

УРОВЕНЬ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ АТФ В УСЛОВИЯХ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Д. И. Шабанов, Ю. А. Лысенко, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 05.09.2018 г.

Аннотация. Одним из путей, приводящих к резорбции опухолей в результате фотодинамической терапии, является активация иммунной системы опухоленосителя, что обеспечивается, в частности, высвобождением во внеклеточное пространство или экспонированием на поверхности опухолевых клеток так называемых молекулярных паттернов, связанных с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMP), к числу которых относится аденозинтрифосфорная кислота. В связи с этим, целью настоящей работы явилось исследование изменений уровня экстрацеллюлярной АТФ в суспензии клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ, 6 сут роста опухоли, пролиферирующей в перитонеальной полости мышей аутбредного стока NMRI), облученной красным светом (665 ± 15 нм) в дозе 18 Дж/см^2 в присутствии метиленового голубого (МГ; 10^{-4} моль/л). Концентрацию АТФ во внеклеточной среде определяли методом хемилюминесценции с использованием коммерческого набора («Люмтек», Россия). Степень целостности клеточных мембран оценивали путем эксклюзии красителя — трипанового синего. Внутриклеточный уровень генерации активных форм кислорода и азота оценивали с участием DCFH-DA методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной спектроскопии.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что облучение исследуемых образцов красным светом в присутствии МГ сопровождается увеличением интенсивности света, рассеянного клетками под малыми углами (прямое рассеяние), что может быть интерпретировано как увеличение диаметра (объема) объекта. При этом уровень жизнеспособности клеток, оцениваемый по степени целостности плазмалеммы, составил 61.2 %. Кроме того, фотомодификация образцов сопровождалась усилением свечения внутриклеточного DCF (деэтерифицированная и окисленная флуоресцирующая форма DCFH-DA) в 8.2 раза (по сравнению с уровнем флуоресценции контрольного образца), что может свидетельствовать о генерации в данных условиях активных интермедиатов, способных оказывать повреждающее действие на различные структурные компоненты клетки. Нами показано, что экстрацеллюлярная концентрация АТФ в суспензии контрольных клеток (10^7 клеток в 1 мл раствора Хенкса) составила $(1.06 \pm 0.48)10^{-8}$ моль/л, а после фотомодификации в присутствии МГ — $(4.10 \pm 1.70)10^{-8}$ моль/л. Таким образом, выявлено, что облучение суспензии клеток АКЭ красным светом в присутствии МГ (10^{-4} моль/л) в дозе 18 Дж/см^2 индуцирует увеличение содержания экстрацеллюлярной АТФ в 3.9 раза относительно уровня контрольного (немодифицированного) образца.

Полученные результаты могут быть использованы при обсуждении вопросов, касающихся выяснения механизмов активации иммунной системы опухоленосителя в условиях фотодинамического воздействия.

Ключевые слова: фотодинамическое воздействие, асцитная карцинома Эрлиха, экстрацеллюлярная АТФ, активные формы кислорода, молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

На кафедре биофизики и биотехнологии медуниверситета факультета ФГБОУ ВО «ВГУ» проводятся систематические исследования, направленные на изучение механизмов физико-химических процессов, протекающих при

фотосенсибилизированной модификации молекулярно-клеточных компонентов биосистем, лежащей, в частности, в основе комплексного явления опухолевой деструкции при фотодинамической терапии злокачественных новообразований. Одним из путей, приводящих в этом случае к резорб-

ции опухолевой массы, является активация компонентов иммунной системы опухоленосителя (что обеспечивается, в частности, высвобождением во внеклеточное пространство или экспонированием на поверхности опухолевых клеток так называемых молекулярных паттернов, связанных с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMP) [1], к числу которых относится аденозинтрифосфорная кислота) [2].

