

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577 : 541.124

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКТАФЕНИЛЗАМЕЩЕННОГО ФТАЛОЦИАНИНА ЭРБИЯ

© 2022 г. И. Д. Бурцев¹, А. Е. Егоров¹, А. А. Костюков¹, А. В. Шибаева¹, М. А. Климович¹,
А. Д. Косов², М. Ю. Селиверстов², Т. В. Дубинина², А. А. Маркова^{1,3}, В. А. Кузьмин^{1*}

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: vak@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 10.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Установлены спектрально-кинетические характеристики синглетного и триплетного возбужденных состояний октафенилзамещенного фталоцианина эрбия. Показано, что соединение обладает высокими значениями квантовых выходов флуоресценции (0.50) и синглетного кислорода (0.43). Определены значения времени жизни возбужденного синглетного (4.9 нс) и триплетного состояний (1.4 мс). Рассчитана величина константы связывания фталоцианина с бычьим сывороточным альбумином ($5.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), указывающая на эффективное связывание исследуемого вещества с альбумином. На модельной клеточной линии аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116) было установлено преимущественное накопление красителя в цитоплазме клеток. Методом конфокальной микроскопии установлена локализация фталоцианина в митохондриях и структурах эндоплазматического ретикула.

Ключевые слова: фталоцианины, фотохимия, триплетные состояния, флуоресценция, фотодинамическая терапия, локализация в клетках, конфокальная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0207401X22020029

ВВЕДЕНИЕ

Фталоцианины (Pc) лантанидов (Ln) находят широкое применение в областях, связанных с исследованием различных флуоресцентных материалов, проводников, в нелинейной оптике и фотомедицине [1–4]. Они представляют собой макроциклические соединения, которые, благодаря наличию четырех изоиндольных фрагментов, обладают симметричной π -сопряженной ароматической системой. Наличие такой системы в молекуле приводит к повышению ее химической и термической стабильности, а также к появлению ряда важных химических и фотофизических свойств. Данный класс соединений обладает интенсивным поглощением в области 600–700 нм с высокими значениями коэффициента молярной экстинкции [5, 6].

Расширенная ароматическая система молекул фталоцианинов увеличивает вариативность в синтезе соединений ввиду возможности введения широкого спектра заместителей в периферические положения [7, 8]. Введение Ln в качестве центрального иона металла позволяет в том числе координировать два и более макроциклических

фталоцианиновых остова, что дает возможность получения производных фталоцианинов вида LnPc_2 или Ln_2Pc_3 [9–11].

Многие фталоцианины, как и их ближайшие природные аналоги — порфирины, используются также в области фотомедицины в качестве агентов для фотодинамической терапии (ФДТ) рака [12–17]. Метод ФДТ основан на фотохимическом действии фотосенсибилизатора (ФС), локализованного в опухоли, способствующего генерации цитотоксически активных форм кислорода (АФК) в присутствии молекулярного кислорода при облучении светом на определенной длине волны [18]. Результатом поглощения энергии света являются фотохимические реакции с переносом энергии и электрона, в ходе которых образуются АФК: синглетный кислород $^1\text{O}_2$ и супероксидный анион-радикал, приводящие к гибели опухолевых клеток.

Соединения лантанидов с органическими лигандами и наночастицы на их основе успешно применяются в ФДТ в качестве цитотоксичных агентов и ингибиторов [19], а также обладают значительными люминесцентными свойствами и

применяются в биоимиджинге [20, 21]. Введение в структуру фталоцианина эрбия способствует батохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции в область важного для ФДТ “терапевтического окна” [22, 23].

Целью настоящей работы было исследование фотохимических и фотофизических свойств нового октафенилфталоцианина эрбия в качестве заместителя лиганда, который может быть рассмотрен для дальнейших испытаний в качестве ФС для ФДТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемое соединение 2,3,9,10,16,17,23,24-октафенилфталоцианината эрбия ацетат, $\text{PbPcEr}(\text{OAc})$, было получено согласно методике, описанной в работе [24].

Спектральные измерения

Электронные спектры поглощения $\text{PbPcEr}(\text{OAc})$ регистрировали с использованием спектрофотометра “Shimadzu UV-3101PC” фирмы “Shimadzu” (Japan) в диапазоне длин волн 300–800 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре.

Спектры флуоресценции $\text{PbPcEr}(\text{OAc})$ регистрировали на спектрофлуориметре FluoTime 300 фирмы “PicoQuant” (Germany) с использованием ксеноновой лампы в качестве источника возбуждающего света в кварцевых кюветах размером 1.0×1.0 см при комнатной температуре. Во избежание эффекта внутреннего фильтра оптическая плотность растворов стандарта и образцов в точке возбуждения подбиралась не выше 0.07.

Квантовые выходы флуоресценции $\text{PbPcEr}(\text{OAc})$ регистрировали в растворе диметилсульфоксида (ДМСО) с использованием раствора метиленового синего в метаноле в качестве стандарта ($\Phi_f = 0.80$ [25]) при возбуждении ксеноновой лампой на длине волны 620 нм. Квантовые выходы флуоресценции были рассчитаны согласно формуле [26]

$$\Phi_f^i = \frac{F_i^i f_s n_i^2}{F_s^s f_i n_s^2} \Phi_f^s,$$

где Φ_f^s – квантовый выход флуоресценции стандарта, F_i и F_s – площади под спектрами флуоресценции образца и стандарта, n_i^2 и n_s^2 – квадраты коэффициентов преломления в используемом растворителе для образца и стандарта соответственно; $f_i = 1 - 10^{-A_i}$, (A_x – поглощение соединения на длине волны возбуждения).

