ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

544.525.4

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА ПИРОФЕОФОРБИДА-*а*

© 2021 г. М. А. Климович¹, Н. Н. Сажина¹, А. Ш. Радченко¹, Н. Ю. Герасимов¹, А. Е. Егоров¹, О. В. Неврова¹, А. В. Шибаева¹, А. О. Шкирдова^{1, 3}, А. А. Маркова², Е. С. Беляев³, И. А. Замилацков³, В. В. Спиридонов⁴, В. А. Кузьмин^{1*}, А. Б. Шевелёв¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия ²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия ³Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**E-mail: vak@sky.chph.ras.ru* Поступила в редакцию 02.07.2020; после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Для повышения биодоступности нерастворимого в воде метилового эфира пирофеофорбида-a (PPP-a) была приготовлена его липосомальная форма и изучены физико-химические и фотохимические свойства. Было установлено, что квантовый выход ${}^{1}O_{2}$ имел колоколообразную зависимость от концентрации PPP-a в липидной фазе липосом с максимумом при ее значении 31.6 мкмоль/г липидов. С помощью ИК-спектроскопии показано фотоиндуцированное образование альдегидных групп в липидной фазе липосом. Методом конфокальной микроскопии подтверждено внутриклеточное накопление PPP-a.

Ключевые слова: липосомы, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия. **DOI:** 10.31857/S0207401X21020084

введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является в настоящее время одним из перспективных методов лечения злокачественных опухолей. Этот метод отличается от традиционных методов лечения опухолей высокой избирательностью воздействия, отсутствием тяжелых системных осложнений при лечении, возможностью многократного повторения процедур [1]. Поглощение энергии света фотосенсибилизатором (ФС) приводит к фотохимическим реакциям с образованием активных форм кислорода (АФК): синглетного кис-

лорода ${}^{1}O_{2}$ и анион-радикала супероксида O_{2}^{-} , действие которых на опухолевые клетки ведет к их гибели.

Производные хлорофилла-*а* являются перспективными ФС для ФДТ. Метиловый эфир пирофеофорбида-*a* (PPP-*a*) является фотосенсибилизатором второго поколения на основе хлорофилла-*a*, имеет полосу поглощения в красной области спектра при 668 нм в дихлорметане с коэффициентом молярной экстинкции 45000 см⁻¹ · M⁻¹ [2]. Последние 20 лет активно исследуются влияние данного ФС на внутриклеточные сигнальные системы [3] и эффективность использования его в терапии карциномы толстой кишки HCT 116 и других карцином [4–6]. Пирофеофорбид-*а* нерастворим в водной среде, а добавление к его раствору в этаноле воды до концентрации в 30% приводит к агрегации красителя и снижению квантового выхода ${}^{1}O_{2}$ на два порядка по сравнению с мономерной формой, для которой квантовый выход ${}^{1}O_{2}$ составляет 50–80% [7].

При добавлении неионного ПАВ к водному раствору феофорбида агрегированные формы PPP-*a* преимущественно переходят в мономерную форму [8]. Для повышения биодоступности, фотосенсибилизирующих свойств PPP-*a* и селективности к опухолевым клеткам используются различные наноконтейнеры [9–12]. Распространенным типом контейнеров для доставки лекарственных средств являются липосомы на основе природных лецитинов, которые хорошо растворимы в биологических жидкостях, имеют повышенное сродство к опухолевым клеткам, защищают ФС от разрушения и не вредны для организма [13–16]. Липосомы позволяют донести включенные в них

фотосенсибилизаторы по кровеносному руслу до опухоли. Это расширяет возможности их применения в фотодинамической терапии, в основе которой лежат фотоиндуцированные окислительные процессы, приводящие к гибели опухолевых клеток по апоптотическому и некротическому путям.

Ключевой проблемой разработки противоопухолевых средств, обеспечивающих продление жизни больных, является обеспечение избирательности действия цитотоксических агентов в отношении раковых клеток при минимальной токсичности в отношении нормальных клеток организма [1]. В случае свободных фотосенсибилизаторов порфиринового ряда селективность достигается за счет того, что in vivo эти гидрофобные соединения практически полностью включаются в комплексы с альбумином, имеющим специальные карманы или полости, или с липопротеинами низкой плотности. за счет взаимолействия с их гидрофобными областями, для транспортировки водонерастворимых соединений (жирных кислот, стеролов, билирубина и других) по кровяному руслу.