Ранее нами было показано, что рост асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) в перитонеальной полости мышей NMRI сопровождался лейкоцитозом (постепенным увеличением содержания в крови нейтрофильных лейкоцитов с инверсией лейкоцитарной формулы на терминальной стадии роста неоплазмы), помимо этого, была продемонстрирована возможность модуляции иммунного ответа мышей при имплантации в их перитонеальную полость облученной красным светом в присутствии МГ опухолевой массы [3, 4]. С целью детализации представлений о механизмах реализующихся при этом процессов представлялось необходимым исследование изменений уровня экстрацеллюлярной АТФ (эАТФ) в суспензии клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ, 6-е сутки роста опухоли, пролиферирующей в перитонеальной полости мышей аутбредного стока NMRI), облученной красным светом (665 ± 15 нм) в дозе 18 Дж/см^2 в присутствии метиленового голубого (МГ; 10^{-4} моль/л).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явились клетки асцитной карциномы Эрлиха (пролиферирующей в перитонеальной полости мышей аутбредного стока NMRI), извлеченные на 6-е сутки роста опухоли. Источником излучения служил аппарат «УЛОКС» (665 ± 15 нм; 5 мВт/см^2). В экспериментах использовались суспензии опухолевых клеток (10^7 кл./мл) в растворе Хенкса: 1) контрольный образец (немодифицированные клетки); 2) клетки, инкубированные в течение 1 ч в присутствии метиленового голубого (10^{-4} моль/л; темновая инкубация); 3) клетки, облученные в дозе 18 Дж/см^2 в смеси с МГ. Для каждого образца после соответствующего воздействия определялись: концентрация клеток в суспензии (с помощью камеры Горяева); степень целостности плазмалеммы (путем эксклюзии трипанового синего) [5]; суммарный уровень внутриклеточных активных форм кислорода, азота – по регистрации интенсивности флуоресценции DCF (окисленной формы DCFH-

DA (2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат)) методами флуоресцентной спектрофотометрии (RF-1501, Shimadzu, Япония) и проточной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр Guava easyCyte 8 HT, EMD Millipore, Франция; эксперименты проведены на оборудовании ЦКПНО ВГУ).

Для определения уровня внутриклеточных активных интермедиатов, генерируемых в результате облучения, к суспензиям клеток добавляли DCFH-DA (Sigma-Aldrich, США; конечная концентрация 10 мкмоль/л), верапамил (5.5 мкмоль/л) и инкубировали без доступа света в течение 30 мин при 37°C , затем дважды отмывали клетки от непоглощенного флуоресцентного зонда путем центрифугирования (10 мин; 400 g) и определяли интенсивность флуоресценции образцов с помощью спектрофлуориметра (длина волны возбуждения – 488 нм, испускания – 520 нм) и проточного цитофлуориметра (при возбуждении аргоновым лазером (488 нм) в зеленом канале флуоресценции ($525 \pm 30 \text{ нм}$)) [6].

Для определения уровня экстрацеллюлярной АТФ в образцах суспензию клеток центрифугировали и отбирали супернатант, затем его центрифугировали повторно, имеющийся осадок клеток отбрасывали; супернатант инкубировали на водяной бане при 98°C в течение 2 мин для инактивации АТФаз [7]. Далее эти образцы разводили в 5 раз стерильным раствором NaCl (0.9 %). В кювету для измерения хемиллюминесценции вносили 20 мкл полученного раствора, добавляли 100 мкл раствора, содержащего смесь люциферазы с люциферинном (ЛЮМТЕК, Россия), и проводили измерение интенсивности хемиллюминесценции в течение 60 с помощью биохемиллюминиметра БХЛ-07 [8]. Обработку данных проводили на компьютере IBM PC с использованием программы «LUM07». Расчет концентрации АТФ в растворе осуществляли по формуле:

$$C_{\text{АТФ}} = \frac{I}{I_k} 3.75 \cdot 10^{-8},$$

где $C_{\text{АТФ}}$ — концентрация АТФ в растворе, моль/л; I — интенсивность хемиллюминесценции экспериментального образца, усл. ед.; I_k — интенсивность хемиллюминесценции образца с известной концентрацией АТФ.

Обработку результатов экспериментов проводили методами параметрической и непараметрической статистики с использованием программ «Microsoft Excel» и «Statistica». Обсуждаются статистически значимые отличия при уровне значимости 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены данные об изменении концентрации (рис. 1а) и уровня жизнеспособности (оцениваемой по степени целостности плазматических мембран) клеток АКЭ, оставшихся в суспензии к моменту анализа (рис. 1б), после их облучения красным светом (в дозе 18 Дж/см²) и темновой инкубации в присутствии МГ (10⁻⁴ моль/л). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в указанных условиях эксперимента не происходило статистически значимого изменения концентрации клеток в суспензии, однако уровень их жизнеспособности снижался на 37.1 % (рис. 1б). Нарушение целостности плазмалеммы может способствовать поступлению воды в клетку и увеличению ее объема (набуханию).

