

УДК 577.357.464.23

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И МЕХАНИЗМЫ ФОТОТОКСИЧНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА e_6 И ИХ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ

© 2019 г. Т.Е. Зорина, И.В. Янковский, И.В. Яковец, И.Е. Кравченко, Т.И. Ермилова*,
Т.В. Шман*, М.В. Белевцев*, В.П. Зорин

Белорусский государственный университет,
220030 Минск, проспект Независимости, 4, Республика Беларусь

E-mail: zorinate@mail.ru

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
223053, д. Боровляны Минской области, ул. Фрунзенская, 43, Республика Беларусь

Поступила в редакцию 16.01.2019 г.

После доработки 16.01.2019 г.

Принята к публикации 05.03.2019 г.

Методами конфокальной микроскопии и колокализационного анализа с использованием коэффициентов корреляции Пирсона показано, что этерифицированные производные хлорина e_6 и их липосомальные формы локализуются преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, комплексе Гольджи, митохондриях клетки и имеют низкий уровень локализации в лизосомах. Фармакологические формы введения фотосенсибилизаторов существенно влияют на уровень и кинетику накопления их в клетках, но не оказывают значительного влияния на внутриклеточную локализацию производных хлорина e_6 . Установлены отличия в активности и механизмах действия для производных хлорина e_6 и их липосомальных форм по сравнению с хлорином e_6 при фотосенсибилизированном воздействии на клетки K562. Предполагается, что различия в механизмах повреждения клеток в значительной степени определяются особенностями локализации фотосенсибилизаторов.

Ключевые слова: производные хлорина e_6 , липосомальные формы, внутриклеточная локализация, цитотоксичность, апоптоз.

DOI: 10.1134/S0006302919040057

Фотодинамическое воздействие на клетки и ткани в присутствии фотосенсибилизаторов (ФС) происходит с участием радикальных реакций и активных форм кислорода. В случае ФС порфиринового ряда синглетный кислород (1O_2) является основным агентом окислительных реакций при фотосенсибилизированных процессах [1,2]. Эффективность фотоповреждения биологических систем непосредственно связана с локализацией ФС, поскольку время жизни 1O_2 невелико (порядка 0,03–0,04 мкс) и длина свободного пробега молекулы за это время не превышает 0,1 мкм [1,3]. Первичными мишенями окислительного действия ФС являются те клеточные

структуры, в которых он накапливается, поэтому внутриклеточная локализация ФС имеет существенное значение при определении механизмов повреждений клеток.

Накопление и распределение ФС в различных клеточных, тканевых системах в решающей степени определяются их физико-химическими и структурными характеристиками. Наличие катионных или анионных групп, симметрия расположения боковых заместителей в порфириновой молекуле существенным образом сказываются на взаимодействии ФС с клеточными, тканевыми структурами и определяют процессы их локализации и накопления [4,5].

Ранее было показано, что хлорин e_6 (Хл e_6) и его этерифицированные производные (ПХл e_6) – диметилловый и триметилловый эфиры хлорина e_6 (ДМЭ и ТМЭ соответственно) – могут быть использованы для различных приложений техники фотодинамической терапии, включая лечение онкологических заболеваний, сосудистых пато-

Сокращения: ФС – фотосенсибилизаторы, Хл e_6 – хлорин e_6 , ПХл e_6 – этерифицированные производные Хл e_6 , ДМЭ – диметилловый эфир хлорина e_6 , ТМЭ – триметилловый эфир хлорина e_6 , ЛФ – липосомальные формы, ДМФХ – димеристоилфосфатидилхолин, ЭСТ – эмбриональная сыворотка телят, ККП – коэффициент корреляции Пирсона, СМХRos – хлорметил-Х-розамин.

логий, избирательное повреждение клеток с повышенным пролиферативным статусом [5,6]. Низкая растворимость данных соединений в водной среде обуславливает необходимость применения для их введения специальных носителей. Наноразмерные липидные везикулы являются наиболее популярной фармакологической формой для введения неполярных лекарственных соединений [7,8]. Однако использование липосомальных форм (ЛФ) для введения ФС требует проведения дополнительных исследований, так как характеристики препарата в этом случае зависят не только от свойств самого ФС, но и от структурных характеристик наноразмерных липидных везикул.

