

**ОСОБЕННОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ
АМИНОПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА E₆ И ИХ
ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**

Зорина Т.Е.

*к. б. н., доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь
zorinate@mail.ru*

Кравченко И.Е.

*старший научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь
krav-irina@mail.ru*

Ермилова Т.И.

*младший научный сотрудник ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь
tatyana.ig21@gmail.com*

Шман Т.В.

*к. б. н., заведующая лабораторией иммунологических исследований научного отдела ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Беларусь
t_shman@yahoo.com*

Кустов А.В.

*д.х.н., профессор, Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, Иваново, Россия
kustov@isuct.ru*

Березин Д.Б.

*д.х.н., профессор, Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия
berezin@isuct.ru*

Зорин В.П.

*к. б. н., доцент, заведующий НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики, БГУ, г. Минск, Беларусь
vpzorin@mail.ru*

В данной статье исследовано влияние включения фотосенсибилизаторов – аминокпроизводных хлорина e₆, в липосомы из димеристоилфосфатидилхолина на характер локализации и механизмы фотодинамического повреждения клеток. Показано, что липосомальные формы аминокпроизводных хлорина e₆, также как и этерифицированные хлорины, локализуются преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, комплексе Гольджи, митохондриях клетки и имеют низкий уровень локализации в лизосомах. Установлены отличия в активности и механизмах повреждения клеток для хлоринов с различной модификацией боковых групп и

их липосомальных форм. Различия в механизмах повреждения клеток определяются особенностями локализации и уровнем накопления фотосенсибилизаторов.

Ключевые слова: фотосенсибилизаторы; липосомы; аминокислотные производные хлорина E_6 ; локализация в клетке; фотоцитотоксичность

**FEATURES OF LOCALIZATION OF LIPOSOMAL FORMS OF
AMINO DERIVATIVES CHLORINE E_6 AND THEIR
PHOTODYNAMIC ACTIVITY**

Zorina T.E.

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher,
Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Department of Biophysics,
BSU, Minsk, Belarus
zorinate@mail.ru*

Kravchenko I.E.

*Senior Researcher, Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology,
Department of Biophysics, BSU, Minsk, Belarus
krav-irina@mail.ru*

Ermilova T.I.

*Junior Researcher, State Institution "Republican Scientific and Practical
Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology", Minsk, Belarus
tatyana.ig21@gmail.com*

Shman T.V.

*Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Immunological
Research, Scientific Department, State Institution "Republican Scientific and
Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology", Minsk,
Belarus
t_shman@yahoo.com*

A.V. Kustov

*Doctor of Chemistry, Professor, Institute of Chemistry of Solutions named
after G.A. Krestov Russian Academy of Sciences, Ivanovo, Russia
kustov@isuct.ru*

Berezin D.B.

*Doctor of Chemistry, Professor, Ivanovo State University of Chemical
Technology, Ivanovo, Russia
berezin@isuct.ru*

Zorin V.P.

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the
Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Department of Biophysics,
BSU, Minsk, Belarus
vpzorin@mail.ru*

This article is devoted to the study of the accumulation in cells of amino derivatives of the photosensitizer chlorin e₆ administered as solutions or as with lipid vesicles. The intracellular localization and photosensitizing activity of these compounds in cells were additionally studied. It was found that, regardless of the method of administration, all the compounds studied are localized mainly in the endoplasmic reticulum, Golgi complex, cell mitochondria and have a low level of localization in lysosomes. In contrast to the nature of intracellular localization, the overall level of accumulation of the studied compounds in cells, as well as the mechanisms of photosensitized cell damage, strongly depended on both the characteristics of the chemical structure and the method of administration of the photosensitizer.

Key words: photosensitizers, liposomes, chlorin e₆ amino derivatives, cell localization, photocytotoxicity.

Конструирование систем пассивного и/или направленного транспорта гидрофобных фотосенсибилизаторов (ФС) позволяет решить ряд проблем с их введением посредством повышения растворимости, влияния на уровень и кинетику накопления ФС в клетках и тканях и др. Основным действующим агентом при фотосенсибилизированных процессах в биологических системах является синглетный кислород (¹O₂). Поскольку время жизни ¹O₂ невелико (порядка 0,03-0,04 микросекунды) и длина свободного пробега молекулы за это время не превышает 0,1 мкм, внутриклеточная локализация ФС имеет существенное значение при оценке эффективности их действия [1]. В качестве транспортных систем применяют наночастицы разной природы. Липосомальные формы (ЛФ) ФС являются наиболее изученными наноструктурами, свойства которых оказывают значительное влияние на эффективность применения ФС. Следует отметить, что результаты применения ЛФ зависят как от свойств самого фотоактивного соединения, так и от структурных характеристик частиц-носителей.