На рис. 2 представлены типичные кривые распределения клеток АКЭ по интенсивности прямого рассеяния света (FSC), полученные по данным цитометрии соответствующих образцов. Известно, что значения этого показателя (FSC), с известными допущениями, коррелируют с размером клетки [9]. С помощью U-критерия Манна — Уитни нами выявлено статистически значимое увеличение значений интенсивности прямого (малоуглового) рассеяния света в образцах клеток, облученных красным светом в присутствии МГ (рис. 2, кривая 3), по сравнению с величиной аналогичного показателя контрольной суспензии (рис. 2, кривая 1). Таким образом, фотомодификация клеток АКЭ в рассматриваемой дозе в при-

сутствии МГ, вероятно, приводит к увеличению объема клеток, что согласуется с данными, характеризующими изменения целостности их мембран.

Для оценки уровня внутриклеточной генерации (при облучении системы в присутствии сенсibilизатора) различного рода активных соединений (синглетного кислорода, активных форм кислорода, радикальных состояний сенсibilизатора и др.), способных вызывать структурно-функциональные модификации клеточных компонентов и индуцировать процессы клеточной гибели, нами был применен 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат (DCFH-DA), широко используемый для детекции внутриклеточных АФК (следует отметить, что DCFH – деэтерифицированная внутриклеточными эстеразами форма DCFH-DA – помимо активных форм кислорода также может взаимодействовать с активными формами азота, ионами железа, цитохромом с и рядом других соединений) [10]. Уровень фотофлуоресценции внутриклеточного DCF (окисленной формы DCFH) регистрировали методами флуоресцентной спектроскопии и проточной цитофлуориметрии. Первый позволяет определять интенсивность свечения клеточной массы, а второй – индивидуальные характеристики испускания отдельных ее компонентов. Результаты проведенных экспериментов иллюстрирует рис. 3.

Анализ результатов проведенных экспериментов позволяет констатировать, что темновая инкубация и облучение исследуемых образцов в присутствии МГ сопровождалось увеличением

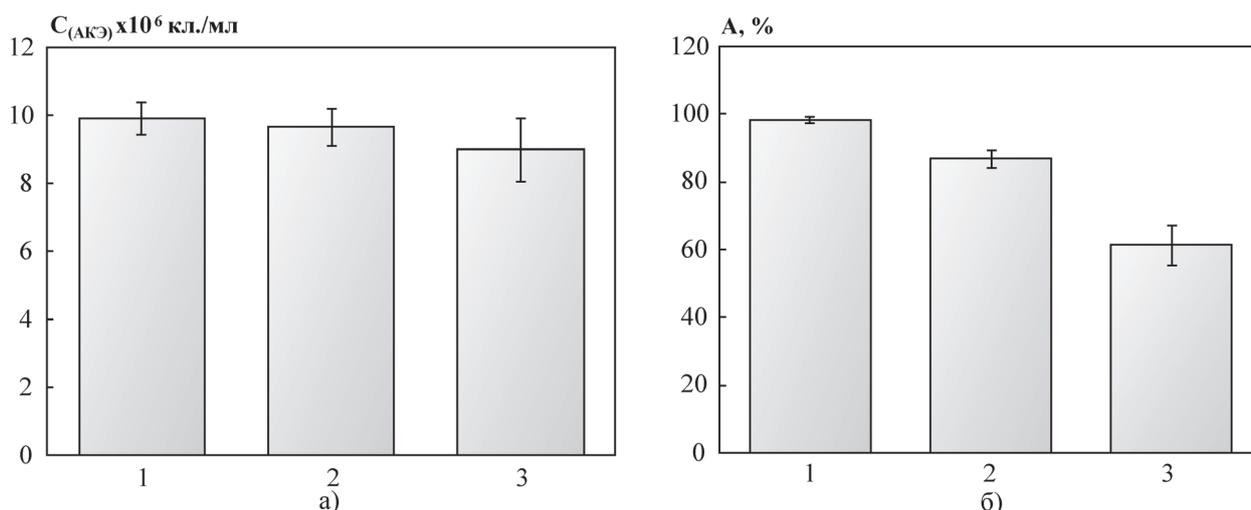


Рис. 1. Изменения концентрации (а) и уровня жизнеспособности клеток АКЭ (извлеченных на 6-е сут роста), оставшихся в суспензии к моменту анализа (б), после облучения красным светом в присутствии МГ (10⁻⁴ моль/л): 1 – контроль (немодифицированный образец); 2 – инкубация с МГ (1 ч); 3 – облучение с МГ в дозе 18 Дж/см² (1 ч); по оси ординат: а) концентрация клеток в суспензии, ·10⁶ кл./мл; б) уровень жизнеспособности клеток, %

интенсивности свечения DCF в 2.5 и 8.2 раза соответственно (рис. 3а), что свидетельствует о резком усилении генерации внутриклеточных активных