Аномально высокая по сравнению с нормальными клетками катаболическая активность опухолевых клеток приводит к ускоренному поглощению ими транспортных белков крови, выполняющих в организме трофическую функцию, в результате чего происходит ускоренное накопление порфиринов в очагах опухолевого роста. При включении ФС в липосомы этот эффект полностью исключается [17], однако при использовании липидов определенного состава, в частности димиристоил-L-а-фосфатидилхолина, удается достигнуть эффективной передачи ФС из липосом в плазматическую мембрану опухолевой клетки без слияния и даже прямого контакта клеточной и липосомной мембран между собой [18].

Целью настоящей работы было изучение физико-химических основ, обеспечивающих бесконтактную передачу PPP-*a* из липосом в опухолевые клетки, в частности выбор концентрации ФС, обеспечивающей наибольшую стабильность липосомных наноконтейнеров при их хранении и циркуляции в кровяном русле. Выполнено исследование темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности липосомальной формы PPP-*a* на культуре клеток карциномы толстой кишки человека HCT 116.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление липосом

Для приготовления липосом использовали суспензию соевого лецитина в концентрации 1 мг/мл (1.29 мМ) марки L-α-фосфатидилхолин производства компании Sigma-Aldrich (USA) в фосфатном буфере (1 мМ, pH 7.4). В состав лецитина данной марки входило два основных фосфолипида: фосфатидилхолин — 63% и фосфатидилэтаноламин — 32%. Содержание жирных кислот в % к общему их количеству составило: пальмитиновая — 17, стеариновая — 4, олеиновая — 9, линолевая — 60, линоленовая — 7.

Смесь перемешивали в течение 20 мин в шейкере, добавляя от 7 до 100 мкл раствора PPP-а с концентрацией 9.1 мМ в толуоле. Липосомы формировали с использованием ультразвукового гомогенизатора VCX-130 производства компании Sonics & Materials (USA) в течение 15 мин при мощности 70 Вт. Для предохранения липосом от окисления во время ультразвуковой обработки сосуд с суспензией помещали в смесь воды со льдом. Дисперсию липосом центрифугировали при T = 4°C в течение 20 мин при 13000 об/мин. Для регистрации люминесценции синглетного кислорода суспензии липосом были приготовлены с применением тяжелой воды.

Спектральные измерения

Спектры поглошения и флуоресценции снимали в кварцевых кюветах размером 10 мм × 4 мм на спектрофотометрах Shimadzu UV-3101 PC (Япония), Perkin Elmer Lambda-25 (США) и на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама (Россия) [19, 20]. Для инициирования окисления липосом использовали водорастворимый инициатор ААРН – 2.2'азо-бис(амидинопропан)дигидрохлорид производства компании Acros Organics (USA). Кинетику образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов регистрировали на длине волны максимума их поглощения $\lambda = 234$ нм при физиологической температуре (37°С) [20]. Диеновы коньюгаты являются начальными продуктами ПОЛ и образуются в результате миграции двойных связей при отрыве протона от метиленовой группы, окруженной двойными связями.

Времена жизни флуоресценции PPP-*a*, включенного в липосомы, измеряли при 678 нм на времяразрешенном спектрофлуориметре Fluotime 300 PicoQuant (Germany): фотовозбуждение от лазера Solea при 507 нм. Времена жизни люминесценции синглетного кислорода измеряли на этом же приборе при 1275 нм. Фотовозбуждение PPP-*a* проводили с помощью ксеноновой лампы при 543 нм. Образцы разводили до значений поглощения 0.065–0.07 на длине волны $\lambda = 543$ нм. Для расчета квантового выхода синглетного кислорода аналогичные измерения были сделаны и для раствора бенгальского розового в тяжелой воде.

