

УДК 577.3

ФОТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОРФИРИНОВ НА КЛЕТКИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА Saki-1

© 2021 г. А.Ф. Арутюнян, Л.Л. Тевонян, А.Д. Бениаминов, Е.Е. Егоров, Д.Н. Калюжный

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: uzhny@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2020 г.

После доработки 04.12.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

В рамках разработки и поиска фотосенсибилизаторов с возможно более узкой направленностью рассмотрены два типа тетрапиридиновых порфиринов: катионный порфирин P4 (TMРyP4) и его амфифильное производное порфирин P1, содержащее карбоксильные группы, а также их цинк-содержащие аналоги ZnP4 и ZnP1. Проведено сравнение физико-химических свойств двух классов молекул и исследовано их воздействие на клетки светлоклеточной карциномы почек Saki-1 в культуре. Соединения в микромолярных концентрациях не вызвали морфологических изменений клеток в отсутствие облучения светом. Обработка клеток порфирином P4 под действием синего света вызывала быстрое проявление цитотоксичности. Клетки начинали открепляться от субстрата, а на мембранах появлялись вздутия (блебы). Скорость этих изменений согласуется с прямым повреждением мембран, вызываемым порфирином P4. В аналогичных условиях соединение ZnP1 не вызывало никаких видимых изменения морфологии клеток Saki-1. Полученные результаты могут быть объяснены различной липофильностью соединений и, как следствие, их различной локализацией в клетке. Преимущественно мембранная локализация должна преобладать для более липофильного соединения P4 по сравнению с ZnP1, что может служить объяснением быстрого цитопатического эффекта.

Ключевые слова: порфирин, активные формы кислорода, клетки.

DOI: 10.31857/S0006302921020137

Фотодинамическая терапия опухолей одно из активно развивающихся направлений в настоящее время. Порфирины – перспективные молекулы для применения в фотодинамической терапии опухолей благодаря специфичному взаимодействию с клеточными структурами и способности генерировать активные формы кислорода [1, 2]. Фотохимическое действие приводит к направленному повреждению клеточных мишеней, тем самым вызывая гибель опухолевых клеток. В настоящее время ведется разработка и поиск фотосенсибилизаторов с определенной мишенью действия. Порфирины являются классом соединений, которые удобны для химической модификации с целью достижения целевых характеристик. Для доставки фотосенсибилизаторов в клетки и преодоления факторов гипоксии опухолей предлагаются различные носители, в том числе способные наряду с соединениями переносить кислород [3].

Тетрапиридилпорфирины рассматриваются как класс молекул, способных к взаимодействию с различными клеточными мишенями, одной из которых является ДНК. Для повышения растворимости соединений и лучшей доставки в клетки преимуществом обладают катионные формы. Для катионного порфирина TMРyP4 в малой концентрации (0.5 мкМ) изучено изменение экспрессии генов, при помощи полногеномного анализа последовательности РНК. Было обнаружено, что высокая доля измененных генов были функционально связаны с клеточной адгезией. В высокой же концентрации (2 мкМ) соединение TMРyP4 вызывало клеточную гибель [4]. TMРyP4 проявляет высокое сродство к ДНК, в частности к неканоническим G-квадруплексным структурам, образующимся теломерной последовательностью ДНК [5], тем самым являясь потенциальным агентом, снижающим активность теломеразы посредством конкуренции во взаимодействии с субстратом.

При выборе фотосенсибилизаторов, имеющих направленное действие на ДНК, необходимо изу-

Сокращение: DPBF – 1,3-дифенилисобензофуран.