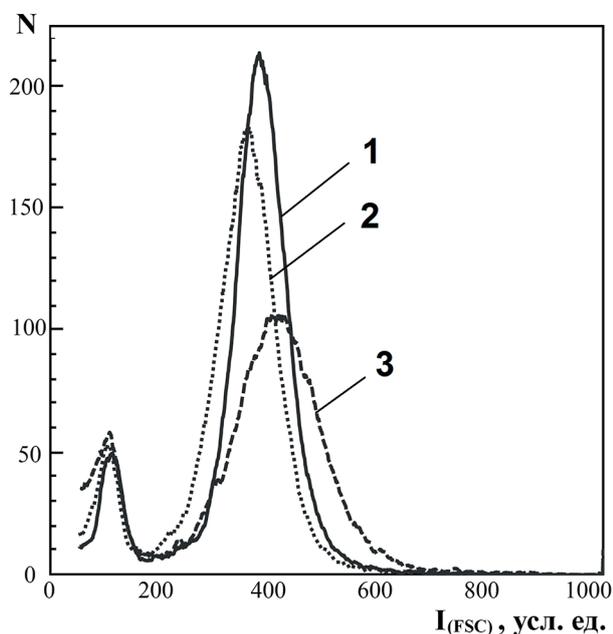
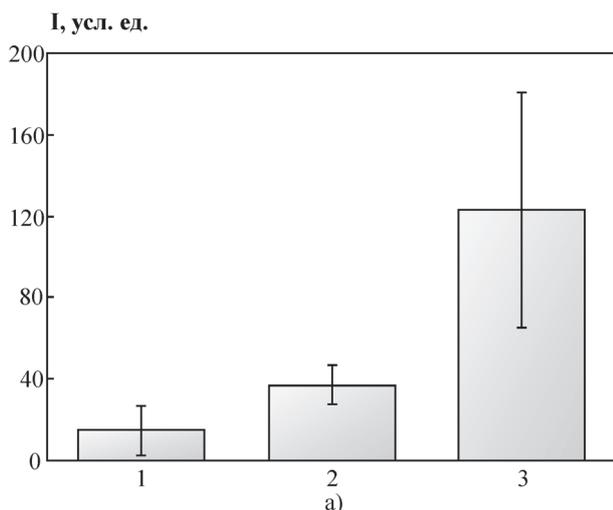


Рис. 2. Кривые распределения клеток АКЭ по значениям интенсивности прямого рассеяния света (FSC), полученные после облучения образцов красным светом (18 Дж/см²) в присутствии МГ (10⁻⁴ моль/л): 1 – контроль (немодифицированный образец); 2 – инкубация с МГ (1 ч); 3 – облучение с МГ в дозе 18 Дж/см² (1 ч); по оси ординат – число клеток; по оси абсцисс – интенсивность прямого рассеяния света (FSC), усл. ед.



интермедиатов, способных к окислению биосубстратов, в условиях фотомодификации. Кроме того, выявлено неоднородное распределение популяции клеток АКЭ по уровню их флуоресценции в условиях инкубации с МГ и облучения в его присутствии: наблюдалось два пула клеток – с низким и более высоким значениями интенсивности испускания (рис. 3б, кривые 2 – 3).

Далее нами были исследованы изменения концентрации экстрацеллюлярной АТФ в суспензии клеток АКЭ (образец объемом 1 мл содержал 10⁷ клеток в растворе Хенкса) после темновой инкубации и облучения в присутствии МГ в условиях, аналогичных вышеописанным. Концентрация внеклеточной АТФ в суспензии клеток после их инкубации в течение 1 ч в смеси с МГ составила $(0.79 \pm 0.36)10^{-8}$ моль/л. Это значение статистически значимо не отличалось от величины, характеризующей концентрацию эАТФ контрольной суспензии клеток (инкубированных в растворе Хенкса в течение 1 ч), которая составила $(1.06 \pm 0.48)10^{-8}$ моль/л. Однако в результате фотомодификации исследуемых образцов в присутствии МГ содержание экстрацеллюлярной АТФ возрастало в 3.9 раза относительно уровня контрольного (немодифицированного) образца (рис. 4).

