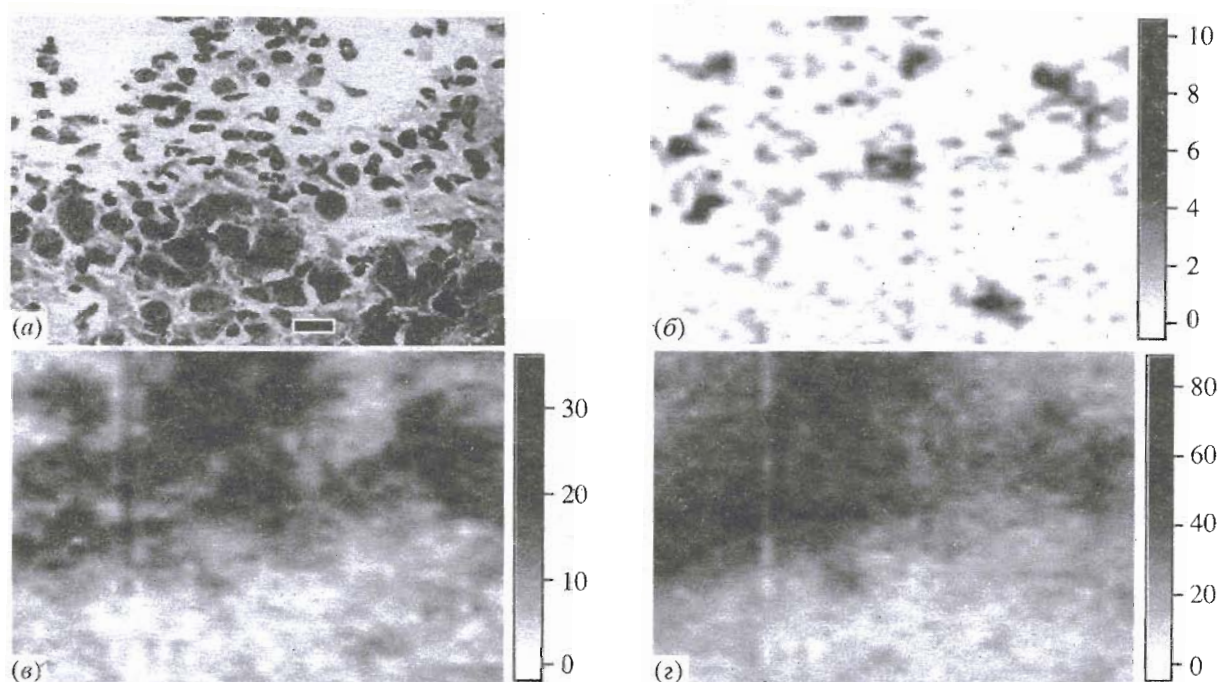


Рис. 5. Исследование локализации фотосенса в срезе ткани перевивной подкожной опухоли Эрлиха мыши с помощью метода КОМИРСИ. (а) – микрофотография среза, окрашенного гематоксилином и эозином, в области границы трансплантата и окружающей подкожной клетчатки (метка – 20 мкм). В нижней половине фотографии – опухолевые клетки, в верхней половине – рыхлая соединительная ткань с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. (б–з) – распределения в ткани свободного дисульфатированного компонента (б), свободного трисульфатированного компонента (в) и связанного фотосенса (з). Шкалы интенсивности отражают относительную концентрацию соответствующего компонента в ткани. Срез ткани получен через 24 ч после внутривенного введения препарата в дозе 5 мг/кг веса животного.

личествах. Эти результаты позволяют предположить, что противоопухолевый фотодинамический эффект при использовании фотосенса в качестве фотосенсибилизатора, будет обусловлен на данной биологической модели, в первую очередь, повреждением соединительной ткани, в которой локализованы структуры, обеспечивающие питание опухолевых клеток. Значительное накопление фотосенса также выявлено в коже (эпидермисе), что согласуется с известным феноменом кожной фототоксичности препарата.

Обнаружено, что накопление фотосенса в опухолевых клетках зависит от типа злокачественного образования у животных. Так, в отличие от опухоли Эрлиха, которая имеет эпителиальное происхождение, в индуцированной метилхолантеном саркоме, опухоли мезенхимального генеза, содержание фотосенса немного больше, чем в окружающей опухоль соединительной ткани.