Кинетику гибели флуоресценции для $\text{PbPcEr}(\text{OAc})$ регистрировали на спектрофлуориметре FluoTime 300 фирмы “PicoQuant” (Germany) с использова-

нием лазера SOLEA. Сигнал собственной функции прибора (IRF) был получен с использованием рассеивающей среды Ludox производства компании DuPont (USA) в качестве стандарта. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Кинетические кривые гибели флуоресценции обрабатывали с использованием полиэкспоненциальной модели при помощи программного обеспечения FluoFit Software фирмы “PicoQuant” (Germany). Время жизни флуоресценции было рассчитано согласно уравнению

$$I(t) = \int_{-\infty}^t \text{IRF}(t') \sum_{i=1}^n I_i \exp\left(\frac{-t-t'}{\tau_i}\right) dt',$$

где I_i – амплитуда, τ_i – время жизни i -го компонента, n – номер компонента. Соответствие экспериментальных данных предложенной модели контролировалось по распределению отклонений от экспоненциальной модели (χ^2) и по функции автокорреляции.

Константу связывания фталоцианина с бычьим сывороточным альбумином (БСА) определяли методом тушения флуоресценции тирозина и триптофана в структуре белковой молекулы. Флуоресценцию регистрировали в растворе БСА в фосфатном буфере (pH = 7.4) при возбуждении на длине волны 280 нм. Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 300–450 нм. Полученные данные аппроксимировали гиперболой

$$F_0 - F = F_{\max} [\text{BCA}] / (K_d + [\text{BCA}]),$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции белка в отсутствие $\text{PbPcEr}(\text{OAc})$, F – интенсивность флуоресценции пробы с $\text{PbPcEr}(\text{OAc})$, $F_{\max}$ – интенсивность флуоресценции пробы в отсутствие красителя, $[\text{BCA}]$ – концентрация альбумина, K_d – константа диссоциации комплекса краситель–альбумин.

Квантовые выходы синглетного кислорода определяли по соответствующей формуле [27]:

$$\Phi_{\Delta}^i = \frac{F_i^i A_s n_i^2}{F_s^s A_i n_s^2} \Phi_{\Delta}^s,$$

где Φ_{Δ}^s – квантовый выход синглетного кислорода для стандарта, F_i и F_s – площади под спектрами люминесценции синглетного кислорода для образца и стандарта, A_i и A_s – оптическая плотность образца и стандарта на длине волны возбуждения, n_i и n_s – коэффициенты преломления растворителя для растворов образца и стандарта соответственно. Оптические плотности на длине волны регистрации были равными. Спектры люминесценции растворов синглетного кислорода в ДМСО и метаноле ($\lambda_{\max} \sim 1270$ нм) регистрировали при облучении ксеноновой лампой (возбуждение на $\lambda = 650$ нм растворов, насыщенных кислородом при комнатной температуре). В качестве

стандарта использован раствор метиленового синего в метаноле ($\Phi_A = 0.49$ [28]).

Спектрально-кинетические характеристики триплетных состояний в экспериментах по импульсному фотолизу $^{Ph}PcEr(OAc)$ в растворе ДМСО измеряли в кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 20$ см на установке импульсного фотолиза с использованием ксеоновой лампы (фильтр КС-18, пропускание — от 690 нм) с энергией вспышки 80 Дж и временем вспышки 20 мкс [29]. Регистрацию поглощения осуществляли с помощью фотоумножителя ФЭУ-38 в диапазоне длин волн 400–800 нм. Удаление кислорода из рабочих растворов проводили с помощью вакуумирования.

Культуру клеток аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116, полученная из Американской коллекции типовых культур) инкубировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) производства компании ПанЭко (Россия) с добавлением 5%-ной фетальной бычьей сыворотки производства компании HyClone (USA), 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37°C, 5%-ной CO_2 во влажной атмосфере. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста. Клетки в количестве $2 \cdot 10^5$ в 3 мл культуральной среды вносили в чашки Петри для микроскопии производства компании SPL Lifesciences (USA) диаметром 35 мм и инкубировали при указанных выше условиях. Через 48 ч добавляли $^{Ph}PcEr(OAc)$ в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М и инкубировали в течение 17 ч. В часть чашек краситель не вносили, их использовали в качестве контрольной среды. После инкубации монослой клеток промывали солями Хенкса для последующего окрашивания клеточными маркерами. Для визуализации внутриклеточного распределения органелл клетки окрашивали флуоресцентными красителями: ER tracker Green (BODIPY™ FL Glibenclamide, ThermoFisher Scientific) в концентрации 1 мкМ для окрашивания эндоплазматического ретикулума при инкубации в течение 30 мин ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 500$ –580 нм); Dihydrorhodamine 123 производства компании ThermoFisher Scientific, митохондриальный трекер для детекции активных форм кислорода (10 мкМ, 30 мин, $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 500$ –580 нм), лизосомный маркер LysoTracker Green DND-26 производства компании ThermoFisher Scientific (1 мкМ, 30 мин, $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 500$ –580 нм) и Hoechst 33342 для окрашивания ядер (0.01 мг, 15 мин, $\lambda_{ex} = 405$ нм, $\lambda_{em} = 420$ –480 нм).

Исследование повреждения клеточных мембран для проницаемости пропидия иодидом проводили методом конфокальной микроскопии с такой же пробоподготовкой, как в эксперименте с анализом

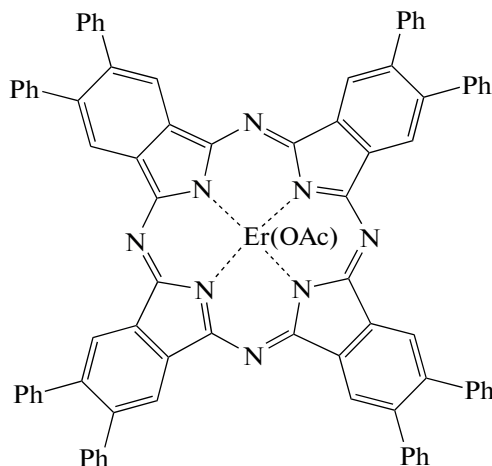


Рис. 1. Структурная формула октафенил-замещенного фталоцианината эрбия ацетата $^{Ph}PcEr(OAc)$.