Цель работы. Провести оценку влияния включения ФС с различной химической структурой в состав липидных нановезикул на характер локализации, уровень накопления и механизмы фотосенсибилизированного повреждения клеточных культур.

Материалы и методы. В работе использованы тетрапиррольные ФС хлоринового ряда с аминогруппами (АПХл e₆): 13(1)-(2-NNN-триметиламиноэтил)амид-диметиловый эфир хлорина e₆ иодид (АПХл1) и 13(1)-метиламид-17(3)-(2,3-дигидроксиметил-1,4-хиноксалиновый эфир) хлорина e₆ (АПХл2), синтезированные в Ивановском государственном химико-технологическом Университете (Иваново, Россия), а также хлорин e₆ (Хл e₆) производства Frontier Scientific (США).

Работа проведена на культуральных клетках лейкемической линии миелоидного происхождения К-562. Липосомы готовили из синтетического

насыщенного липида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), производства «Sigma» (США), на ручном экструдере Avanti Mini-Extruder (метод Бенгема), используя поликарбонатные мембранные фильтры «Nuclepore®» (УК) с порами 100 нм. Соотношение липид:пигмент 40:1.

Анализ локализации ФС в интактных клетках проводили на лазерном сканирующем конфокальном флуоресцентном микроскопе Leica TCS SPE (Германия). Изменения в клетках, индуцированные фотодинамическим воздействием, анализировали на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, США). Оценку числа некротически поврежденных клеток проводили с использованием пропидиума иодида (PI), апоптотических клеток – липофильного флуорохрома Mito Tracker® Red CMXRos – хлорметил-Х-розамина (CMXRos), чувствительного к изменениям трансмембранного потенциала митохондрий.

Результаты. Исследуемые АПХл е₆ в мономерной форме имеют близкие спектральные и фотофизические характеристики, что позволяет использовать величины интенсивности флуоресценции клеток в полосе испускания хлоринов для количественного сравнения уровней их внутриклеточного накопления. Включение АПХл е₆ в липосомы позволяет сохранить мономерное состояние ФС в водных растворах. Спектрально-флуоресцентные характеристики АПХл е₆ в составе липидных везикул, приготовленных экструзионным способом, практически не изменяются. Оценка интегральной флуоресценции единичных клеток показала, что при инкубировании в течение 2 часов в одинаковых условиях исследованные ФС, введенные в суспензию клеток в растворителях и в составе ЛФ имеют различный уровень накопления в клетках. Использование ЛФ для введения АПХл е₆ практически не влияет на кинетику накопления хлоринов в клетках, в тоже время увеличение центров связывания, при введении ФС в составе липосом, сопровождалось снижением их уровня накопления в клетках (рис. 1).

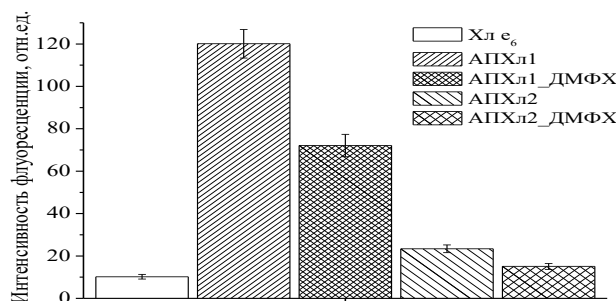


Рисунок 1. Накопление Хл е₆, АПХл е₆ и их ЛФ в клетках К 562. Время инкубирования – 120 минут; температура инкубирования 37 °С; концентрация клеток 1x10⁶/мл; концентрация хлоринов 5x10⁻⁶ моль/л.

Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными с использованием различных клеточных моделей, согласно которым основными факторами, определяющими уровень накопления и эффективность

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,
Минск, 25 января 2022 г.

сенсibilизации повреждения клеток, являются различия скоростей перераспределения ФС на плазматическую мембрану с белков сыворотки крови и наноносителей, а также скорость их трансмембранного переноса [2].