В данной работе исследованы характеристики взаимодействия хлоринов с клетками в культуре и изучено влияния на эти процессы особенностей химической структуры и форм введения сенсibilизатора. Методами конфокальной флуоресцентной микроскопии и цитометрии изучены локализация и накопление в культуральных клетках K562 хлорина e_6 , его этерифицированных производных, введенных в суспензию клеток в органических растворителях и в составе ЛФ. Проведен анализ механизмов повреждения клеток, фотосенсибилизированных хлоринами и их липосомальными формами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фотосенсибилизаторы и их липосомальные формы. Синтез хлоринов проводили по модифицированной методике [9]. При синтезе этерифицированных производных Хл e_6 , ДМЭ и ТМЭ, в качестве исходных субстанций использовали феофитин или Хл e_6 . Чистоту Хл e_6 и его производных контролировали хроматографически. Структурные формулы исследуемых хлоринов представлены на рис. 1.

Липосомы, нагруженные хлоринами в определенном соотношении липид : пигмент, готовили из синтетического насыщенного липида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), производства Sigma (США), на ручном экструдере Avanti Mini-Extruder (метод Бенгема), используя поликарбонатные мембранные фильтры «Nuclepore®» (Whatman, Великобритания) с порами 100 нм. Фотосенсибилизаторы вводили в липидные везикулы на стадии получения липидной пленки. Высушенную липидную пленку гидратировали фосфатно-солевым буфером Дюльбекко (рН 7,4) при постоянном перемешивании. Степень включения хлоринов в липидные везикулы составляла более 90% для ДМЭ и более 85% для ТМЭ.

Спектрально-люминесцентные и абсорбционные методы исследования. Спектральные характеристики хлоринов исследовали с помощью спектро-

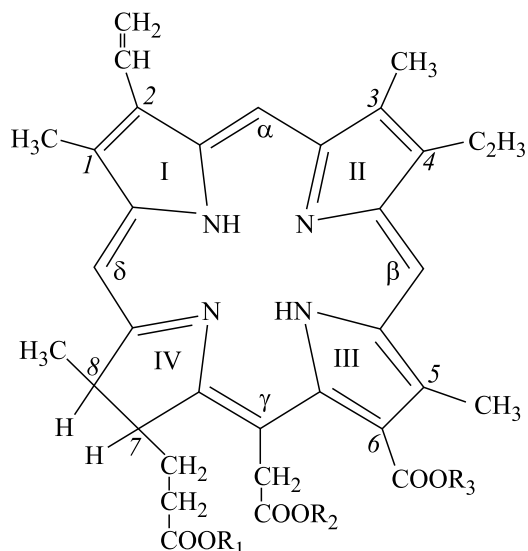


Рис. 1. Структурные формулы хлорина e_6 и его производных: для Хл e_6 $R_1 = R_2 = R_3 = H$; для ДМЭ $R_1 = H$, $R_2 = R_3 = CH_3$; для ТМЭ $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$.

флуориметра SFL-1211A (SOLAR, Беларусь) и спектрофотометра PV1251C (SOLAR, Беларусь).

Концентрацию Хл e_6 в растворе ацетона определяли по величине оптической плотности на длине волны 664 нм, коэффициент молярной экстинкции $50000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Концентрацию ДМЭ и ТМЭ определяли на длине волны 666 нм, коэффициент молярной экстинкции $54000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Для определения концентрации ФС, включенного в липидные везикулы, липосомы предварительно разрушали добавлением 0,2%-го нейтрального детергента тритон X-100 (Panreac, Испания).

Клеточные культуры. В работе были использованы клетки лейкемической линии миелоидного происхождения K562 (Коллекция клеточных культур РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии). Суспензии клеток культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США). При исследовании клетки отмывали и переводили в среду с 5%-м содержанием эмбриональной сыворотки телят (ЭСТ) (Sigma, США).

Для исключения влияния агрегации спиртовые растворы ФС предварительно инкубировали в среде RPMI-1640 с 5%-м содержанием ЭСТ. В пробы, содержащие ЭСТ, добавляли Хл e_6 или его производные в растворах в концентрациях от $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ до $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ и инкубировали в термостате (37°C) в течение 1 ч. Клетки K562 в концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл помещали в подготовленные пробы и инкубировали при 37°C в течение необходимого для накопления ФС времени, затем трижды отмывали средой от несвязавшегося

ФС. Липосомальные формы добавляли непосредственно к клеткам в среде RPMI-1640 с 5% ЭСТ и проводили инкубирование по той же схеме. Затем клетки осаждали центрифугированием и разводили свежей средой культивирования до концентрации $5 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Определение локализации хлоринов в клетках. Прижизненный анализ локализации ФС в культуральных клетках K562 проводили на лазерном сканирующем конфокальном флуоресцентном микроскопе TCS SPE (Leica, Германия). Клетки наносили на стекла SuperFrost и накрывали покровными стеклами толщиной 0,17 мм. Использовали иммерсионный объектив с увеличением $63\times$ (Leica, Германия). Флуоресценцию ФС возбуждали аргоновым лазером ($\lambda = 488$ нм), регистрацию флуоресценции осуществляли в диапазоне 620–700 нм.