Таким образом, нами показано, что облучение суспензии клеток АКЭ в дозе 18 Дж/см² индуцирует резкое (относительно уровня АФК в контрольных и инкубированных в присутствии МГ клетках) возрастание внутриклеточного уровня активных форм кислорода и иных активных

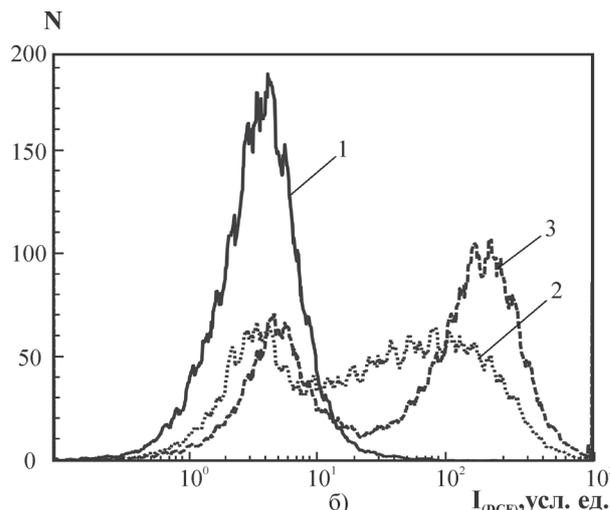


Рис. 3. Изменения уровня фотофлуоресценции DCF в клетках асцитной карциномы Эрлиха в условиях облучения красным светом (18 Дж/см²) в присутствии МГ (10⁻⁴ моль/л): 1 – контроль (немодифицированная суспензия клеток); 2 – темновая инкубация с МГ (10⁻⁴ моль/л); 3 – облучение красным светом в дозе 18 Дж/см² в присутствии МГ; по оси ординат: а) интенсивность фотофлуоресценции DCF, усл. ед. (измеренная с помощью спектрофлуориметра); б) число клеток; по оси абсцисс: б) интенсивность фотофлуоресценции DCF, усл. ед. (измеренная с помощью цитофлуориметра)

интермедиатов — потенциальных окислителей клеточных компонентов, что способствует нарушению целостности цитолеммы и росту внеклеточной концентрации АТФ.

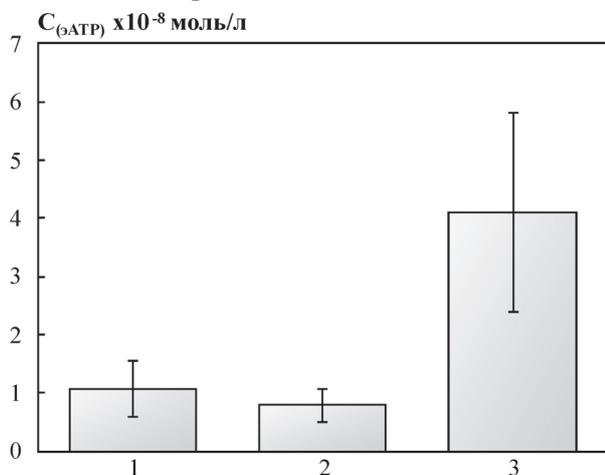


Рис. 4. Изменения концентрации экстрацеллюлярной АТФ (эАТФ) в суспензии клеток АКЭ в условиях облучения красным светом (18 Дж/см^2) в присутствии МГ (10^{-4} моль/л): 1 – контроль (немодифицированная суспензия клеток); 2 – темновая инкубация с МГ (10^{-4} моль/л); 3 – облучение красным светом в дозе 18 Дж/см^2 в присутствии МГ; по оси ординат: концентрация эАТФ, $\cdot 10^{-8}$ моль/л

Повышение концентрации эАТФ в условиях *in vivo* может служить для привлечения в соответствующую зону клеток иммунной системы (сигнал «найди меня») и их активации [11]. Иммуноциты в этом случае также могут высвобождать АТФ, при этом она выступает как элемент аутокринной и паракринной регуляции функций этих клеток [12].

Внутриклеточная концентрация АТФ составляет по данным разных авторов величину порядка $(3 - 5)10^{-3}$ моль/л [13]; $(3 - 10)10^{-3}$ моль/л [14]; экстраклеточная – $(1 - 10)10^{-9}$ моль/л ($\approx 10^6$ -кратный градиент концентрации поддерживается за счет деятельности экто-апиразы (CD39) и экто-5'-нуклеотидазы (CD73), которые гидролизуют АТФ и АДФ до АМФ; АМФ до аденозина соответственно) [14]. В нормальных физиологических условиях наблюдается выход АТФ из клеток с некоторой постоянной скоростью и, несмотря на присутствие экто-АТФаз, эта «утечка» способствует формированию в непосредственной близости от поверхности клетки так называемого «гало» (ареола, области с низкой концентрацией АТФ; микромолярный диапазон). Считается, что подобный сигнал «сообщает» окружающим клеткам о наличии соседних живых клеток и представляет

собой первый тип опосредованной АТФ межклеточной коммуникации [14]. Кратковременное повышение концентрации эАТФ выступает как элемент межклеточной сигнализации. Так, для полуактивации ряда пуринергических рецепторов достаточной является концентрация $(3 - 500)10^{-9}$ моль/л [13].