внутриклеточного распределения $^{Ph}PcEr(OAc)$. В культуральную среду клеток добавляли $^{Ph}PcEr(OAc)$ в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М и инкубировали в течение 17 ч. После инкубации монослой клеток промывали солями Хенкса для последующего окрашивания клеточными маркерами. Для визуализации внутриклеточного распределения органелл клетки окрашивали красителем Hoechst 33342 для окрашивания ядер (характеристики красителя приведены выше), промывали солями Хенкса и добавляли соли Хенкса с пропидия иодидом в конечной концентрации 0.1 мкг/мл ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 550$ –700 нм). Изображения получали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 компании Leica Microsystem GmbH (Germany), исключая фоновую флуоресценцию $^{Ph}PcEr(OAc)$ путем ограничения мощностей лазера и детекторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные фотохимические характеристики фталоцианина $^{Ph}PcEr(OAc)$

Структурная формула исследуемого фталоцианина $^{Ph}PcEr(OAc)$ представлена на рис. 1. Фталоцианин $^{Ph}PcEr(OAc)$ характеризуется наличием восьми фенильных заместителей в периферических положениях и ацетата в качестве аксиального лиганда у центрального иона эрбия, который может являться уходящей группой при синтезе последующих производных, содержащих два и более фталоцианиновых лиганда [24].

Для исследуемого фталоцианина $^{Ph}PcEr(OAc)$ были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции его в растворе ДМСО (рис. 2). Спектр поглощения $^{Ph}PcEr(OAc)$ характеризуется наличием S-полосы в области 350–370 нм и интенсивной узкой Q-полосы с максимумом погло-

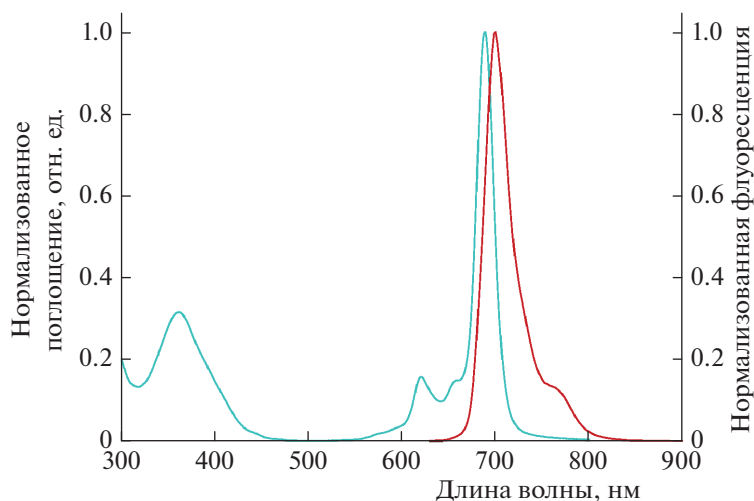


Рис. 2. Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в растворе ДМСО; $\lambda_{\text{ex}} = 620$ нм.

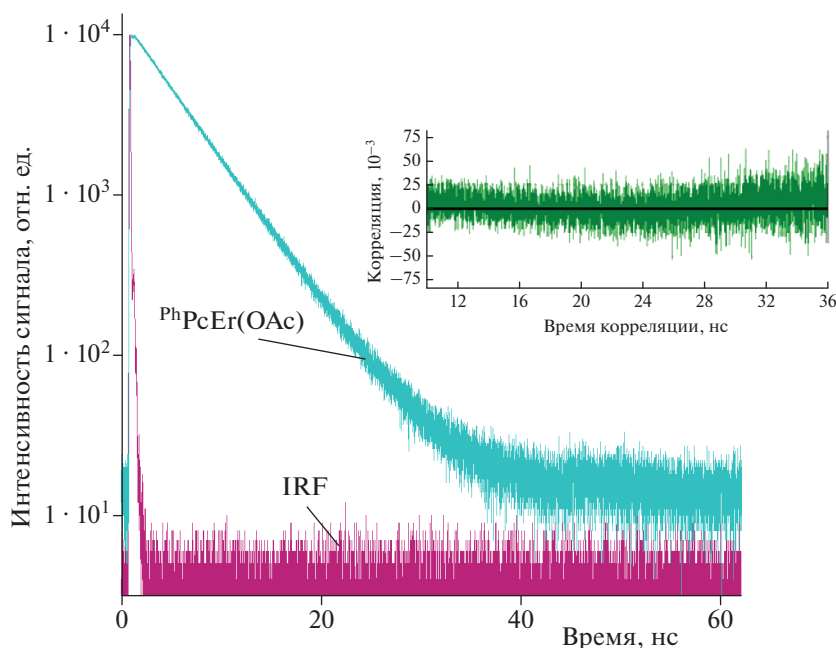


Рис. 3. Кинетика гибели флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в растворе ДМСО ($C = 5.6 \cdot 10^{-6}$ М); $\lambda_{\text{ex}} = 620$ нм, $\lambda_{\text{reg}} = 700$ нм. На вставке: функция автокорреляции для аппроксимации моноэкспоненциальной зависимости интенсивности сигнала от времени.

шения при 690 нм. Q-Полоса обладает ярко выраженной сопутствующей полосой поглощения при 620 нм, что характерно для фталоцианинов редкоземельных элементов [2]. Спектр флуоресценции характеризуется наличием интенсивной полосы флуоресценции с максимумом при 704 нм (стоксов сдвиг — 14 нм). Квантовый выход флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ составил $\Phi_{\text{fl}} = 0.50$.

Была исследована кинетика гибели флуоресценции для описываемого соединения (рис. 3).

Время жизни флуоресценции исследованного соединения в растворе ДМСО составляет 4.9 нс. Кинетика гибели флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ является моноэкспоненциальной ($\chi^2 = 1.03$).

