

Д.А. Боченина, Н. В. Словеснова, А.С. Минин
ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ НА ОСНОВЕ
ПРОИЗВОДНЫХ ПИРЕНА

Кафедра фармации
Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Российская Федерация

D.A. Bochenina, N.V. Slovesnova, A.S. Minin
THE STUDY OF FLUORESCENCE PROBES BASED ON PYRENE
DERIVATIVES

Department of pharmacy
Ural State Medical University
Yekaterinburg, Russian Federation

Контактный e-mail: dasha_bochenina@mail.ru

Аннотация. В статье изложена сравнительная характеристика флуоресцентной активности производных пирена и перилена в животной клетке. Приведены данные МТТ-теста с выявлением цитотоксических свойств веществ данной группы.

Annotation. In the article the comparative characteristic fluorescent activity of various derivatives of pyrene. The data of MTT assay with detection of cytotoxic properties of substances of this group.

Ключевые слова: флуоресценция, цитотоксичность, пирен, перилен, МТТ-тест.

Keywords: fluorescence, cytotoxicity, pyrene, perylene, MTT-test.

Окраска флуоресцирующими красителями широко используется в патанатомии, гистологии, цитологии, молекулярной биологии и цитогенетике [2]. С помощью флуоресцентных зондов можно исследовать молекулярные механизмы возникновения и развития патологических процессов, действие на организм биологически активных веществ и лекарственных препаратов. Флуоресцентные зонды применяются также для диагностики и прогноза развития заболеваний, выявления факторов риска и контроля эффективности лечения [1]. С помощью мембранных зондов можно определить сродство нового вещества к мембране, скорость проникновения через нее и его локализацию в клетках и тканях, выяснить связь способности этого вещества проникать в клетку с его активностью, изучить его действие на структуру и физико-химические свойства мембраны и др. Разработка и исследование новых флуоресцентных красителей является актуальной задачей органического синтеза и экспериментальной биологии.

Пирен и перилен – полициклические ароматические углеводороды, обладающие коротковолновой флуоресценцией. В отличие от других флуорофоров, они обладают большой чувствительностью к микроокружению – их флуоресценция в полярных и в неполярных окружениях различается. Однако сами по себе данные вещества гидрофобны и локализуются только в мембране клетки. При получении их производных с большей водорастворимостью возможно изменение как распределения красителя по клетке, так и повышение квантового выхода, наряду с батохромным сдвигом максимумов флуоресценции (или появлением дополнительных максимумов за счет образования оксимеров). Таким образом, на сегодняшний день тема является актуальной и требует дальнейшего развития и исследований.

Цель исследования – оценка флуоресцентной активности двух производных пирена и перилена с разной водорастворимостью (3-периленилсульфоокислота и гидроксиметилпирен), а также цитотоксичности в культуре клеток человека.

Материалы и методы исследования

В качестве двух производных с различной растворимостью выбрали сульфокислоту перилена – высокая растворимость в виде аммонийных солей – и гидроксиметилпирен – вещество, не растворимое в воде, но хорошо растворимое в полярных органических растворителях, таких как спирты¹.

Для изучения флуоресцентных свойств исследуемых веществ и их распределения в живых клетках препараты были исследованы на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM-710, (CarlZeiss, Germany) с многоканальным QUASAR детектором (34 канала). Использованы лазеры с длиной волны 405, 488, 561, 633 нм. Изображения получены при использовании иммерсионного объектива 40x/1.3 Oil, разрешение изображений 1024x1024 точек, размер изображения 212x212 мкм. Для получения информативного флуоресцентного изображения в специализированном ПО ZEN2009 (CarlZeiss) был использован специальный лямбда-режим (λ -mode), позволяющий определить диапазон эмиссии с максимальной контрастностью для данного препарата. Для исследования при помощи конфокального микроскопа клетки культивировались в специализированных чашках Петри со стеклянным дном толщиной 0,16 мм, с пригодной для роста площадью в 3,141 см².

Вещество добавлялось к культуральной среде в концентрации ориентировочно 1 мМ, инкубирование осуществлялось в течение 15 минут, после чего клетки промывались стерильным фосфатным буфером и изучались при помощи конфокальной микроскопии.

Для определения жизнеспособности клеток проводили МТТ-тест на культуре клеток HeLa. Концентрация изучаемых красителей 1 мг/мл, время

¹Вещества, используемые как красители, были предоставлены сотрудниками кафедры органической и биомолекулярной химии, Зыряновым Г.В., Ковалевым И.С. Степень чистоты веществ и структура устанавливали ЯМР.

инкубирования 2 часа, в качестве контрольного образца использовался ДМСО (Биолот, Россия) Далее измеряли оптическую плотность на спектрофотометре BioTekELx808. Обработку результатов проводили с помощью программ Gen5 2.06, MSExcel.