Анизотропию флуоресценции свободного PPP-*a* в дихлорметане и в составе водной суспензии липосом измеряли также на Fluotime 300 PicoQuant: фотовозбуждение поляризованным светом от лазера LDH 405 при 398 нм, флуоресценция (поляризованный свет) при 680 нм.

Метод динамического светорассеяния

Для определения размеров липосом в суспензии использовался метод динамического светорассеяния. Измерения среднего диаметра липосом проводили на высокочувствительном приборе Zetasizer Nano ZS (Great Britain) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного на липосомах под углом 173° лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм. Концентрация лецитина в суспензии липосом составляла 0.5 мг/мл, температура – 25°С, индекс полидисперсности варьировался в пределах 0.21-0.26. Для каждого размера выполняли регистрацию 5-10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями в каждом измерении; усреднение проводили по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Для измерения ζ -потенциала (*Z*) липосом этот же прибор использовался в режиме регистрации электрофоретической подвижности частиц. Усреднение максимальных значений ζ-потенциала выполняли по результатам трех измерений, погрешность измерений не превышала 10%.

Определение вязкости компонентов в липосомах

Текучесть липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил, синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН. Глубина расположения нитроксильного радикала в липосомах составляла 0.2–0.4 нм. Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной диффузии (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны. Регистрацию спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре ER 200D-SRC компании Bruker (Germany).

ИК-спектроскопия

Измерение методом ИК-спектроскопии проводили на приборе Specord (M80 Carl Zeiss, Germany). Спектры регистрировали в диапазоне волновых чисел от 1000 до 2000 см⁻¹. Образцы наносили в виде водных суспензий на стекло марки КРС-5 (объем суспензии составлял 3 мкл) и прижимали вторым таким же стеклом. Условия облучения красным светом кювет с суспензиями липосом аналогичны условиям опытов, проведенных с клетками (светофильтр КС-11, 30 Дж/см²).

Культивирование клеток НСТ 116

В работе использовали клеточную линию аденокарциномы кишки НСТ 116. Клетки культивировали в питательной среде DMEM производства компании ПанЭко (Россия). В культуральные среды добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (GE LifeSciences, USA), 2 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия), 100 ед/мл пенициллина (ПанЭко, Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием СО₂. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста.

Для проведения экспериментов на клетках карциномы толстой кишки НСТ 116 была приготовлена суспензия липосом с концентрациями лецитина и PPP-*a* в них соответсвенно 1 мг/мл и 31.7 мкМ. Данная концентрация PPP-*a* была выбрана как наиболее эффективная по результатам спектральных исследований.

Конфокальная спектроскопия

Для определения локализации PPP-а и подтверждения генерации АФК использовался метод конфокальной микроскопии. Клетки НСТ 116 инкубировали с липосомами в конечной концентрации РРР-а, равной 3.5 мкМ, в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе. Далее их (клетки) промывали и инкубировали с флуоресцентными клеточными маркерами: Hoechst 33342 (концентрация — 0.01 мг/мл, $\lambda_{ex} = 405$ нм/ $\lambda_{em} = 415-470$ нм), LysoTrackerTM Green DND-26 (0.05 MKM, λ_{ex} = = 488 нм/ λ_{em} = 500–580 нм), ER-Tracker^{тм} Green (1 мкМ, $\lambda_{ex} = 488$ нм/ $\lambda_{em} = 510-570$ нм), Dihydror-hodamine 123 (10 мкМ, $\lambda_{ex} = 488$ нм/ $\lambda_{em} = 510-$ 570 нм), пропидия иодид (0.1 мг/мл) согласно методике производителя (Thermo Fisher Scientific, USA). Регистрацию результатов осуществляли на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE 5 (Leica Microsystems GmbH, Germany).

Проведение экспериментов in vitro

Клетки НСТ 116 инкубировали в суспензии липосом с конечными концентрациями 0.06– 0.33 мг/мл в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе. Затем клетки освещали галогеновой лампой через красный светофильтр КС-11 (Оптические лазерные технологии, Россия) с пропусканием в области свыше 610 нм. Дозы освещения составили 0– 60 Дж/см². Для предотвращения нагревания использовали теплоотведение насыщенным раствором нитрата натрия. В темновом варианте эксперимента клетки не освещали, оставляя в инкубаторе. После освещения или темновой инкубации клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч для развития эффектов гибели и анали-



Рис. 1. Структурная формула метилового эфира пирофеофорбида-*а*.