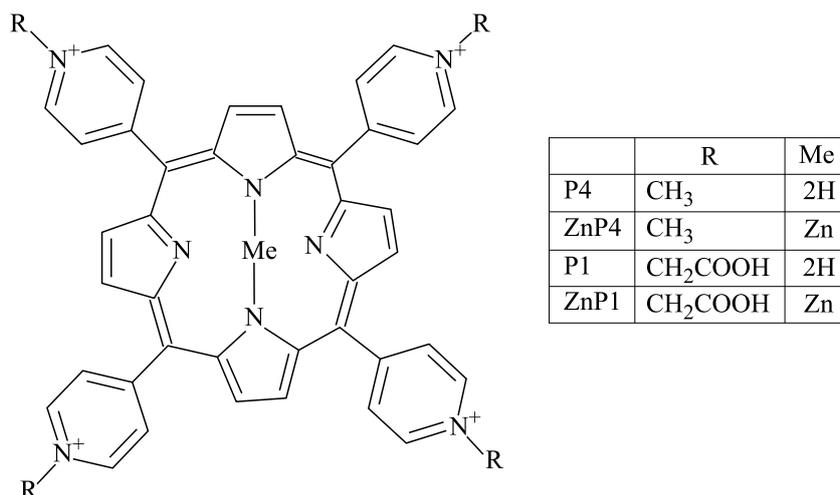


Рис. 1. Химическая структура порфиринов P1 (5,10,15,20-tetrakis(N-carboxymethyl-4-pyridinium)porphyrin) и P4 (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinium)porphyrin), а также их цинк-содержащих аналогов ZnP1 и ZnP4.

чение возможного побочного эффекта на альтернативные клеточные мишени. Первой потенциальной мишенью амфифильных фотосенсибилизаторов является клеточная мембрана. В данной работе исследована индуцируемая светом генерация АФК несколькими катионными порфиринами и фотоиндуцируемое действие на линию клеток светлоклеточного рака почки человека Saki-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Производные тетрапиридилпорфиринов, исследованные в работе, показаны на рис. 1. Соединение ZnP4 получено кипячением порфирина P4 (TMPyP4, Sigma Aldrich, США) в присутствии Zn(OH)₂. Соединение P1 получено, как описано в работе [6], путем реакции 2-бромуксусной кислоты с тетрапиридинпорфирином (Sigma Aldrich, США). Аналогичным образом, порфирин ZnP1 получен кипячением P1 в присутствии Zn(OH)₂ [7]. Структуры полученных соединений подтверждены методами ЯМР и масс-спектрометрии.

Способность производных порфирина генерировать синглетный кислород под действием света качественно оценена путем разложения 1,3-дифенилисобензофурана (DPBF) [7]. Растворы, содержащие 100 мкМ DPBF и 1 мкМ соединений, освещали в течение 15 мин с помощью синего света светодиода. Изменение концентрации DPBF определяли по поглощению при 415 нм в диметилсульфоксиде. Зависимость поглощения от времени облучения аппроксимировали экспоненциальным затуханием для определения характерного времени разложения DPBF в присутствии фотосенсибилизаторов.

Коэффициент распределения соединений в бинарной системе «октанол/вода» был рассчитан

как отношение равновесных концентраций соединения в октанол и в воде. Соответствующие концентрации определены спектрофотометрически по поглощению порфиринов в полосе Soret в октанол до и после добавления воды.

Спектры поглощения регистрировали в различных растворителях (вода, диметилсульфоксид, октанол) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм с использованием спектрофотометра V-550 (Jasco, США).

Saki-1 – культура, полученная из светлоклеточного рака почки человека. Она сохраняет ряд характеристик первичной культуры. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с содержанием глюкозы 4.5 г/л, с добавлением глутамина, гентамицина (40 мкг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Россия).

Клетки Saki были посажены в шестилуночные планшеты (Costar, США) за 24 ч до опыта. Далее в полную среду были добавлены порфирины до концентраций 1 или 10 мкМ (стоковые растворы порфиринов составляли 10 мМ в диметилсульфоксиде). Через час после добавления порфиринов клетки освещали светодиодным синим светом ($\lambda_{\max} = 470$ нм). Длительность облучения составляла 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение модификаций в молекулы порфиринов потенциально позволяет направлять их на различные мишени в клетке. Однако те же химические модификации влияют на проницаемость этих молекул в клетку, их растворимость, оптические свойства и т.д. В данной работе мы рассмот-

рели два типа тетрапиридиновых производных порфирина – P4 и P1, а также их цинксодержащие аналоги (рис. 1). Эти соединения зарекомендовали себя как лиганды ДНК. Как показано ранее *in vitro*, они имеют высокую аффинность к различным структурам нуклеиновых кислот. Чтобы ответить на вопрос, возможно ли их использование в качестве зондов для связывания нуклеиновых кислот *in cellulo*, необходимо подробно исследовать взаимодействие этих молекул с культурами эукариотических клетками: проницаемость, фототоксическое действие, возможную локализацию. Для этих целей была выбрана клеточная линия светлоклеточной карциномы почек человека Sak1-1 и определены фототоксические повреждения, вызываемые данными порфиринами. Предварительно исследованы физико-химические свойства молекул порфирина: спектральные характеристики, липофильность и способность генерировать активные формы кислорода.