Существующие клеточные рецепторы для АТФ дифференцируются по степени аффинности для этого соединения. Ответ клетки на низкие и средние концентрации АТФ обусловлен активацией P2-рецепторов с высокой (с полумаксимальной эффективной концентрацией (медианной эффективной концентрацией, EC50) АТФ $< 1 \cdot 10^{-6}$ моль/л: P2X₁, P2X₃, P2Y₂, P2Y₁₃) и промежуточной аффинностью (EC50 – $(1-20)10^{-6}$ моль/л: P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2Y₁, P2Y₄, P2Y₁₁). Клеточная реакция на эАТФ в высоких концентрациях связана с активацией P2X₇-рецепторов, характеризующихся значениями EC50 $> 0.1 \cdot 10^{-3}$ моль/л [14].

К настоящему времени описаны несколько способов выхода АТФ из клетки в экстрацеллюлярное пространство. Первый представляет собой пассивное высвобождение (неспецифический путь выхода) этих молекул из некротических клеток с поврежденной наружной мембраной по градиенту концентрации. Два других связаны с участием специализированных клеточных структур (регулируемое высвобождение) [15].

Регулируемое высвобождение реализуется путем везикулярного экзоцитоза, а также выхода АТФ через аннексиновые и паннексиновые каналы. В цитозоле ряда клеток присутствуют специализированные гранулы, накапливающие, а затем быстро высвобождающие АТФ при слиянии с цитолеммой. В процессе экзоцитоза принимает участие везикулярный нуклеотидный транспортер VNUT [16], а собственно интенсивность транспортировки регулируется внутриклеточным уровнем ионов кальция и белками группы SNARE.

Второй способ, обеспечивающий регулируемый выход АТФ из клетки, связан с функционированием аннексиновых и паннексиновых каналов. Считается, что эти мембранные структуры закрыты в нормальных физиологических условиях и могут открываться в ряде случаев: при расщеплении С-концевого участка паннексина-1 активированными каспазами (включая каспазы 3 и 7 во время апоптоза и каспазу-11 в ходе пироптоза и эндотоксического шока); механическом напряжении; увеличении концентрации внутриклеточных ионов кальция и внеклеточных ионов калия; изменении окислительно-восстановительного потенциала; связывании лигандов с рядом рецепторов, ассоциированных с мембранными каналами (на-

пример, связывание АТФ с P2X₇-пуринорецепторами, связывание гистамина и брадикинина с H₁ и B₂-рецепторами соответственно) [15, 17].

В настоящее время является общепризнанной концепция, согласно которой рост концентрации внеклеточной АТФ рассматривается как «сигнал опасности», привлекающий в соответствующую зону клетки иммунной системы (например, сигнал «найди меня» появляется при некрозе и апоптозе клеток для привлечения фагоцитов с целью удаления клеточного дебриса) [18].

Внеклеточные нуклеотиды могут регулировать ключевые эффекторные функции макрофагов, нейтрофилов, эндотелиоцитов путем взаимодействия с пуринергическими рецепторами типа P₂, что обеспечивает рекрутинг и активацию этих клеток (например, внеклеточная АТФ способствует секреции макрофагами интерлейкинов, в частности, IL-1β, активных форм кислорода и азота; опосредует активацию нейтрофилов на переднем крае через аутокринную стимуляцию рецептора P₂Y и др.) [19, 20].