зировали жизнеспособность клеток методом МТТ-теста. Показатели выживаемости рассчитывали в процентах как отношение оптической плотности растворов формазана в диметилсульфоксиде в экспериментальных лунках к среднему значению в контрольных лунках (клетки без препаратов). Каждую пробу анализировали в трех повторах, погрешность измерений не превышала 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические свойства суспензий липосом с различной концентрацией в них метилового эфира пирофофорбида-а

Метиловый эфир пирофеофорбида-*a*, обозначаемый в зарубежных источниках как PPME, является тетрапиррольным соединением, практически нерастворимым в воде (его структурная

формула приведена на рис. 1). Для исследования фотохимических и физико-химических свойств липосомальной формы РРР-а были приготовлены шесть видов липосом: "чистые" липосомы (без РРР-а) и липосомы с концентрациями РРР-а в липидной фазе, составляющими 3.4, 9.1, 32.9, 48 и 75 мкмоль/г липидов; так как концентрация лецитина в водной суспензии составляла 1 мг/мл, то моляльные концентрации РРР-а в липидной фазе числено совпадают с молярными в водной суспензии. На спектрах РРР-а (рис. 2) видны две основные полосы поглощения: Сорэ с максимумом при $\lambda = 417$ нм и *Q*-полосы в красной области спектра с максимумом при $\lambda = 673$ нм; последняя используется для возбуждения ФС при выполнении ФЛТ. Кроме этих полос. РРР-а имеет несколько менее выраженных максимумов поглощения при 512, 542 и 615 нм.

Кинетические кривые инициированного ААРН окисления липосом с приведенными в подписи к рис. 2 концентрациями РРР-а представлены на рис. 3. Видно, что РРР-а дозозависимо тормозит окисление, что свидетельствует о проявлении этим ФС антиокислительных свойств. Еще, по-видимому, РРР-а значительно структурирует бислой липосом, что способствует уменьшению проникновения кислорода в липосому и снижению скорости окисления (происходит ингибирование окисления липидов в липосоме). Аналогичные эффекты были ранее описаны в работах [20, 21]. Применяя хемилюминесцентные методы, можно получить более точную картину антиокислительного действия РРР-а. Особенности изучения ингибированного окисления подробно рассмотрены в работе [22]. Результаты по измерению вязкости бислоя липосом приведены на рис. 4.

Пирофеофорбид-*a*, встроенный в липидную мембрану, сложным образом изменяет ее микровязкость. Порфирины в малых концентрациях



Рис. 2. Спектры поглощения липосом: *0* – без РРР-*a*, *1* – с концентрацией РРР-*a*, равной 3.42 мкмоль/г липидов, *2* – 32.9 мкмоль/г липидов. Разбавление исходных липосом в 4 раза.

координируют вокруг себя молекулы липидов, способствуя их более плотной упаковке в мембране. При концентрации PPP-*a*, равной 32.9 мкмоль/г липидов, наоборот, микровязкость снижается, а выход на плато происходит при концентрациях более 48 мкмоль/г липидов. Липидные фазы "чистых" липосом и липосом, содержащих 9.1 мкмоль/г липидов PPP-*a*, имели близкие значения микровязкости. Механизмы данных эффектов рассмотрены в работе [23], а локальная динамика и локальная организация мицеллярной фазы показаны в работе [24].

Влияние различного содержания РРР-а в липосомах видно и по изменению размеров липосом и их ζ-потенциала (рис. 5). При малых концентрациях PPP-а наблюдался рост среднего диаметра D липосом, однако уже при концентрации 32.9 мкмоль/г липидов значение *D* становится сопоставимым с диаметром "чистых" липосом и далее уменьшается с увеличением концентрации РРР-а. Наибольшее абсолютное значение отрицательного ζ-потенциала и максимальный размер липосом достигались при концентрации РРР-а, равной 9.1 мкмоль/г липидов, при которой, по-видимому, значительно структурируется бислой липосом. Увеличение их поверхностного заряда способствовало уменьшению агрегации частиц. Следует отметить, что значения ζ-потенциала липосом менее -30 мВ свидетельствуют о высокой стабильности суспензии.