Для идентификации внутриклеточного распределения хлоринов использовали технику колокализации. Накопление ФС в клетках проводили по схеме, указанной выше, затем клетки отмывали и ресуспендировали в среде RPMI-1640 с конечной концентрацией $2 \cdot 10^6$ клеток/мл. Далее клетки инкубировали с колокализаторами согласно стандартным протоколам для определения внутриклеточной локализации исследованных ФС. Были использованы флуоресцентные зонды, обладающие высокой избирательностью накопления в органеллах: митохондриальный зонд Mito Tracker® Green FM ($\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 511$ нм) в концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ М; лизосомальный зонд Lyso Tracker® Green DND-26 ($\lambda_{\text{возб}} = 504$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 511$ нм) в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ М; колокализаторы: для комплекса Гольджи – NBD-BODIPY-Labeled Sphingolipids ($\lambda_{\text{возб}} = 505$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 511$ нм) в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М; для эндоплазматического ретикулаума – ER Tracker® TM Green ($\lambda_{\text{возб}} = 504$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 511$ нм) в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М.

Флуоресценцию колокализаторов исследовали в канале, регистрирующем излучение в диапазоне 505–550 нм. В другом канале (620–700 нм) регистрировали флуоресценцию ФС. Наложение изображений двух каналов позволило сравнить характер распределения зонда и исследуемого ФС в клетке. Количественный анализ степени колокализации осуществляли с использованием коэффициента корреляции Пирсона (ККП) согласно работе [10].

Для компьютерной обработки полученных флуоресцентных изображений клеток и количественного анализа параметров накопления и распределения ФС в клетках использовали программу ImageJ.

Цитофлуориметрический анализ. Определение механизмов повреждения клеток. Изменения в клетках, индуцированные фотодинамическим воздействием, анализировали с применением методов проточной цитофлуориметрии (цитофлуориметр FC 500, Beckman Coulter, США). Средние значения интенсивности флуоресценции клеточных популяций в каждом временном интервале рассчитывали с помощью статистического пакета программ CXF (Beckman Coulter, США).

Структурные изменения в клетках при фотосенсибилизации оценивали на основании анализа распределения клеток по интенсивности прямого и бокового светорассеяния. При исследовании динамики апоптоза анализ светорассеяния совмещали с изменениями флуоресценции флуорохрома иодида пропидиума, связывающегося с ДНК, а также с изменениями флуоресценции липофильного флуорохрома Mito Tracker® Red – хлорметил-Х-розамина (CMXRos), который используется для оценки трансмембранного потенциала митохондрий.

Для оценки механизмов фотосенсибилизированного воздействия пробы готовили следующим образом. Клетки K562 инкубировали в средах с различным содержанием ПХл e_6 или их ЛФ в течение 1 ч (для ТМЭ – 3 ч) при температуре 37°C , дважды отмывали от несвязавшегося ФС, ресуспендировали в свежей среде и облучали диодным лазером ($\lambda = 660$ нм) с регулируемой мощностью облучения (ИЛМ-660-0,5; «ЛЭМТ», Беларусь). Фотооблучение проводили при комнатной температуре в течение 20 с. Конечная световая доза облучения составляла $0,4$ Дж/см². Затем клетки помещали в термостат при температуре 37°C . Готовили две серии образцов: аликвоты суспензии клеток отбирали через определенные промежутки времени – 30 и 180 мин – для определения числа поврежденных клеток (некроз или поздний апоптоз) в тесте с иодидом пропидиума (конечная концентрация 1 мкг/мл), а также в тесте с CMXRos (конечная концентрация 150 нМ) – для оценки ранних апоптотических изменений. В образцы клеток перед измерением на цитофлуориметре вводили иодид пропидиума за 5 мин, CMXRos – за 25 мин. Время инкубирования с флуорохромами учитывали в общем времени инкубирования образцов. При соблюдении темного режима добавление CMXRos в концентрации до 250 нМ не приводило к дополнительной гибели клеток.