Константа связывания с БСА, рассчитанная по тушению флуоресценции белка (рис. 4), составила $K_b = (5.5 \pm 1.0) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Высокое значение K_b при взаимодействии БСА с $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в сравнении со константой, полученной для фталоцианина цинка в работе [30], вероятно, обусловлено тем,

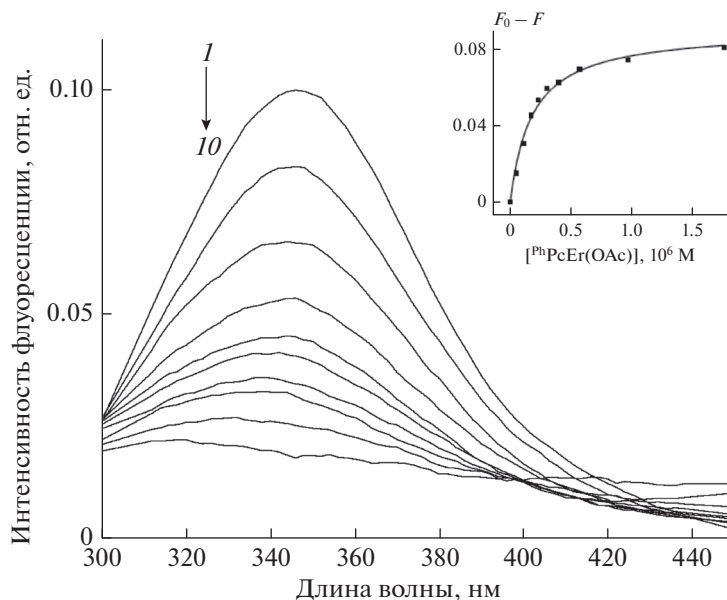


Рис. 4. Спектры флуоресценции БСА ($C = 5 \cdot 10^{-7}$ М) в присутствии $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ ($C = 0\text{--}1.8 \cdot 10^{-6}$ М для кривых 1–10) в фосфатном буфере; pH = 7.3, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм. На вставке: кривая для расчета константы связывания k_b .

что эрбий находится вне плоскости молекулы фталоцианина и связан с ацетатом. Высокая эффективность кулоновского взаимодействия между положительно заряженным центральным фрагментом молекулы фталоцианина и отрицательно заряженной молекулой белка является подтверждением этого предположения [31].

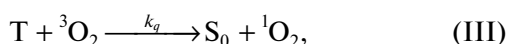
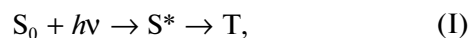
Спектрально-кинетические характеристики триплетных состояний

Методом импульсного фотолиза были получены дифференциальный триплет-триплетный спектр поглощения дегазированного раствора $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ в ДМСО (рис. 5) и кинетика гибели триплетного состояния данного соединения (см. реакцию (I) ниже).

Триплет-триплетный спектр характеризуется наличием интенсивной полосы триплетного поглощения в области 400–600 нм, а также менее интенсивным поглощением в области 740–780 нм и областью выцветания синглетного состояния при 600–720 нм, соответствующей максимуму спектра синглетного поглощения (рис. 2). Кинетика гибели триплетного состояния является моноэкспоненциальной и описывается уравнением $\Delta A = \Delta A_0 \exp(-t/\tau_T)$, где ΔA – изменение триплет-триплетного поглощения в течение заданного времени, ΔA_0 – триплет-триплетное поглощение непосредственно после вспышки, t – время. Время жизни триплетного состояния $\tau_T = 1/k_T$, где k_T – константа скорости гибели триплетного со-

стояния. Время жизни триплетного состояния составило 1.4 мс.

Синглетный кислород генерируется в результате переноса энергии от триплетного состояния молекулы ФС к молекулам кислорода в основном состоянии:



Для $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ была определена квантовая эффективность синглетного кислорода. По регистрации спектров люминесценции синглетного кислорода (рис. 6, реакция (IV)) в ближней ИК-области ($\lambda_{\text{max}} \sim 1270$ нм) было рассчитано значение его квантового выхода, которое для $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ составило $\Phi_\Delta = 0.43$. Полученное значение указывает на эффективность процесса переноса энергии (см. табл. 1).

Значения квантовых выходов флуоресценции и синглетного кислорода для $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ сравнивали с соответствующими значениями для аналогичного безметалльного фталоцианина PhPcH_2 : $\Phi_f = 0.20$ и $\Phi_\Delta = 0.55$ в табл. 1. Усиление флуоресценции $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ хорошо согласуется с ранее полученными сведениями о гомолептических бисфталоцианинах эрбия [32]. Включение металла в структуру фталоцианина приводит к исчезновению расщепления уровня энергии, соответствующего

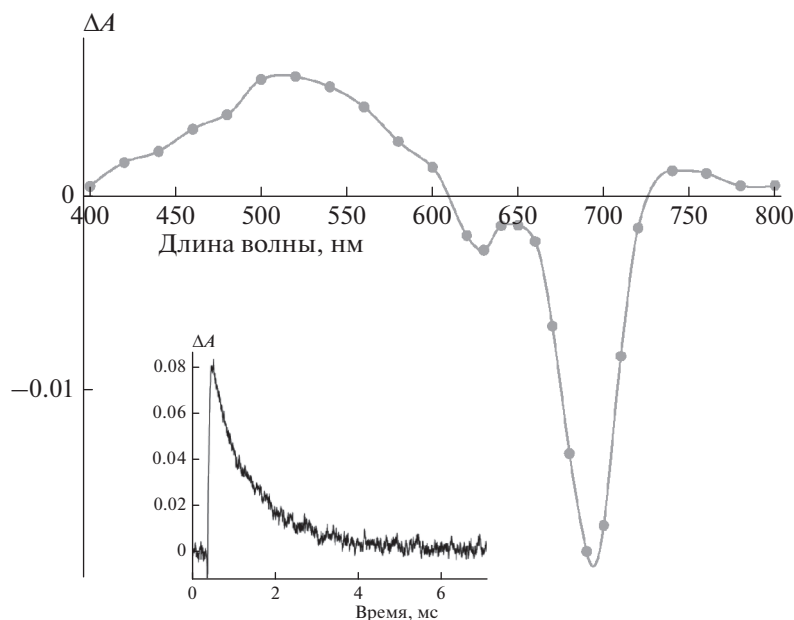


Рис. 5. Дифференциальный триплет-триплетный спектр поглощения $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ ($C = 7 \cdot 10^{-7}$ М в растворе ДМСО) по прошествии 300 мкс после вспышки. На вставке: кинетика гибели триплетного состояния при 520 нм.