Люминесцентные характеристики водной суспензии липосом с PPP-а

При формировании водной суспензии липосом PPP-*a* включался в липидную фазу мицелл, что доказывается данными анизотропии флуоресценции: для "свободного" PPP-*a*, растворенного в CH₂Cl₂, время вращательной корреляции $\tau_c = (0.09 \pm 0.013)$ нс, а для PPP-*a* в составе водной суспензии липосом ввиду более высокой вязкости липидов $\tau_c = (4.7 \pm 0.24)$ нс (рис. 6).

Растворенный в CH₂Cl₂ PPP-*а* при возбуждении лазерным излучением с длиной волны $\lambda = 410$ нм имел квантовый выход возбужденного синглетного состояния $\phi_f = 0.66$, время жизни $\tau_{1f} = 6.5$ нс и $\phi(\Delta^1 O_2) = 0.78$. При включении PPP-*a* в состав бислоя липосом времена жизни τ_{1f} снижались при увеличении его концентрации в липидной фазе (табл. 1).

Были получены спектры флуоресценции липосом (рис. 7). Видно, что интенсивность флуоресценции PPP-*a* в составе липосом имеет колоколообразную зависимость от концентрации ФС с максимумом ее значения при 32.9 мкмоль/г липидов.

Для определения квантового выхода $\phi(\Delta^1 O_2)$ были приготовлены суспензии липосом в тяжелой



Рис. 3. Кинетические кривые образования диеновых конъюгатов при инициированном ААРН окислении липосом: 0 – без PPP-a, 1 – с концентрацией PPP-a, равной 3.42 мкмоль/г липидов, 2 – 32.9 мкмоль/г липидов; A – оптическая плотность ДК при λ = 234 нм, [лецитин] = 0.1 мг/мл, [ААРН] = 0.3 мМ.



Рис. 4. Зависимость времени корреляции вращательной диффузии (τ_c) зонда от концентрации PPP-*a* в липидной фазе липосом.



Рис. 5. Зависимость среднего размера *D* и ζ-потенциала липосом от концентрации PPP-*a*.



Рис. 6. Анизотропия флуоресценции PPP-а в растворе CH₂Cl₂ (а) и в составе водной суспензии липосом (б).

воде с сопоставимыми концентрациями PPP-*a*. Время жизни ${}^{1}O_{2}$ в тяжелой воде в среднем составляет 60–68 мкс, что на порядок больше, чем в водных растворах (3.9 мкс). Результаты, представленные на рис. 8, показывают, что наибольший квантовый выход ${}^{1}O_{2}$ был в суспензии липосом с концентрацией PPP-*a*, равной 31.6 мкмоль/г липидов.

Образование димеров и агрегатов при высоких концентрациях PPP-*a* в липидной фазе приводило к уменьшению выхода триплетных состояний мономерного соединения PPP-*a* и, следовательно, к падению квантового выхода синглетного кислорода.

Фотосенсибилизаторы, инициирующие процессы перекисного окисления липидов

В основе фотохимических реакций II типа лежит генерация триплетным ФС синглетного кислорода, который окисляет ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов до их гидропероксидов. Продукты более глубокого окисления липидов являются ре-

Таблица 1. Фотохимические характеристики липосом с различной концентрацией PPP-*a*

	-	
[PPP- <i>a</i>], мкмоль/г липидов	$ au_{lf}$, нс	χ^2
3.42	7.90 ± 0.03	0.82
9.1	5.38 ± 0.03	1.19
32.9	4.20 ± 0.01	1.06
48	3.24 ± 0.04	1.33
75	2.07 ± 0.04	1.09

Примечание: χ^2 – параметр оценки сходства экспериментальных данных с ожидаемыми значениями.