При измерении на цитофлуориметре уровня флуоресценции красителей использовали узкополосный оптический фильтр на 620 нм. Длина волны возбуждения флуоресценции – 488 нм (одноточный аргоновый лазер).

Определение темновой цитотоксичности ФС проводили с помощью МТТ-теста по методике, описанной в работе [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ процессов локализации и накопления исследованных ФС осуществляли на основании определения их флуоресцентных характеристик в клетках.

Фотофизические и спектрально-флуоресцентные характеристики хлоринов. Ранее было показано, что Хл e_6 и его этерифицированные производные в мономерном состоянии в растворах органических растворителей обладают близкими спектрально-флуоресцентными свойствами [12]. Положения максимумов спектров поглощения и флуоресценции исследуемых хлоринов в мономерной форме различаются на 1–2 нм. Модификация боковых заместителей значительно изменяет полярные свойства молекул хлоринов, что приводит к снижению их растворимости и, как следствие, к агрегации в водных растворах. Результатом этого являются различия параметров флуоресценции Хл e_6 и его этерифицированных производных в водных растворах. Так, если флуоресцентные характеристики в органических растворителях для Хл e_6 и его производных близки, то при переводе хлоринов в фосфатно-солевой буфер величины их квантовых выходов и времени жизни флуоресценции существенно различаются. Квантовый выход флуоресценции для Хл e_6 при переводе в водную среду изменялся с 19,2% в ацетоне до 5,5% в фосфатно-солевом буфере, для ДМЭ и ТМЭ с 18,0 и 18,2% в ацетоне до 1,3 и 1,1% в фосфатно-солевом буфере соответственно. Время жизни флуоресценции (τ) для Хл e_6 , ДМЭ, ТМЭ и его производных в ацетоне – 5,32 нс, 5,21 нс, 5,23 нс соответственно. При переводе в фосфатно-солевой буфер величина τ для Хл e_6 составляла 4,53 нс, для ДМЭ – 2,4 нс, для ТМЭ величина τ не была определена [12–14].

Включение ПХл e_6 в липосомы позволяет сохранить мономерное состояние ФС в водной среде. Для ПХл e_6 , включенных в состав липидных везикул, квантовый выход флуоресценции и время жизни флуоресценции близки к максимальному значению, характерному для растворов пигментов в органических растворителях [12]. Так, для липосомальных форм ДМЭ и ТМЭ квантовый выход флуоресценции составлял 16,9% и 17,1%, время жизни флуоресценции – 5,12 нс и 5,22 нс соответственно. Не наблюдалось существенных различий в характере спектров электронного поглощения и флуоресценции ДМЭ и ТМЭ в этаноле и в липосомах из ДМФХ (рис. 2). Спектрально-флуоресцентные характеристики

ДМЭ и ТМЭ в составе ЛФ, приготовленных экстракционным способом, практически не изменялись при увеличении степени нагрузки в диапазоне 1:1000 – 1:100.

Из приведенных данных следует, что фотофизические и спектрально-флуоресцентные характеристики Хл e_6 и его этерифицированных производных в составе липосом при связывании с мембранными структурами близки и могут быть использованы для оценки накопления и распределения ФС в клетке.

Внутриклеточная локализация и накопление хлоринов при введении в растворах и в составе липосомальных форм. При исследовании локализации и накопления ФС анализировали распределение интенсивности их флуоресценции в культуральных клетках К562. Для Хл e_6 в первые минуты инкубирования наблюдалось флуоресцентное свечение преимущественно в составе плазматической мембраны, лишь через 10–12 мин окрашивания в цитоплазме регистрировали уровни свечения Хл e_6 , превышающие autofлуоресценцию клеток. Распределение Хл e_6 относительно равномерно по цитоплазме. В случае ДМЭ и ТМЭ интенсивность флуоресценции клеткой была заметно выше уже на малых временах инкубирования. Кроме того, существенно отличался характер внутриклеточного распределения: в случае ТМЭ выделялись отдельные сайты, имеющие интенсивность флуоресценции на порядок выше, чем в среднем по цитоплазме. Для ДМЭ наблюдалась наиболее высокая скорость накопления, яркая флуоресценция и относительно равномерное распределение ФС по цитоплазме клетки (рис. 3).