Спектральные свойства и растворимость тетрапиридилпорфиринов. Порфириновые производные P4 и P1 отличались заместителями на пиридиновом кольце. В порфирине P1 гидрофобная метильная группа в P4 модифицирована введением отрицательно заряженной карбоксильной группы. Проведено сравнение спектров поглощения порфиринов P4, P1 и их цинксодержащих аналогов ZnP4 и ZnP1 в различных растворителях – воде, диметилсульфоксиде, октаноле. На рис. 2а приведены спектры поглощения порфириновых производных в воде. Максимум поглощения в полосе Соре зависит от присутствия цинка в порфириновом макроцикле. В металлопорфиринах ZnP4 и ZnP1 максимум сдвинут в длинноволновую область примерно на 20 нм относительно безметалльных производных P4 и P1. Спектр поглощения изученных соединений в растворителе диметилсульфоксиде практически не отличается от спектра водного раствора. При изменении растворителя на октанол наблюдался значительный сдвиг поглощения в длинноволновую область. Положение максимумов поглощения в октаноле и воде приведено в таблице.

Растворимость соединений в октаноле значительно зависит как от боковых заместителей на периферии макроцикла, так и от присутствия иона цинка внутри порфиринового ядра. Предельную концентрацию растворимости соединений в октаноле определяли после приготовления насыщенных растворов в комнатной температуре спектрофотометрически. Максимальная концентрация в октаноле соединения P4 с метильными заместителями составила порядка 70 мкМ. Оказалось, что предельная концентрация растворимости в октаноле в несколько раз падает как для цинкового производного ZnP4, так и при замене метильных групп на метилкарбоксильные (P1). Одновременное введение цинка и метилкарбок-

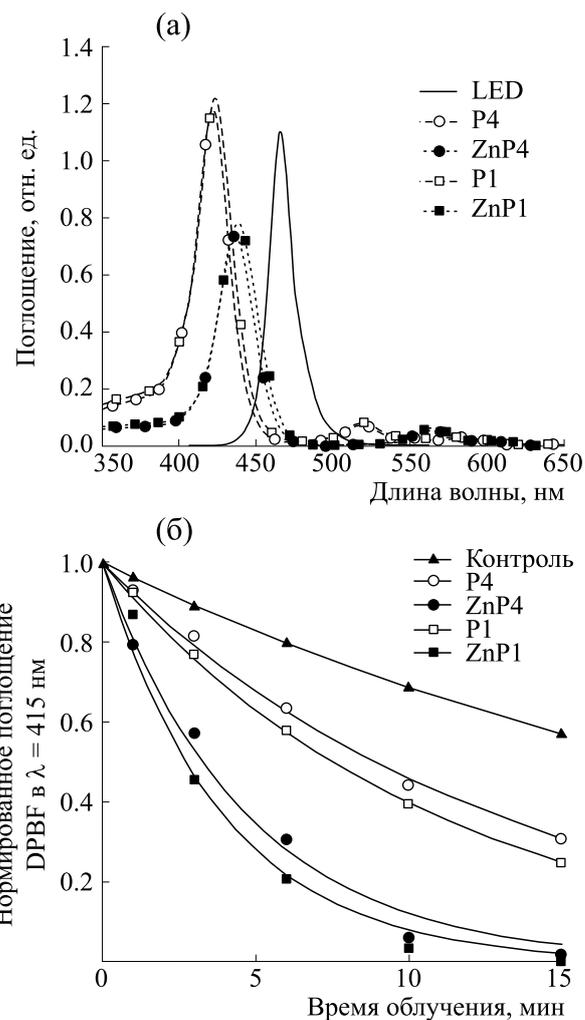


Рис. 2. (а) – Спектры поглощения порфиринов (P4, ZnP4, P1, ZnP1) в сравнении со спектром излучения светодиода (LED); (б) – фотодеградации DPBF в присутствии соединений.

сильных групп значительно снижало растворимость соединения ZnP1 в октаноле.

Длинноволновые сдвиги полосы поглощения характерны при изменении окружения соединений на менее полярное. Аналогичные сдвиги наблюдаются при взаимодействии порфириновых соединений с потенциальными клеточными мишенями (ДНК, белки, клеточные мембраны). Для направленного действия на клеточные мишени необходимо, чтобы спектр возбуждения фотосенсибилизатора совпадал со спектром источника света, ввиду этого мы использовали синий светодиод, для исследования воздействий на клетки индукции активных форм кислорода в растворе.