шего нижней свободной молекулярной орбитали. Данный процесс выражается в уменьшении квантового выхода интеркомбинационной и внутренней конверсии, что приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции. Описанный эффект основан на взаимодействии σ -орбиталей металла с π -электронным сопряжением орбиталей атомов азота в лиганде фталоцианина, перпендикулярных плоскости кольца.

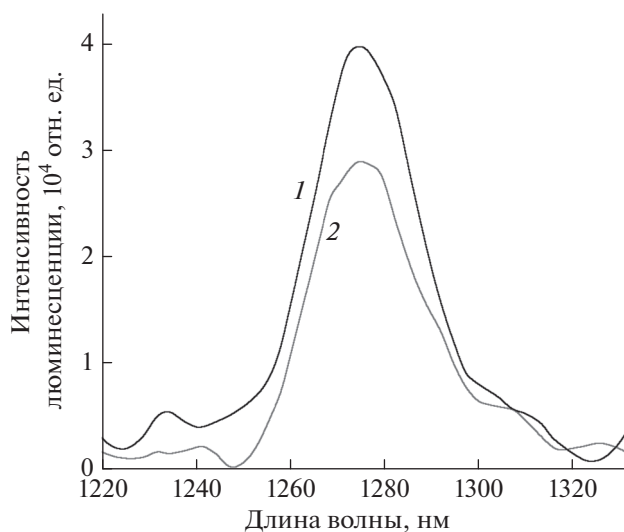


Рис. 6. Спектры люминесценции синглетного кислорода метиленового синего и $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ в ДМСО: 1 – метиленовый синий, 2 – $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$; $\lambda_{\text{ex}} = 650$ нм.

Исследования на клетках

Для визуализации клеток использовался краситель ядер Hoechst 33342. На рис. 7 показано, что $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ накапливается в клетках модельной клеточной линии аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116). Накопление происходит преимущественно в цитоплазме. В ядре краситель накапливается в меньшей степени, но сигнал обнаруживается и в ядрах клеток. Способность $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ накапливаться в клеточных структурах может быть во многом обусловлена его способностью связываться с белковыми молекулами ($K_b = (5.5 \pm 1.0) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$).

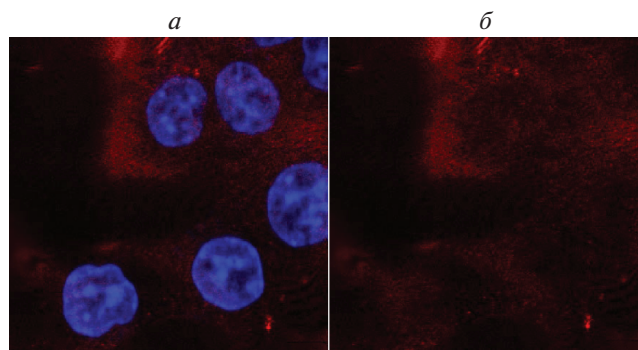


Рис. 7. Накопление $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ в клетках аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116). *а* – наложение сигналов $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ и Hoechst 33342, *б* – сигнал $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$.

Таблица 1. Фотохимические характеристики $^{Ph}PcEr(OAc)$

Соединение	λ_{abs} , нм	λ_{fl} , нм	$\Delta\lambda$, нм	Φ_{fl}	τ_{fl} , нс	λ_{t-t} , нм	τ_{t-t} , мс	Φ_{Δ}	k_b , M^{-1}
$^{Ph}PcEr(OAc)$	690	704	14	0.50	4.87	520	1.4	0.43	$(5.5 \pm 1.0) \cdot 10^6$
$^{Ph}PcH_2$	688 (Q ₁), 718 (Q ₂)	708	20	0.20	5.73	—	—	0.55	—

Примечания: λ_{abs} — максимум поглощения, λ_{fl} — максимум флуоресценции, $\Delta\lambda$ — стоксов сдвиг, Φ_{fl} — квантовый выход флуоресценции, τ_{fl} — время жизни флуоресценции, λ_{t-t} — максимум триплетного поглощения, τ_{t-t} — время жизни триплетного состояния, Φ_{Δ} — квантовый выход синглетного кислорода, k_b — константа связывания комплекса фталоцианина с БСА.

В дальнейшем были окрашены некоторые клеточные органеллы с целью соотнести сигнал от $^{Ph}PcEr(OAc)$ с сигналами от митохондрий, эндоплазматического ретикулума и лизосом. Кроме того, в качестве контроля были окрашены соответствующими маркерами клетки, которые не подвергались воздействию $^{Ph}PcEr(OAc)$.

В контрольных чашках наблюдали нормальную морфологию клеток (рис. 8). В клетках, которые инкубировались с $^{Ph}PcEr(OAc)$, происходила регистрация в соответствующих его спектральным характеристикам диапазонах: $\lambda_{ex} = 633$ нм, $E_m = 650\text{--}750$ нм (красный сигнал). Наложение сигналов от $^{Ph}PcEr(OAc)$ и от окрашиваемых клеточ-

ных органелл позволяет проанализировать преимущественное накопление исследуемого красителя. Для визуализации митохондрий использовался краситель Dihydrorhodamine 123. Особенность данного красителя заключается в том, что он не только накапливается в митохондриях клеток, но и является сенсором активных форм кислорода [33] (рис. 9).