зультатом фотохимических реакций І типа, связанных с переносом электронов. Так, триплетный ФС образует из гидропероксидов жирных кислот высокореакционные пероксильные или алкоксильные радикалы, последние из которых превращаются в альдегиды [25]. Непосредственный отрыв протона от ненасыщенной жирной кислоты триплетным ФС приводит к образованию алкильного радикала и далее – пероксильного радикала, который участвует в разветвленных цепных реакциях ПОЛ. Наиболее цитотоксичными продуктами окисления липидов являются спирты, кетоны и особенно альдегиды, которые деформируют липидный бислой [26] Для определения вклада фотохимических реакций I типа в окислении липидов методом ИК-спектроскопии были проведены исследования образцов суспензий липосом с различными концентрациями РРР-а.

ИК-спектры поглощения суспензий липосом

Окисление липидов контролировали по появлению характерной полосы (плеча) в ИК-спектре при 1740 см⁻¹ (указана стрелкой на рис. 9). Эта полоса свидетельствует об образовании фрагмента, содержащего группу С=О в процессе окисления липидов. Обнаруженный результат свидетельствует, очевидно, о появлении альдегидной группы в составе окисленных липидов после фотоактивации суспензии липосом с концентрацией PPP-*a*, равной 3.42 мкмоль/г липидов.

Исследование темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности липосомальной формы PPP-а на клетках карциномы толстой кишки человека HCT 116

В настоящее время вопрос о распределении ФС ряда порфиринов среди клеточных компарт-



Рис. 7. Спектры флуоресценции водной суспензии липосом с различной концентрацией PPP-a, мкмоль/г липидов: I - 3.4, 2 - 9.1, 3 - 32.9, 4 - 48, 5 - 75. На вставке – интенсивность флуоресценции (I) липосом при 678 нм (разведение суспензии в 10 раз).

ментов не решен. Одни авторы [18, 27] обнаружили преимущественно митохондриальную локализацию порфиринов, тогда как другие [28, 29] указывали на их тропность к мембранам эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. В работе [18] было показано, что облучение клеток HCT 116, нагруженных PPP-*a* с использованием липосом, приводит к их гибели преимущественно по пути некроза, а не апоптоза, что ставит под сомнение факт преимущественного накопления этого ФС в митохондриях.

Полученные нами результаты показали, что краситель локализован главным образом в цитоплазме, в ядре сигнала практически не наблюдалось (рис 10). В результате наложения сигнала от PPP-*a* на сигналы от клеточных красителей DHR 123, ER-Tracker и Lysotracker (LT) не удалось установить точную локализацию PPP-*a* ввиду его высокой фотосенсибилизирующей активности, которая приводила к быстрому нарушению нормальной морфологии клетки при возбуждении лазером в ходе выполнения микроскопического исследования. Во всех случаях наблюдалось перекрывание сигналов (рис. 11).

Краситель DHR 123 способен улавливать АФК в клетке, в результате чего он переходит в флуоресцирующую форму (родамин 123), а его катионная природа способствует накоплению этого красителя в митохондриях клеток. На рис. 12 для контрольного образца (*a*) и образца с "чистыми"

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА том 40 № 2 2021

липосомами (б) виден сигнал от митохондрий клеток. В образце с PPP-*а* наблюдалось "разгорание" сигнала, связанного с генерацией АФК.

Облучение клеток красным светом в присутствии PPP-*а* приводило к образованию АФК, что



Рис. 8. Квантовый выход ${}^{1}O_{2}$ в суспензии липосом, приготовленных на тяжелой воде (D₂O), в зависимости от концентрации PPP-*a* в липидной фазе.



Рис. 9. ИК-спектры поглощения водных суспензий липосом с различными концентрациями PPP-*a* в мкмоль/г липидов (числа у кривых) в липидной фазе до (*a*) и после (*б*) облучения красным светом.



Рис. 10. Распределение РРР-а в клетке.

вызывало окислительную деструкцию и деградацию мембранных систем клетки. Это отчетливо видно по остаткам эндоплазматического ретикулума, окрашенного красителем ER-tracker, и по слабому сигналу от лизосом, окрашенных красителем LT. В контрольных пробах и в пробах с липосомами сохранялась нормальная морфология клеток HCT 116.