Представляет интерес сравнение процессов накопления и локализации этерифицированных ПХл e_6 в клетках при введении их в растворе и в ЛФ. На рис. 4 представлены изображения клеток К562 в свете флуоресценции после окрашивания ДМЭ, ТМЭ и комплексами ДМЭ–ДМФХ и ТМЭ–ДМФХ. Из рисунка видно, что ДМЭ и ТМЭ, введенные в липосомах, локализовались, как и свободные пигменты, в плазматической мембране клеток, в цитоплазме, в мембранных структурах. Для образцов с 30-минутной инкубацией наблюдается более высокий уровень флуоресценции для ДМЭ и липосомальных форм ДМЭ по сравнению с ТМЭ и его липосомальными формами. Распределение ЛФ ДМЭ – относительно равномерно по цитоплазме. Характер распределения липосомальных форм ТМЭ по телу клетки существенно отличался. Так же, как и для ТМЭ, введенного в растворе, для ТМЭ в ЛФ выделялись отдельные сайты, имеющие интенсивность флуоресценции значительно выше, чем в среднем по цитоплазме. Через 90 мин инкубирования существенно увеличивалась интенсив-

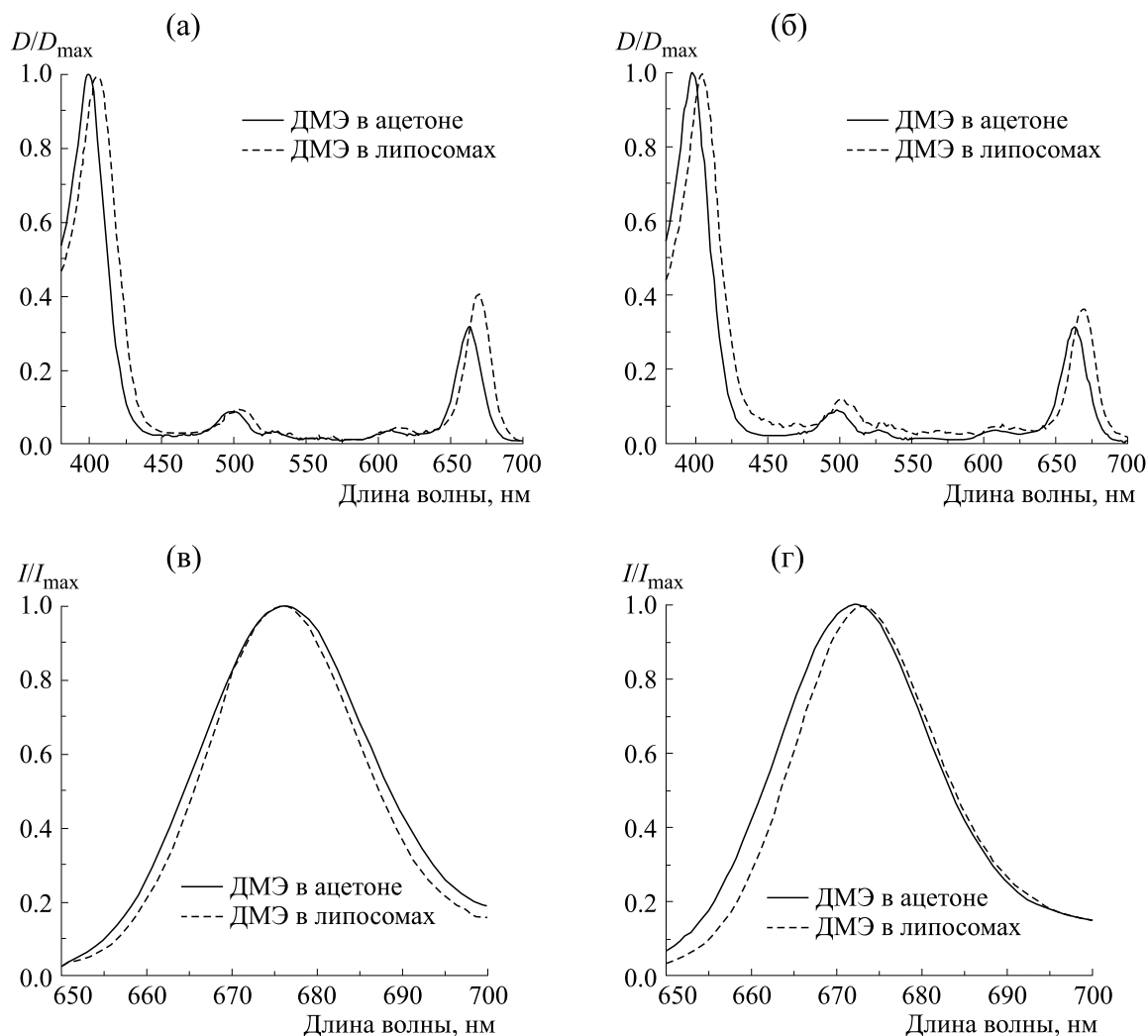


Рис. 2. Спектры электронного поглощения ДМЭ (а) и ТМЭ (б) и спектры флуоресценции ДМЭ (в) и ТМЭ (г) в этаноле и в экстразионных липосомах из ДМФХ в растворе фосфатно-солевого буфера. Концентрация ДМЭ и ТМЭ для спектров электронного поглощения равна $5 \cdot 10^{-6}$ М; концентрация ДМЭ и ТМЭ для спектров флуоресценции – $2 \cdot 10^{-7}$ М. Соотношение ДМЭ (ТМЭ) : ДМФХ = 1 : 40.

ность флуоресценции в пробах с ТМЭ, однако уровень интенсивности флуоресценции оставался более низким по сравнению с пробами с ДМЭ. Следует отметить, что как для исследованных хлоринов, так и для их ЛФ флуоресценция в области ядра клетки отсутствовала.

Анализ интегральной флуоресценции единичных клеток, показал, что при инкубировании в течение 2 ч в одинаковых условиях исследованные ФС, введенные в суспензию клеток K562 в растворах и в липосомах из ДМФХ, имеют различный уровень накопления в клетках (табл. 1).