С использованием описанных выше результатов экспериментов по изучению молекулярных взаимодействий фотосенса в растворах и их проявлению в спектрах флуоресценции методом КОМИРСИ обнаружено, что в тканевых структурах, как и в культуре клеток, доминирующая

часть препарата связана с мембранами и белками (рис. 5). Дисульфатированный компонент находится в тканях преимущественно в свободном состоянии, часть трисульфатированного и практически весь тетрасульфатированный фталоцианин алюминия – в виде комплексов.

Таким образом, метод КОМИРСИ позволяет расширить исследования БАС до тканевого уровня и проследить сохраняются ли особенности молекулярных взаимодействий, выявленные в клеточной культуре, на более высоком уровне структурной организации. Совместно с анализом распределения БАС в тканях такой подход должен способствовать выяснению и уточнению механизмов действия исследуемых соединений в живых организмах. Отметим, что многие новые БАС, предлагаемые к внедрению в медико-биологическую практику, обязательно проходят цикл доклинических исследований, одним из этапов которых является изучение фармакодинамики и распределения препарата в тканях и органах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе рассмотрены некоторые приложения метода КОМИРСИ к исследованию флуорес-

цирующих БАС. Показано, что анализ внутриклеточных спектров флуоресценции позволяет охарактеризовать микроокружение и взаимодействия исследуемых соединений, имеющие прямое отношение к их функциональной активности. Данный анализ проводится в каждой точке клетки, что позволяет выявить полную картину состояний и взаимодействий БАС в живых клетках. Внутриклеточные концентрации изучаемых молекул определяются по интенсивности флуоресценции с учетом тушения/усиления сигнала, вызываемого образованием комплексов и влиянием других факторов. Это увеличивает точность измерений по сравнению с обычными методами оптической микроскопии и дает возможность установить реальное количественное распределение соединения и его комплексов в клеточных структурах, изучить кинетические особенности их накопления и удержания в клетках. Очевидно, что применение метода КОМИРСИ наиболее эффективно в комбинации с традиционными биохимическими и цитологическими методами анализа на основе сопоставления и уточнения полученных разными методами результатов. Следует отметить универсальность метода КОМИРСИ, который при необходимости позволяет расширить исследования БАС и провести их как на клетках, так и на срезах тканей с сохранением всех преимуществ спектрального анализа.

Для некоторых нефлуоресцирующих молекул, если они имеют интенсивное поглощение в видимой области, метод КОМИРСИ может быть реализован на основе спектроскопии РКР. В более общем случае для наблюдения нефлуоресцирующих молекул требуется введение флуоресцентной метки. Предполагается, что анализ характеристичных изменений в спектрах флуоресценции некоторых меток позволит получать дополнительную информацию о микроокружении и взаимодействиях меченых БАС в клетках. В настоящее время ведется поиск таких меток и изучаются возможности метода КОМИРСИ применительно к исследованию флуоресцентномеченых БАС.

Разработка метода КОМИРСИ и исследования митоксантрона были поддержаны грантом РФФИ № 96-04-48421, а также краткосрочными грантами Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) и Европейской организации по молекулярной биологии (EMBO).