Главным подтверждением фотоиндуцированной гибели содержащих PPP-*а* клеток карциномы HCT 116 после инкубации с липосомами является проникновение в ядра клеток йодида пропидия PI (рис. 13). Этот флуоресцентный краситель не способен проникать через мембрану живых клеток, и окрашивание ядра возможно только в результате перфорации клеточных мембран.

Используя питательную среду DMEM, готовили серию разведений суспензии липосом с концентрацией липидов в фосфатном буфере 0.06, 0.11, 0.2 и 0.33 мг/мл, которые соответствовали содержанию PPP-*a* в водных растворах 1.9, 3.5, 6.3 и 10.5 мкМ. Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что липосомальная форма PPP-*a* в исследованных концентрациях не имела темновой



Рис. 11. Наложение флуоресцентного сигнала от PPP-*a* и клеточных маркеров: a - DHR 123, $\delta - ER$ -Tracker, e - LT.

Краситель	а	б	в
DHR 123	DHR 123	DHR 123	DHR 123
ER-Tracker	5 MKM ER-Tracker	ER-Tracker	ER-Tracker
LT	S MKM		Smem

Рис. 12. Визуализация клеточных органелл красителями DHR 123 (митохондрии), ER-Tracker (эндоплазматический ретикулум) и LT (лизосомы) в контроле (*a*), после инкубации с "чистыми" липосомами (*б*) и с липосомами, содержащими PPP-*a* (*в*).

цитотоксичности. Увеличение доз облучения с 30 до 60 Дж/см² не приводило к ускорению фотоиндуцированной гибели клеток карциномы HCT 116. Липосомы без фотосенсибилизатора при этом вызывали незначительный рост числа опухолевых клеток.

В работе [18] показано эффективное накопление PPP-*a* после двадцатичасовой инкубации клеток HCT 116 с липосомальной формой PPP-*a* в концентрации 2 мкМ. В наших экспериментах мы также не видим существенного повышения клеточной гибели с ростом концентрации PPP-*a* выше 1.9 мкМ.

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА том 40 № 2 2021

Таким образом, липосомальная форма PPP-*a* обладала концентрационными ограничениями при ее использовании ФДТ, а низкая темновая цитотоксичность липосомальной формы PPP-*a* дает возможность многократного повторения процедур ФДТ. Необходимо отметить тот факт, что ФС, включенные в липидный бислой липосом, при действии света запускают процессы, ведущие к нарушению целостности липосом. В работе [30] рассматриваются молекулярные основы использования этого эффекта для оптимального выделения под действием света заключенных в липосомах лекарственных препаратов, что должно значительно по-



Рис. 13. Визуализация (Ное) клеточных ядер, накопление пропидия йодида (PI) в клеточном ядре и наложение обеих картинок (Ное + PI) в контроле (*a*), после инкубации с "чистыми" липосомами (*б*) и с липосомами, содержащими PPP-*a* (*в*).

высить эффективность ФДТ. Применение PPP-*а* в этом качестве имеет, на наш взгляд, хорошие перспективы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что фотоиндуцированное образование альдегидных групп в липидной фазе липосом, содержащих PPP-*a*, оказалось слабовыраженным, что свидетельствует о малом вкладе фотохимических реакций I типа в окислительное повреждение липидов. В механизме

Таблица 2.	Процент (%) выживших клеток линии
НСТ	`116 по результатам МТТ-теста

[PPP- <i>a</i>], мкмоль/г липидов	Доза облучения, Дж/см ²			
	0	30	60	
1.9	100.0	32.1	29.8	
3.5	100.1	23.5	29.8	
6.3	103.3	21.7	29.8	
10.5	102.3	32.2	23.3	

фотосенсибилизации преобладающими были фотохимические реакции II типа, связанные с переносом энергии и генерацией синглетного кислорода. Квантовый выход последнего достигал максимального значения при концентрации PPP-*a* 31.6 мкмоль/г липидов. Результаты, полученные в экспериментах на клетках карциномы HCT 116, показали, что липосомальная форма PPP-*a* нетоксична в рассматриваемых условиях и при этом обладает выраженной фототоксичностью. Максимальная фотохимическая эффективность липосомальной формы PPP-*a* проявляется при его концентрации в липидной фазе 31–33 мкмоль/г липидов.