Таким образом, нами показано, что в результате облучения красным светом суспензии клеток АКЭ в дозе 18 Дж/см² в присутствии МГ (10⁻⁴ моль/л) наблюдается выход АТФ во внеклеточное пространство. Выяснению механизмов данного процесса и установлению его роли в ходе активации компонентов иммунной системы опухоленосителя при фотодинамическом воздействии *in vivo* будут посвящены дальнейшие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garg A.D., Krysko D.V., Vandenamee P., Agostinis P. // *Photochem Photobiol Sci.* 2011. Vol. 10, pp. 670-680.
2. Panzarini E., Inguscio V., Fimia G.M., Dini L. // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, pp. 1-12.
3. Лысенко Ю.А., Косых И.А., Шабанов Д.И., Вирютина В.В., Артюхов В.Г. // *Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация.* 2013. № 2. С. 120-125.
4. Лысенко Ю.А., Шабанов Д.И., Артюхов // *Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов.* 2012. № 14. С. 108-114.
5. Strober W. // *Current Protocols in Immunology.* 1997. A.3B.1-A.3B.2.
6. Eruslanov E., Kusmartsev S. // *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol. 594, pp. 57-72.
7. Seminario-Vidal L., Lazarowski E.R., Okada S.F. // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 574, pp. 25-36.
8. Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н. // *Биохимия.* 2015. Т. 80. № 6, С. 829 – 844.
9. Jun D.J., Kim J., Jung S.Y., Song R., Noh J.H., Park Y.S., Ryu S.H., Kim J.H., Kong Y.Y., Chung J.M., Kim K.T. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, pp. 37350-37358.
10. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts L.J. // *Free radical biology & medicine.* 2011. Vol. 52, № 1. pp. 1-6.
11. Elliott M.R., Chekeni F.B., Trampont P.C., Lazarowski E.R., Kadl A., Walk S.F., Park D., Woodson R.I., Ostankovich M., Sharma P., Lysiak J.J., Harden T.K., Leitinger N., Ravichandran K.S. // *Nature.* 2009. Vol. 461, pp. 282-286.
12. Junger W.G. // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. Vol. 11, pp. 201-212.
13. Fitz J. G. // *Transactions of the american clinical and climatological association.* 2007. Vol. 118. pp. 199-208.
14. Trautmann A. // *Science Signal.* 2009. Vol. 2, Is. 56. pe6. DOI: 10.1126/scisignal.256pe6
15. Praetorius H.A., Leipziger J. // *Purinergic Signal.* 2009. Vol. 5, pp. 433-446.
16. Moriyama Y., Hiasa M., Sakamoto S., Omote H., Nomura M. // *Purinergic Signalling.* 2017. Vol. 13. pp. 387-404.
17. Chekeni F.B., Elliott M.R., Sandilos J.K., Walk S.F., Kinchen J.M., Lazarowski E.R., Armstrong A.J., Penuela S., Laird D.W., Salvesen G.S., Isakson B.E., Bayliss D.A., Ravichandran K.S. // *Nature.* 2010. Vol. 467, pp. 863-867.
18. Medina C.B., Ravichandran K.S. // *Cell Death Differ.* 2016. Vol. 23, pp. 979-989.
19. Cruz C.M., Rinna A., Forman H.J., Ventura A.L., Persechini P.M., Ojcius D.M. // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, pp. 2871-2879.
20. Stagg J., Smyth M.J. // *Oncogene.* 2010. Vol. 29, pp. 5346-5358

Воронежский государственный университет
*Шабанов Д. И., инженер кафедры биофизики
и биотехнологии
Тел.: +7 (473) 271-20-95
E-mail: am7d@mail.ru

Voronezh State University
*Shabanov D. I., Engineer, Department of
biophysics and biotechnology
Ph.: +7 (473) 271-20-95
E-mail: am7d@mail.ru

Лысенко Ю. А., канд. биол. наук, ассистент
кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: lysenko@bio.vsu.ru

Lysenko Yu. A., PhD (Biology), assistant professor,
Department of biophysics and biotechnology
E-mail: lysenko@bio.vsu.ru

Артыухов В. Г., доктор биол. наук, профессор,
заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V. G., PhD (Biology), Full Professor,
Head of Dept. of biophysics and biotechnology
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

EXTRACELLULAR ATP LEVEL IN THE CONDITIONS OF ERLICH ASCITES CARCINOMA CELLS PHOTODYNAMIC TREATMENT

D. I. Shabanov, Yu. A. Lysenko, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

Abstract. One of the ways leading to tumor resorption as a result of photodynamic therapy is activation of the tumor-bearer's immune system, which is ensured, in particular, by release into the extracellular space or expression of the damage-associated molecular patterns on the tumor cells, including adenosine triphosphoric acid. In this regard, the purpose of this research was to investigate extracellular ATP level changes in the Ehrlich ascites tumor cell suspension (EAT, 6 days tumor growth, proliferating in the peritoneal cavity of mice outbred stock MNRI), irradiated with red light (665 ± 15 nm) at a dose of 18 J/cm^2 in the presence of methylene blue (MB; 10^{-4} mol/l). The ATP concentration in the extracellular medium was determined by chemiluminescence using a commercial kit (Lyumtek, Russia). The degree of cell membrane integrity was assessed by the exclusion of the dye – trypan blue. The intracellular level of reactive oxygen and nitrogen species evaluated with DCFH-DA by flow cytometry and fluorescence spectroscopy.