Сравнение липофильности соединений по коэффициенту распределения в системе «октанол/вода». Коэффициент распределения в системе «октанол/вода» определен по уменьшению концентра-

Физико-химические параметры производных порфирина

	Максимум полосы Соре в воде, нм	Максимум полосы Соре в октанолe, нм	Растворимость в октанолe, мкМ	$\log P$ (октанол : вода)	Характерное время разложения DPBF, мин
P4	422 ± 1	430 ± 1	68.0 ± 0.8	-1.4	12.8 ± 0.5
ZnP4	440 ± 1	457 ± 1	18.7 ± 1.5	-0.8	4.7 ± 0.3
P1	423 ± 1	435 ± 1	20.0 ± 0.9	-1.6	10.9 ± 0.3
ZnP1	441 ± 1	458 ± 3	2.7 ± 0.8	-2.4	3.9 ± 0.5

ции соединений в октанолe при добавлении воды к насыщенному раствору соединений в октанолe. Десятичный логарифм отношения концентраций в октанолe и воде для изученных соединений приведен в таблице. Найденный коэффициент распределения показывает, что соединения предпочтительно находятся в водной фазе, однако метилзамещенные соединения более липофильны. Для соединения ZnP1 наблюдалась самая маленькая концентрация в гидрофобной среде.

Генерация синглетного кислорода. Мы сравнили возможность индуцировать активные формы кислорода при возбуждении порфиринов синим светом. Способность порфиринов генерировать синглетный кислород можно оценить по измерению поглощения на длине волны 415 нм при деградации DPBF в диметилсульфоксиде. Этим методом исследованы фотофизические свойства водорастворимых производных порфирина, отличающихся включением металла в порфириновое ядро макроцикла и боковыми заместителями на периферии. Раствор, содержащий DPBF (100 мкМ) и порфирин (1 мкМ), облучали в течение 15 мин светом синего светодиода. На рис. 2б представлены нормированные кривые фотодеградации DPBF. Фотодеградация DPBF значительно усиливается в присутствии порфиринов, подтверждая, что они являются хорошими генераторами синглетного кислорода, который играет ключевую роль в ФДТ. Константа скорости фотодеградации DPBF (таблица) коррелирует с перекрыванием спектров поглощения соединений и спектром излучения светодиода, представленном на рис. 2а. Это согласуется с полученными ранее данными [7], что интенсивность генерации синглетного кислорода соединениями P4 и ZnP1 примерно одинакова при возбуждении белым светом. При этом растворимость в неполярном растворителе октанолe у этих двух соединений значительно отличалась, что может указывать на различную аккумуляцию соединений в клеточной мембране.

Цитотоксический эффект порфиринов под действием облучения светом. Наблюдение эффекта

порфиринов на клетки Saki-1 проводили через 30 мин после облучения синим светом светодиода, спектр которого представлен на рис. 2а. Прежде всего, стоит отметить, что мы не наблюдали никаких видимых изменений во всех случаях применения порфиринов в концентрации до 10 мкМ без освещения синим светом (рис. 3а,б,г). Клетки сохраняли обычную морфологию, наблюдалась митотическая активность.

Мы также не смогли увидеть изменений, вызванных порфирином ZnP1 после освещения (рис. 3в). В отличие от этого, через 30 мин после освещения клеток, которые инкубировали с порфирином P4, произошли заметные изменения (рис. 3д,е).

Все клетки начали округляться и терять контакт с подложкой. Это напоминало процесс начала митоза, когда до этого широко распластанные клетки, не теряя связь с субстратом (оставались контакты в виде тяжей), приобретали почти шаровидную форму (рис. 3е, черные стрелки). Одновременно на поверхности клеток появлялись выпячивания цитоплазмы («блебы»), имеющие разный размер (рис. 3е, белые стрелки), свидетельствующие о нарушении мембраны. Были обнаружены и уже погибшие клетки (рис. 3е, черные головки стрелок).