Спектроскопические измерения проведены на базе ЦКП "Новые материалы и технологии" ИБХФ РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским научным фондом по проекту № 18-13-00463 "Механизмы фотохимических процессов в комплексах полиметиновых красителей с двумя сопряженными хромофорами и белков".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Yano S., Hirohara S., Obata M. et al.* // J. Photochem. Photobiol. C. 2011. V. 12. № 1. P. 46.
- Pandey R.K., Bellnier D.A., Smith K.M. et al. // Photochem. Photobiol. 1991. V. 53. P. 65.
- Matroule J.Y., Bonizzi G., Morliere P. et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 2988.
- Sun X., Leung W.N. // Photochem. Photobiol. 2002. V. 75. P. 644.
- 5. Roder B., Hackbarth St., Korth O. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 348. P. 413.
- Xu C.S., Leung A.W. // Med. Sci. Monit. 2006. V. 12. P. 257.
- Wang K.-K., Li J., Kim B.-J. et al. // Intern. J. Photoenergy. 2014. P. 793.
- Krasnovsky A.A., Jr., Neverov K.V., Egorov S.Y., Reder B. // Opt. Spectrosc. 1988. V. 64. № 4. P. 790.
- Roeder B., Hackbarth St., Korth O. et al. // Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities. 1996. V. 179. P. 2625.
- Ponomarev G.V., Solovieva M.N., Dugin N.O. et al. // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. P. 5420.
- 11. Buchholz J., Kaser-Hotz B., Khan T. et al. // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 20. P. 7538.
- Yoon II, Jia Zhu Li, Young Key Shim // Clin. Endosc. 2013. V. 46. P. 7.
- 13. Барышников А.Ю. // Вестн. РАМН. 2012. № 3. С. 23.
- 14. *Röder B., Hanke T., Oelckers S. et al.* // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2000. V. 4. № 1. P. 37.
- 15. *Tran M.A., Watts R.J., Robertson G.P.* // Pigm. Cell Melanoma Res. 2009. V. 22. № 4. P. 388.

- 16. *Ikeda A., Doi Y., Nishiguchi K. et al.* // Org. Biomol. Chem. 2007. V. 5. № 8. P. 1158.
- 17. Düzgünes N., Piskorz J., Skupin-Mrugalska P. et al. // Ther. Deliv. 2018. V. 9. № 11. P. 823.
- Guelluy P.-H., Fontaine-Aupart M.-P., Grammenos A. et al. // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. V. 1258. № 9. P. 1252.
- 19. *Кузьмин В.А., Волнухин В.А., Егоров А.Е. и др. //* Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 3.
- 20. *Сажина Н.Н., Антипова А.С., Семенова М.Г. и др. //* Биоорган. химия. 2019. Т. 45. № 2. С. 34.
- 21. Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б., Шаталова О.В. и др. // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 5. С. 91.
- 22. Русина И.Ф., Карпухин О.Н., Касаикина О.Т. // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 8. С. 49.
- 23. Герасимов Н.Ю., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 7. С. 82.
- 24. Вассерман А.М., Отдельнова М.В., Захарова Ю.А. и др. // Хим. физика. 2005. Т. 24. № 3. С. 29.
- 25. Bacellar I.O.L., Oliveira M.C., Dantas L.S. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 2018. V. 140. № 30. P. 9606.
- Bacellar I.O.L., Baptista M.S. // ACS Omega. 2019. V. 4. P. 21636.
- 27. *Wei Y., Kong B., Song K. et al.* // Photochem. Photobiol. 2007. V. 83. P. 1319.
- 28. Begum G., Dube A., Joshi P.G. et al. // J. Photochem. Photobiol. 2009. V. 95. P. 177.
- 29. Matroule J.Y., Carthy C.M., Granville D.J. et al. // Oncogene. 2001. V. 20. P. 4070.
- Massiot J., Rosilio V., Makky A. // J. Mater. Chem. 2019. V. 7. № 11. P. 1805.