Исследования октакарбоксифталоциана кобальта и фотосенса выполнены при поддержке Московской противораковой программы. Авторы благодарны профессорам О.Л. Калей и Е.А. Лукьянцу (НИОПИК) за предоставленные образцы октакарбоксифталоциана кобальта и фотосенса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taylor D.L., Wang Y.-L. Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part B. San Diego: Acad. Press, 1989.
2. Pawley J.B. Handbook of Biological Confocal Microscopy. N.Y.: Plenum Publishing, 1990.
3. McLean Grogan W., Collins J. M. Guide to Flow Cytometry Methods. Marcel: Dekker, 1990.
4. Sharonov S., Chourpa I., Morjani H., Nabiev I., Manfait M., Feofanov A. // Anal. Chim. Acta. 1994. V. 290. P. 40-47.
5. Sharonov S., Nabiev I., Chourpa I., Feofanov A., Valisa P., Manfait M. // J. Raman Spectrosc. 1994. V. 25. P. 699-707.
6. Sharonov S., Chourpa I., Valisa P., Fleury F., Feofanov A., Manfait M. // European Microscopy and Analysis. 1994. № 11. P. 23-25.
7. Feofanov A., Sharonov S., Valisa P., Da Silva E., Nabiev I., Manfait M. // Rev. Sci. Instrum. 1995. V. 66. P. 3146-3158.
8. Feofanov A., Fleury F., Charonov S., Morjani H., Nabiev I., Manfait M. // J. Trace and Microprobe Techniques. 1995. V. 13. P. 241-243.
9. Feofanov A., Charonov S., Kudelina I., Fleury F., Nabiev I. // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 3317-3327.
10. Feofanov A., Charonov S., Fleury F., Kudelina I., Nabiev I. // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 3328-3336.
11. Valisa P., Favard C., Roussel B., Ballini J.P., Amirand C., Sharonov S., Chadeuf G., Egret-Charlier M., Manfait M., Da Silva E., Vigny P. // J. Trace Microprobe Techniques. 1995. V. 13. P. 251-253.
12. Feofanov A., Sharonov S., Fleury F., Kudelina I., Nabiev I. // Anticancer Res. 1997. V. 17. P. 4086.
13. Feofanov A., Charonov S., Kudelina I., Fleury F., Nabiev I. // Abstracts of 7th Int. Conf. on Laser Applications in Life Sciences / Eds D. Chorvat, N.I. Koroteev. 1998. P. S2-5.
14. Сыркин А.Б., Жукова О.С., Кикоть Б.С., Гатишская Л.Г., Трещалина Е.М., Якубовская Р.И., Панкратов А.А., Михайлова Л.М., Зимакова Н.И., Колесникова Е.Ю., Оборотова Н.А., Полозкова А.П., Герасимова Г.К., Калия О.Л., Кузьмин С.Г., Лукьянец Е.А., Ворожцов Г.Н., Трапезников Н.Н. // Рос. хим. журн. 1998. Т. 42. С. 140-146.
15. Feofanov A.V., Grichine A.I., Karmakova T.A., Iakubovskaya R.I. // Asian J. of Spectroscopy. 1999. V. 3. (in press).
16. Фефанов А.В., Гришин А.И., Куделина И.А., Шитова Л.А., Кармакова Т.А., Якубовская Р.И., Эгрет-Шарлье М., Вино П. // Рос. хим. журн. 1998. Т. 42. С. 68-76.
17. Лукьянец Е.А. // Рос. хим. журн. 1998. Т. 42. С. 9-16.

The Study of Localization and Molecular Interactions of Biologically Active Compounds in Living Cells and Tissue Slices by Confocal Spectral Imaging Technique

A. V. Feofanov^{##}, A. I. Grishin^{*}, I. A. Kudelina^{*}, L. A. Shitova^{**}, T. A. Karmakova^{**},
R. I. Yakubovskaya^{**}, M. Egret-Charlier^{***}, and P. Vigny^{***}

^{*}Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

^{**}Herzen Moscow Oncological Institute, Vtoroi Botkinskii pr., 3, Moscow, 125284 Russia

^{***}Centre de Biophysique Moléculaire, C.N.R.S., Université d'Orléans,
rue Charles-Sadron, 45071, Orléans, Cedex 2, France

The confocal spectral imaging (CSI) technique is described, its basic principles are considered, and a brief review of its applications to the study of biologically active compounds (BAC) within living cells and in tissue slices is presented. This technique is based on measurements and analysis of fluorescence or resonance Raman spectra in each point of the specimen under microscope with a three-dimensional resolution of about cubic micrometer. This technique is applicable to the study of stained fluorescent and nonfluorescent compounds. Unlike the conventional approaches based on the optical microscopy, the CSI technique opens the opportunity for the identification of complexes and microenvironment of BAC in intact cells and thin tissue slices (slices or sections), as well as for the analysis of localization and distribution of compounds of interest and their complexes in cellular organelles and tissue structures. The use of CSI technique in combination with the conventional biochemical and cytological methods makes it possible to significantly expand the informativeness of investigation of modes of action of new BAC.

Key words: confocal microspectroscopy, spectral images, mitoxantrone, aluminum sulfophthalocyanine, cobalt octacarboxyphthalocyanine

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7-(095)-336-6455, fax: +7-(095)-336-1766,
e-mail: alexei@nmr.ru.