Обнаруженные морфологические изменения похожи на те, которые происходят в начале программируемой гибели клеток — апоптозе. Однако несмотря на схожесть, связать данные изменения с апоптозом сложно по нескольким причинам. Во-первых, на сроке 30 мин никакой апоптоз подобных клеток не может успеть завершиться (длительность апоптоза измеряется часами). Поэтому в любом случае на этом сроке было невозможно увидеть вызванную апоптозом фрагментацию ядер — довольно позднее событие для апоптоза прикрепленных клеток. Отличие состояло также в том, что на столь раннем сроке появлялись уже разрушенные клетки (рис. 1е, головки стрелок). Вероятнее всего, эти клетки погибли в результате повреждения мембраны и некроза.

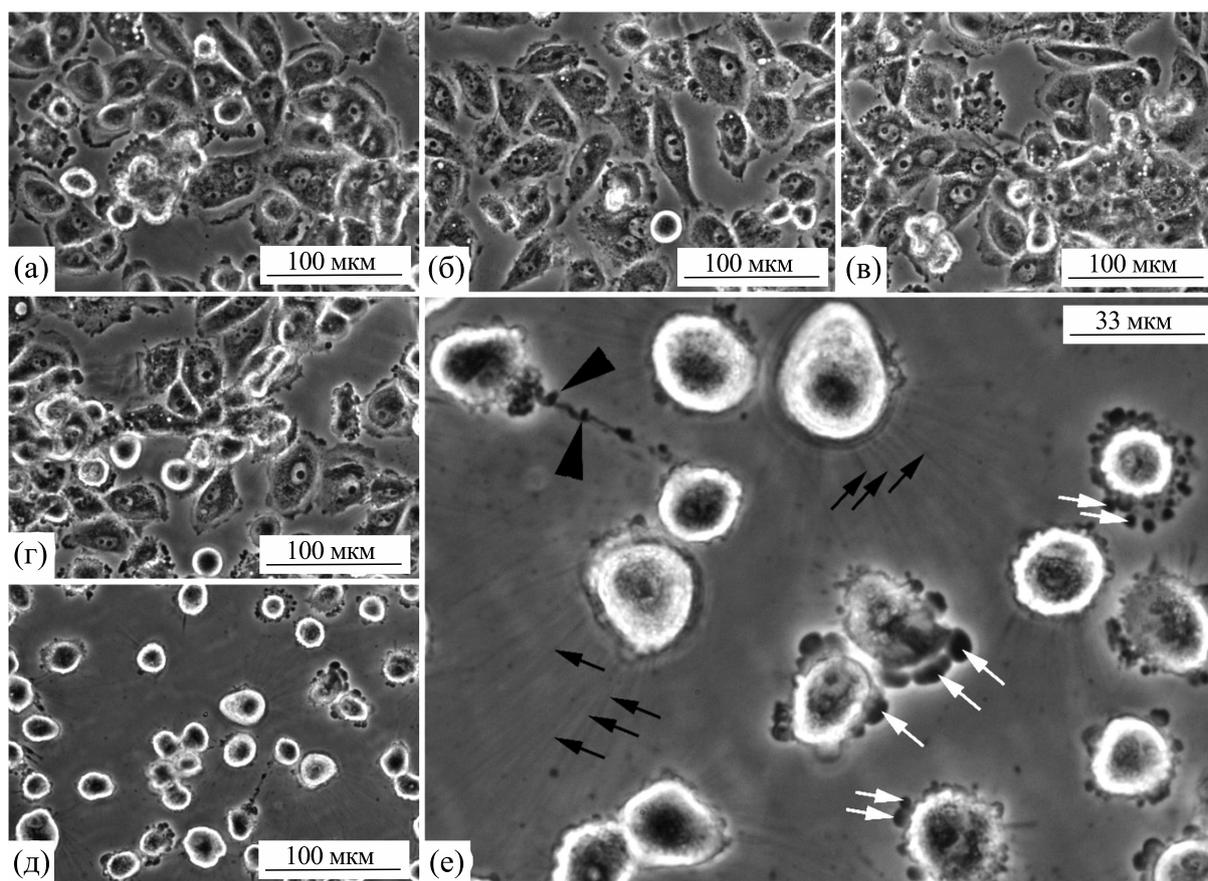


Рис. 3. Морфологические изменения клеток Саки под влиянием порфиринов и освещения: (а) – контрольные клетки, (б) – клетки через 30 мин инкубации с порфирином ZnP1, (в) – клетки с ZnP1 через 30 мин после освещения, (г) – клетки с P4 через 30 мин, (д) и (е) – клетки с P4 через 30 мин после освещения. На (е) белые стрелки – выпячивания плазмалеммы, черные стрелки – остатки клеточных креплений, головки от стрелок – остатки погибшей клетки. Фазовый контраст, цифровое контрастирование.