Активные формы кислорода окисляют Dihydrorhodamine 123 и превращают его в флуоресцентный родамин 123. При наложении сигналов (рис. 9з) происходит значительное, но неполное перекрывание сигналов. Можно предположить, что в некоторой степени $^{Ph}PcEr(OAc)$ способен накапливаться в митохондриях клеток. Анало-

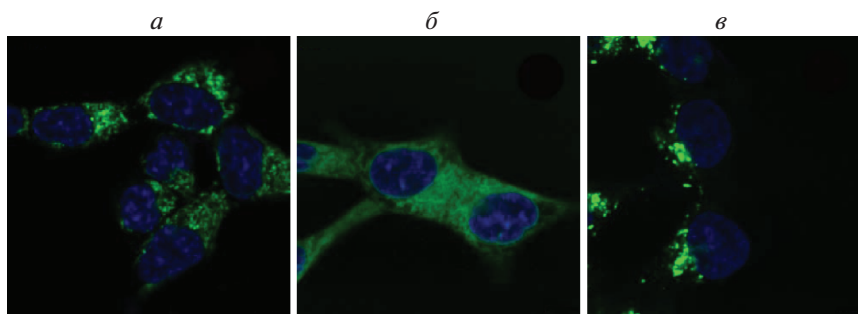


Рис. 8. Визуализация ядра (“синий” сигнал, более темные области) и клеточных органелл (“зеленый” сигнал (более светлые области) соответствует следующим органеллам: а — митохондрии, б — эндоплазматический ретикулум и в — лизосомы) в контрольных образцах.

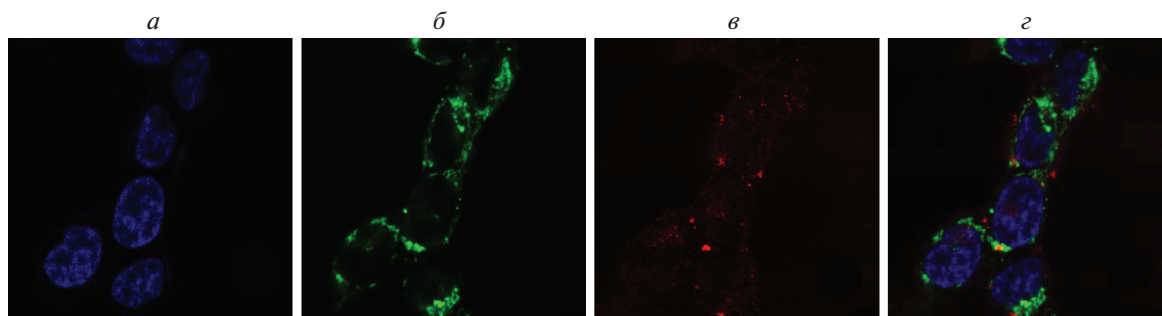


Рис. 9. Исследование солокализации $^{Ph}PcEr(OAc)$ с клеточными митохондриями: а — ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342; б — сигнал от митохондрий, окрашенных Dihydrorhodamine 123; в — сигнал $^{Ph}PcEr(OAc)$; г — наложение сигналов а и б.

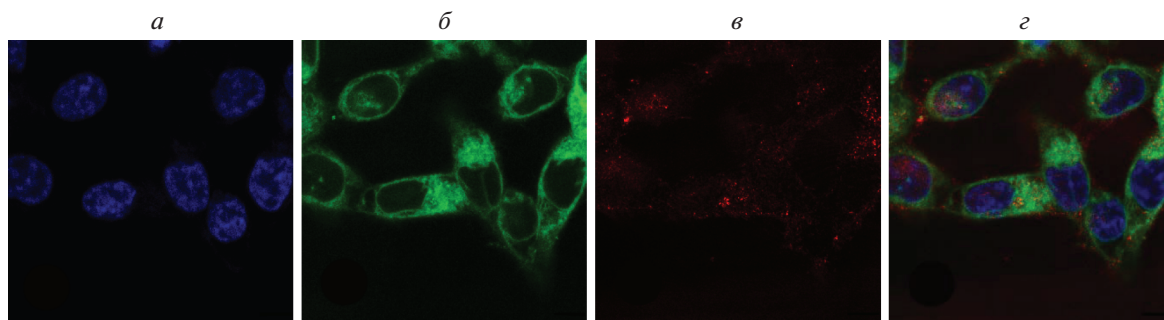


Рис. 10. Исследование солокализации $^{Ph}PcEr(OAc)$ с эндоплазматическим ретикуломом: *а* — ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342; *б* — сигнал от эндоплазматического ретикула, окрашенного ER-Tracker; *в* — сигнал $^{Ph}PcEr(OAc)$; *г* — наложение сигналов *а* и *б*.

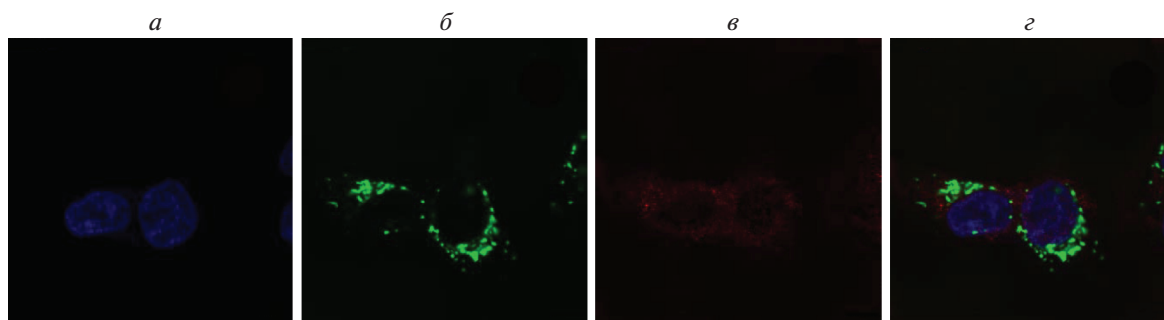


Рис. 11. Исследование солокализации $^{Ph}PcEr(OAc)$ с лизосомами: *а* — ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342; *б* — сигнал от лизосом, окрашенных LysoTracker Green; *в* — сигнал $^{Ph}PcEr(OAc)$; *г* — наложение сигналов *а* и *б*.

гичным образом происходило сопоставление сигналов от ER-Tracker и $^{Ph}PcEr(OAc)$, см. рис. 10.