Использование колокализаторов для различных клеточных органелл позволило провести анализ характера внутриклеточного распределению АПХл е₆. Введение АПХл е₆ в липосомах оказывает существенное влияние на уровень накопления их в клетках, но не влияет на внутриклеточную локализацию АПХл е₆ (рис. 2). Показано, что АПХл е₆ и их ЛФ локализуются преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, комплексе Гольджи, относительно более низкий уровень накопления для них отмечен в митохондриях. При этом для флуоресценции АПХл е₆ и их ЛФ практически нет перекрытия с флуоресценцией лизосомального зонда. Для всех исследуемых ФС флуоресценция в области ядра клетки отсутствует.

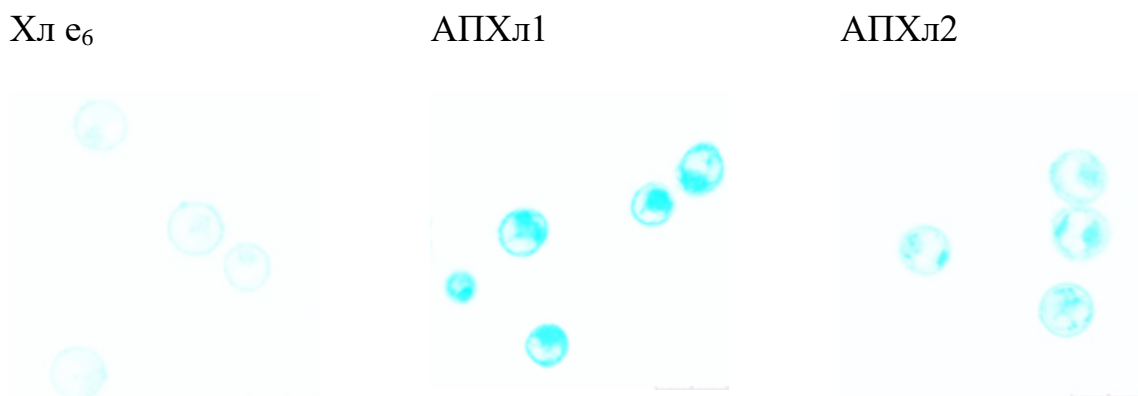


Рисунок 2. Изображения клеток K562, окрашенных Xл е₆, АПХл1 и АПХл2 в режиме флуоресценции (инвертированы) через 90 минут инкубирования. Концентрация пигмента $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$; температура инкубирования 37 °C; срезы клеток представлены для Z=12, число срезов – 20.

Результаты исследования сенсibilизации АПХл е₆ клеток K562 подтверждают наличие корреляции между уровнем накопления ФС и относительной эффективностью фотоповреждения клеток. Процент поврежденных клеток в образцах с Xл е₆ значительно ниже в сравнении с АПХл1, АПХл2. Существенной особенностью процессов фотоповреждения клеток K562 при использовании в качестве ФС АПХл е₆ и их ЛФ являются различия в относительном выходе апоптотически и некротически поврежденных клеток по сравнению с исследованными ранее этерифицированными производными Xл е₆ (ЭПХл е₆). При облучении клеток в присутствии ЭПХл е₆ и их ЛФ процент апоптотически поврежденных клеток значительно превышал процент числа клеток с поврежденной плазматической мембраной (некротические изменения) [2]. Особенностью фотосенсibilизации с участием АПХл1, АПХл2 и их ЛФ является высокий выход некротически поврежденных клеток.

Список литературы

1. Wua J. Photodynamic action of palmatine hydrochloride on colonadenocarcinoma HT-29 cells / J. Wua, Q. Xiao, N. Zhang, Ch. Xue, A. W. Leunga, H. Zhanga, C. Xua., Q.-J. Tangb. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2016. – Vol. 15. – P. 53-58.
2. Zorina T.E. Intracellular Localization and Phototoxicity Mechanisms of Chlorin e6 Derivatives and their Liposomal Formulations / T.E. Zorina, I.V. Yankovsky, I.V. Yakavets, I.E. Kravchenko, T.I. Ermilova, Shman T.V., M.V. Belevtsev, V.P. Zorin // Biophysics. – 2019. – Vol. 64, № 4. – P. 533-542.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, грант № M20P-279.