As a result of the experiments, it was found that the red light irradiation of the samples in the presence of MB is accompanied by an increase in the intensity of small-angles light scattering of cells (forward scattering), that can be interpreted as an increase in the diameter (volume) of the object. The level of cell viability, as measured by the degree of plasma membrane integrity was 61.2%. In addition, the photomodification of samples was accompanied by an increase in the luminescence of intracellular DCF (deesterified and oxidized fluorescent form DCFH-DA) by 8.2 times (compared with the fluorescence level of the control sample), which may indicate the generation of active intermediates under these conditions that can have a damaging effect on various structural components of the cell. We have shown that the extracellular concentration of ATP in the suspension of control cells (10^7 cells in 1 ml of Hanks solution) was $(1.06 \pm 0.48) \cdot 10^{-8}$ mol/l, and after photomodification in the presence of MB – $(4.10 \pm 1.70) \cdot 10^{-8}$ mol/l. Thus, it was found that the irradiation of a EAT cells suspension with red light in the presence of MB (10^{-4} mol/l) at a dose of 18 J/cm^2 induces an increase of extracellular ATP by 3.9 times relative to the level of control (unmodified) sample.

The results can be used in the discussion of issues related to clarify the mechanism of activation of the tumor-bearer's immune system by photodynamic treatment.

Keywords: photodynamic treatment, Ehrlich ascites carcinoma, extracellular ATP, reactive oxygen species, damage-associated molecular patterns

REFERENCES

1. Garg A.D., Krysko D.V., Vandenabeele P., Agostinis P., Photochem Photobiol Sci., 2011, Vol. 10, pp. 670-680.
2. Panzarini E., Inguscio V., Fimia G.M., Dini L., PLoS One, 2014, Vol. 9, pp. 1-12.
3. Lysenko Yu.A., Kosykh I.A., Shabanov D.I., Viryutina V.V., Artyukhov V.G., Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2013, № 2, pp. 120-125.
4. Lysenko Yu.A., Shabanov D.I., Artyukhov, Organizatsiya i regulyatsiya fiziologo-biokhimi-cheskikh protsessov, 2012, № 14, pp. 108-114.
5. Strober W., Current Protocols in Immunology, 1997, A.3B.1-A.3B.2.
6. Eruslanov E., Kusmartsev S., Methods Mol. Biol., 2010, Vol. 594, pp. 57-72.

7. Seminario-Vidal L., Lazarowski E.R., Okada S.F., *Methods Mol. Biol.*, 2009, Vol. 574, pp. 25-36.
8. Lomakina G.Yu., Modestova Yu.A., Ugarova N.N., *Biokhimiya*, 2015, T. 80, No. 6, pp. 829 – 844.
9. Jun D.J., Kim J., Jung S.Y., Song R., Noh J.H., Park Y.S., Ryu S.H., Kim J.H., Kong Y.Y., Chung J.M., Kim K.T., *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, pp. 37350-37358.
10. Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts L.J., *Free radical biology & medicine*, 2011, Vol. 52, № 1, pp. 1-6.
11. Elliott M.R., Chekeni F.B., Trampont P.C., Lazarowski E.R., Kadl A., Walk S.F., Park D., Woodson R.I., Ostankovich M., Sharma P., Lysiak J.J., Harden T.K., Leitinger N., Ravichandran K.S., *Nature*, 2009, Vol. 461, pp. 282-286.
12. Junger W.G., *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 201-212.
13. Fitz J. G. *Transactions of the american clinical and climatological association*, 2007, Vol. 118, pp. 199-208.
14. Trautmann A. *Science Signal.*, 2009, Vol. 2, Is. 56, pe6, DOI: 10.1126/scisignal.256pe6.
15. Praetorius H.A., Leipziger J., *Purinergic Signal.*, 2009, Vol. 5, pp. 433-446.
16. Moriyama Y., Hiasa M., Sakamoto S., Omote H., Nomura M. // *Purinergic Signalling*, 2017, Vol. 13, pp. 387-404.
17. Chekeni F.B., Elliott M.R., Sandilos J.K., Walk S.F., Kinchen J.M., Lazarowski E.R., Armstrong A.J., Penuela S., Laird D.W., Salvesen G.S., Isakson B.E., Bayliss D.A., Ravichandran K.S., *Nature*, 2010, Vol. 467, pp. 863-867.
18. Medina C.B., Ravichandran K.S., *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 979-989.
19. Cruz C.M., Rinna A., Forman H.J., Ventura A.L., Persechini P.M., Ojcius D.M., *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, pp. 2871-2879.
20. Stagg J., Smyth M.J., *Oncogene*, 2010, Vol. 29, pp. 5346-5358.