Заметно значительное перекрывание сигналов $^{Ph}PcEr(OAc)$ и ER-Tracker, что может говорить о способности $^{Ph}PcEr(OAc)$ накапливаться в структурах эндоплазматического ретикула. Вместе с тем полного совпадения сигналов мы не наблюдаем, что говорит о неселективном характере накопления $^{Ph}PcEr(OAc)$.

Исследование солокализации $^{Ph}PcEr(OAc)$ и лизосом (рис. 11) позволяет говорить о совсем незначительном перекрывании сигналов, накопление $^{Ph}PcEr(OAc)$ в лизосомах не происходит.

Конфокальная микроскопия клеток, нагруженных $^{Ph}PcEr(OAc)$, показала отсутствие летального фотоповреждения мембран клеток в течение 1 ч после освещения. Клетки, накопившие $^{Ph}PcEr(OAc)$ и окрашенные красителем ядер Hoechst 33342, облучались при $\lambda_{ex} = 633$ нм до достижения плотности дозы в 300 Дж/см^2 в клеточном буфере, содержащем пропидия иодид (рис. 12). Последний иодид не способен проникать через неповрежденные цитоплазматические мембраны клеток, а в случае их повреждения он проходит в цитоплазму и ядро, интеркалируя с нуклеиновыми кислотами (РНК в цитоплазме и ДНК в ядре) с

увеличением флуоресценции в своем канале. Через 1 мин после фотовозбуждения клеток, нагруженных $^{Ph}PcEr(OAc)$, мембраны клеток были не повреждены, а окрашивание пропидия иодидом цитоплазмы (и ядрышек) развивалось медленно — в течение 1 ч и не на всех клетках в пробе. Это свидетельствует о незначительном фотоповреждении мембран клеток при высоких дозах фотовозбуждения $^{Ph}PcEr(OAc)$ и, следовательно, об отсутствии быстрого фотоиндуцированного некроза клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Октафенилзамещенный фталоцианин $^{Ph}PcEr(OAc)$ обладает значительными флуоресцентными свойствами, что выражается в высоком квантовом выходе и продолжительном времени жизни флуоресценции. Введение эрбия приводит к батохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции, что хорошо согласуется с требованиями к фотосенсибилизатору для ФДТ. Высокая флуоресценция позволяет визуализировать локализацию $^{Ph}PcEr(OAc)$ в компартаментах клеток.

Под воздействием “красного” света на $^{Ph}PcEr(OAc)$ в результате интеркомбинационной конверсии образуется триплетное состояние фта-

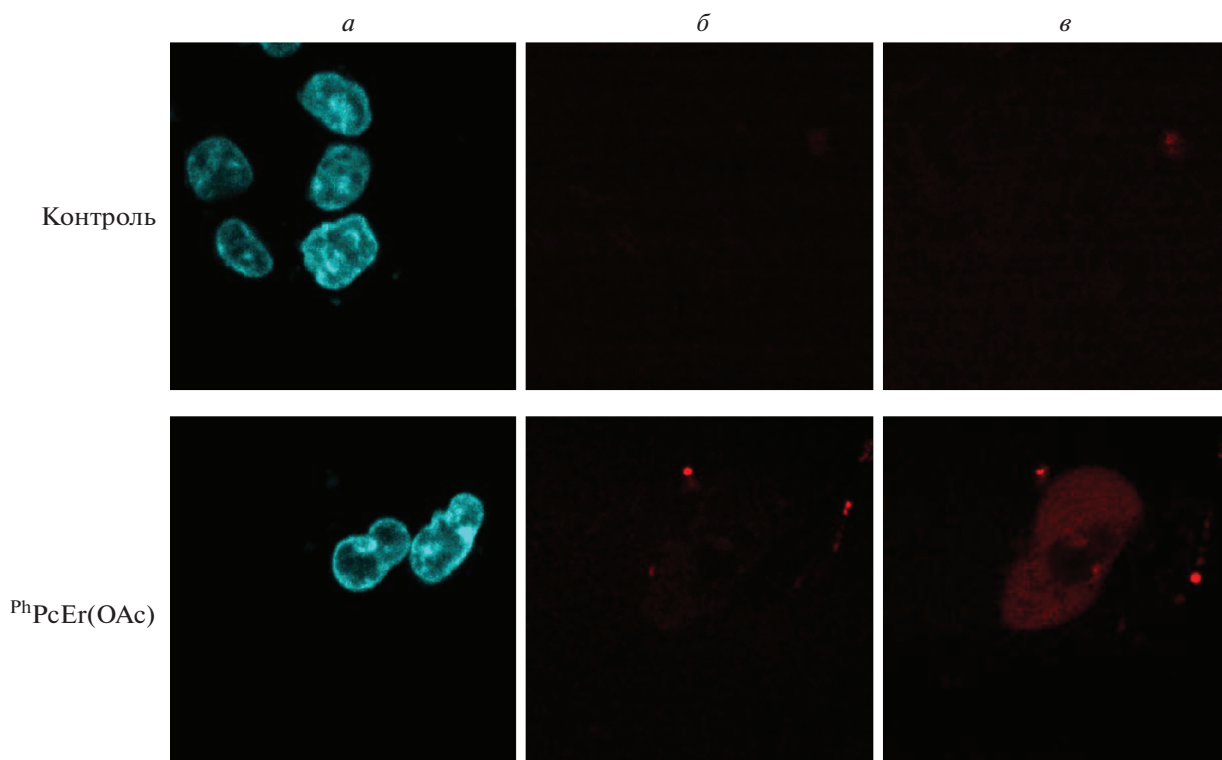


Рис. 12. Исследование фотоповреждения цитоплазматических мембран на клетках НСТ116, накопивших $^{Ph}PcEr(OAc)$. На двух снимках *а* — ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342, на остальных снимках (красный цвет) — цитоплазма и ядрышки клеток с поврежденными мембранами, проницаемыми для пропидия иодида: *б* — время после возбуждения 1 мин, *в* — 60 мин.