Также округлению клеток при апоптозе обычно предшествует потеря клеткой контактов с подложкой. В нашем случае контакты по большей мере сохранялись. Таким образом, морфологические изменения свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемые процессы были неуправляемыми и их исходной причиной было резкое изменение барьерных функций плазмалеммы.

Большинство порфиринов в процессах фотодинамической терапии оказывают цитотоксическое действие, что обычно является следствием взаимодействия порфиринов с множественными мишенями в клетке, в том числе повреждением мембран. Одиночные акты окисления в мембранах способны вызвать лавины реакций перекисного окисления липидов, оказывающие существенное действие на свойства мембран.

Порфирин P4 обладает более липофильными свойствами, чем порфирин ZnP1, поэтому можно ожидать, что его распределение в клетках сдвинуто в сторону мембран, а не цитозоля. Поэтому вполне логично, что при сравнении двух порфи-

ринов мы видим более сильное, а главным образом более быстрое действие более липофильного порфирина P4. Прямое повреждение мембран проявляется сразу, оно не нуждается в исполнении каких-либо предварительных химических реакциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из рассмотренных производных пиридиновых порфиринов ZnP1 является наиболее перспективным внутриклеточным зондом для направленного исследования структуры нуклеиновых кислот в клетке, в то время как быстрая цитотоксичность порфирина P4 обусловлена повреждением мембраны клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00332).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Malatesti, I. Munitic, and I. Jurak, *Biophys. Rev.* **9**, 149 (2017). DOI: 10.1007/s12551-017-0257-7
2. Y. Lin, T. Zhou, R. Bai, and Y. Xie, *J. Enzyme Inhibition & Med. Chem.* **35**, 1080 (2020). DOI: 10.1080/14756366.2020.1755669
3. E. V. Belyaeva, A. A. Markova, D. N. Kaluzhny, et al., *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* **18**, 617 (2018). DOI: 10.2174/1871520617666170719150834
4. X.-H. Zheng, X. Nie, H.-Y. Liu, et al., *Sci. Rep.* **6**, 26592 (2016). DOI: 10.1038/srep26592.
5. N. Konieczna, A. Romaniuk-Drapała, N. Lisiak, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2670 (2019). DOI: 10.3390/ijms20112670
6. M. B. Berezin, N. M. Berezina, A. S. Semeikin, and A. I. V'yugin, *Rus. J. Gen. Chem.* **77**, 1955 (2007). DOI: 10.1134/S1070363207110199
7. O. A. Kovaleva, V. B. Tsvetkov, O. K. Mamaeva, et al., *Eur. Biophys. J.* **43**, 545 (2014). DOI: 10.1007/s00249-014-0984-7.

Phototoxic Effect of Water-Soluble Porphyrins on Caki-1 Cells of Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma

A.F. Arutyunyan, L.L. Tevonyan, A.D. Beniaminov, Y.E. Yegorov, and D.N. Kaluzhny

*Engelhard Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

In order to develop and find photosensitizers which could be more suitable for target tissue, two types of tetrapyrroline porphyrins were used: cationic porphyrin P4 (TMPyP4) and its amphiphilic derivative porphyrin P1 containing carboxyl groups, and also their zinc-containing analogs ZnP4 and ZnP1. The physicochemical properties of these two classes of molecules were compared and their effects on clear cell renal cell carcinoma Caki-1 cells in the culture were investigated. Compounds in micromolar concentrations did not cause morphological changes in cells in the absence of light irradiation. The treatment of cells with porphyrin P4 under blue light led to rapid appearance of cytotoxicity. The cells began to detach from the substrate, and swellings (blebs) appeared on the membranes. The rate of these changes is consistent with direct membrane damage caused by porphyrin P4. Under similar conditions, compound ZnP1 did not cause any visible changes in the morphology of Caki-1 cells. The results obtained show that cells give different lipophilicity for the compounds and, as a consequence, they have different locations in the cell. On the whole, more lipophilic compound P4 unlike ZnP1 should be predominately located in a membrane, this may explain the rapid cytopathic effect.

Keywords: porphyrin, reactive oxygen species, cells