Результаты исследования и их обсуждение

Наилучшая флуоресценция наблюдалась при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм. Было показано, что флуорофоры равномерно окрашивают цитоплазму и, возможно, мембрану клетки, не проникая в ядро. (рис. 1,2)

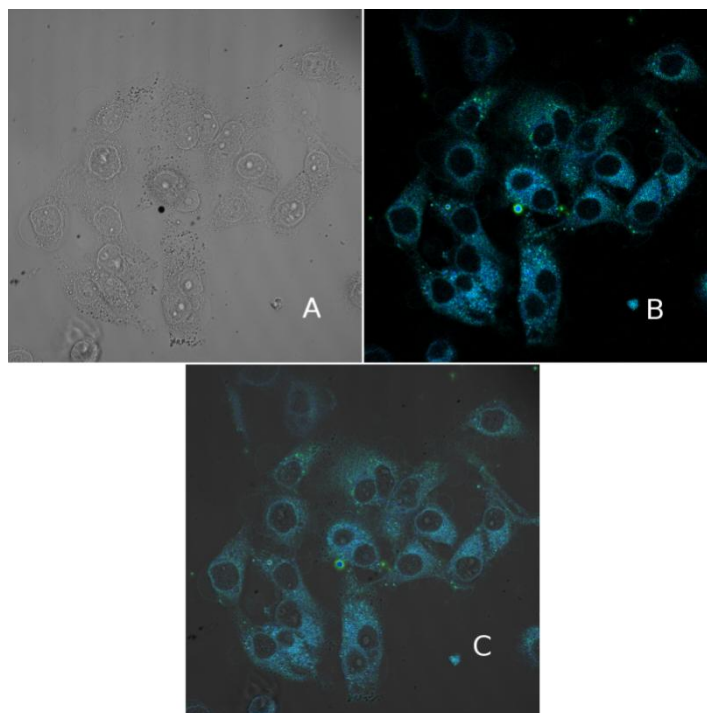


Рис. 1 Микрофотография культуры клеток HeLa окрашенная гидроксиметилпиреном, А – в проходящем свете, В – флуоресцентная картина в ламбда-режиме при возбуждении 405 нм, С – совмещённое изображение.

Известно, что для полициклических ароматических углеводородов, к которым относятся и пирен и перилен, цитотоксическое действие во многом обусловлено взаимодействием неполярной молекулы ПАУ с ДНК, приводящей к повреждению наследственного материала клетки [3]. Однако в данном случае, когда речь идёт о гидрофилизированных производных ПАУ, не наблюдается проникновения флуорофора в ядро, по крайней мере, при помощи конфокальной микроскопии.

При исследовании веществ на цитотоксичность результаты показали, что влияние этих веществ на культуры клеток статистически достоверно не отличается от контроля. Следовательно, можно утверждать, что вещества не оказывают цитотоксичного влияния на культуру клеток HeLa.

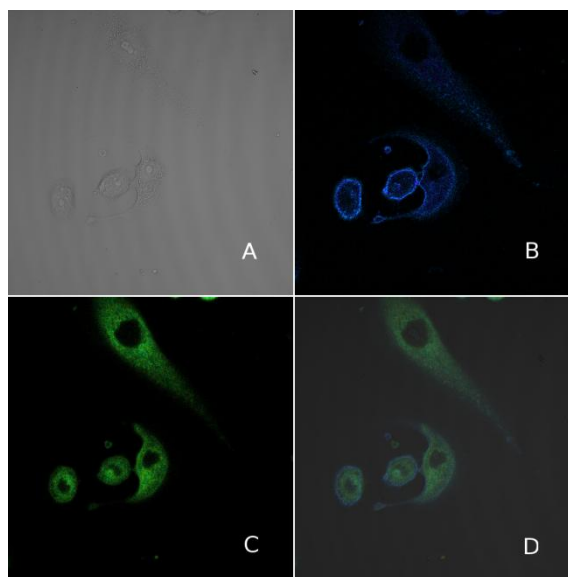


Рис. 2 Микрофотография культуры клеток HeLa окрашенная периленсульфокислотой, А – в проходящем свете, В – флуоресцентная картина в лямбда-режиме при возбуждении 405 нм, В – флуоресцентная картина в лямбда-режиме при возбуждении 488 нм, D – совмещённое изображение.

Выводы:

1. Флуорофоры на основе производных пирена и перилена равномерно окрашивают цитоплазму клеток, не проникая в ядро, при возбуждении лазером с длиной волны 405 нм.
2. По результатам МТТ-теста выявлено, что вещества не оказывают цитотоксичного действия на культуру клеток HeLa.

Литература:

1. Использование флуоресцентных методов в медицине [Электронный ресурс]//Медновости:[сайт].[2015].URL:<http://www.mednovosti.by/journal.aspx?article=4071>(дата обращения: 13.10.2015).
2. Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов //СПб.: Соло. – 2008.
3. Nisbet I. C. T., LaGoy P. K. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) //Regulatory toxicology and pharmacology. – 1992. – Т. 16. – №. 3. – С. 290-300.

УДК 615.458

Д.А. Боченина, М.Ю. Кинев
АНАЛИЗ АССОРТИМЕНТА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА НА
ПРИМЕРЕ АЭРОДИСПЕРСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Кафедра фармации
ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Россия

D.A. Bochenina, M.Y. Kinev