лоцианина. Триpletная природа образующегося возбужденного состояния подтверждена тушением молекулярным кислородом. Высокий квантовый выход синглетного кислорода позволяет рассматривать $^{Ph}PcEr(OAc)$ в качестве эффективного фотосенсибилизатора. Также данное соединение обладает высоким значением константы связывания с молекулой БСА, что говорит о его высоком сродстве к белковым молекулам и, соответственно, о возможности его доставки и накопления в опухолевых клетках.

Исследуемое соединение обладает интенсивным сигналом флуоресценции в клетках аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116). Оно накапливается преимущественно в цитоплазме, и в значительно меньшей степени флуоресцентный сигнал красителя обнаруживается в ядре клетки. Сопоставление флуоресцентного сигнала $^{Ph}PcEr(OAc)$ с сигналами ряда клеточных органелл позволило установить, что краситель может накапливаться в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме, при этом практически не обнаруживается в ядре и лизосомах. Исследуемый краситель $^{Ph}PcEr(OAc)$ не обладает субмикромольной темновой цитотоксичностью, его фотодинамическая активность на клетках требует высоких интенсивностей освеще-

ния, при этом фталоцианин накапливается в цитоплазме. Это открывает возможность дальнейшего исследования фталоцианина как соединения для фотовизуализации, применимого в длительных флуоресцентных методах анализа без фотодинамического повреждения клеточных структур. Полученные данные о незначительном фотоповреждении клеточных мембран свидетельствуют о перспективности применения $^{Ph}PcEr(OAc)$ для фотовизуализации без повреждения клеток в процессе флуоресцентной микроскопии.

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

Исследование цитотоксичности выполнено при финансовой поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации на оборудовании Центра изучения молекулярного состава ИНЭОС РАН.

Работа выполнена в рамках госзадания № 1201253303 по теме “Кинетика и механизмы элементарных стадий сложных фотохимических и биофотохимических процессов”.

Синтез фталоцианиновых комплексов осуществлялся при финансовой поддержке грантом Президента РФ МК-1056.2020.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kato K., Yoshida Y., Yamashita M. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 9967.
2. *Zugle R., Litwinski C., Nyokong T.* // Polyhedron. 2011. V. 30. P. 1612.
3. *Kuzmina E.A., Dubinina T.V., Vasilevsky P.N. et al.* // Dyes Pigment. 2021. V. 185. P. 108871.
4. *Kuzmina E.A., Dubinina T.V., Dzuban A.V. et al.* // Polyhedron. 2018. V. 156. P. 14.
5. *Wong R.C.H., Lo P.-C., Ng D.K.P.* // Coord. Chem. Rev. 2019. V. 379. P. 30.
6. *Roguin L.P., Chiarante N., Vior M.C.G. et al.* // Intern. J. Biochem. Cell Biol. 2019. V. 114. P. 105575.
7. *Dubinina T.V., Tychinsky P.I., Borisova N.E. et al.* // Dyes Pigments. 2018. V. 156. P. 386.
8. *Furuyama T., Maeda K., Maeda H. et al.* // J. Org. Chem. 2019. V. 84. № 21. P. 14306.
9. *Feng G., Xiaowan F., Liu Y. et al.* // Dalton Trans. 2016. V. 45. P. 7476.
10. *Wenbo L., Houhe P., Ziqian W. et al.* // Chem. Commun. 2017. V. 53. P. 3765.
11. *Barard S., Kreouzis T., Cammidge A.N. et al.* // Semicond. Sci. Technol. 2018. V. 33. № 9. P. 095010.
12. *Santos K.L.M., Barros R.M., Lima D.P.S. et al.* // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2020. V. 32. P. 102032.
13. *Martin-Gomis L., Fernandez-Lazaro F., Sastre-Santos A.* // J. Mater. Chem. A. 2014. V. 2. P. 15672.
14. *Urbani M., Ragoussi M.-E., Nazeeruddin M.K. et al.* // Coord. Chem. Rev. 2019. V. 381. P. 1.
15. *Бердникова Н.Г., Донцов А.Е., Ерохина М.В. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 48.
16. *Клименко И.В., Лобанов А.В., Трусова Е.А.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 74.
17. *Климович М.А., Сажина Н.Н., Радченко А.Ш. и др.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 33.
18. *Dabrowski J.M.* // Adv. Inorg. Chem. 2017. V. 70. P. 343.
19. *Teo R.D., Termini J., Gray H.B.* // J. Med. Chem. 2016. V. 59. № 13. P. 6012.
20. *Zhigao Y., Zichao L., Xian Q. et al.* // Acc. Chem. Res. 2020. V. 53. № 2. P. 2962.
21. *Herlan C., Brase S.* // Dalton Trans. 2020. V. 49. P. 2397.
22. *Yigang L., Hong Y., Zian H. et al.* // J. Mater. Res. 2005. V. 20 № P. 2940.
23. *Shuhui B., Jin H., Qi W. et al.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P. 474.
24. *Dubinina T.V., Paramonova K.V., Trashin S.A. et al.* // Dalton Trans. 2014. V. 43. P. 2799.
25. *Shahinyan G.A., Amirbekyan A.Y., Markarian S.A.* // Spectrochim. Acta, Part A. 2019. V. 217. P. 170.
26. *Brouwer A.M.* // Pure Appl. Chem. 2011. V. 83. № 12. P. 2213.
27. *Sainuddin T., McCain J., Pinto M. et al.* // Inorg. Chem. 2016. V. 55. № 1. P. 83.
28. *Redmond R.W., Gamlin J.N.* // Photochem. Photobiol. 1999. V. 70. P. 391.
29. *Кузьмин В.А., Волнухин В.А., Егоров А.Е. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 3.
30. *Amitha G.S., Vasudevan S.* // Polyhedron. 2019. V. 175. P. 114208.
31. *Li X., Jeong K., Lee Y. et al.* // Theranostics. 2019. V. 9. № 22. P. 6412.
32. *Bo S., Tang D., Liu X., Zhen Z.* // Dyes Pigment. 2008. V. 76. № 1. P. 35.
33. *Ortega-Villasante C., Buren S., Blazquez-Castro A. et al.* // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 122. P. 202.