С использованием колокализаторов клеточных органелл была проведена конкретизация внутриклеточной локализации хлоринов и их липосомальных форм. С этой целью проводилось сопоставление распределения в клетках K562

флуоресценции исследованных ФС и флуоресценции субклеточных колокализаторов – эндоплазматического ретикулума, митохондриального, комплекса Гольджи и лизосомального зондов. В качестве примера на рис. 5 представлены изображения клеток K562 при окрашивании ДМЭ (клетки в свете флуоресценции ДМЭ), изображение клеток в свете флуоресценции колокализаторов и комбинированное свечение клеток в результате наложения двух каналов регистрации флуоресценции. Внутриклеточное распределение флуоресценции ДМЭ умеренно коррелировало с распределением флуоресценции зондов эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи и в меньшей степени совпадало с флуоресценцией митохондриального зонда, что указывает на возможную локализацию ДМЭ в этих органеллах. Следует отметить, что при этом прак-

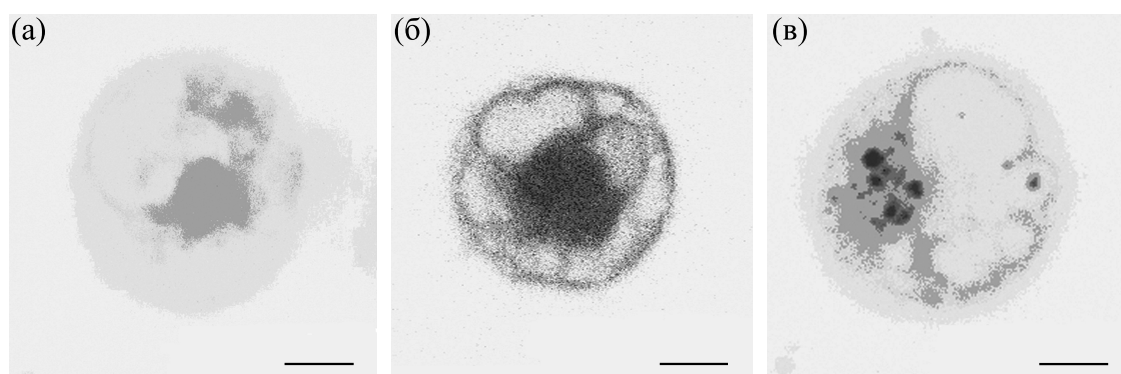


Рис. 3. Изображения клеток K562 в свете флуоресценции хлорофилов (инвертированы): (а) – Хл e_6 ; (б) – ДМЭ; (в) – ТМЭ. Концентрация пигмента $5 \cdot 10^{-6}$ М; концентрация ЭСТ в среде инкубирования 5%, время инкубирования – 60 мин. Срезы клеток представлены для $Z = 10$. Число срезов $Z = 20$, шаг – 1 мкм. Масштабные отрезки на всех фотографиях – 5 мкм.

тически отсутствовало перекрытие областей флуоресценции ДМЭ и лизотрэкера.

Для оценки значимости совпадения локализации хлорофилов и колокализаторов в отдельных органеллах были использованы критерии Пирсона. Значения коэффициентов корреляции Пирсона, количественно характеризующие степень колокализации исследованных хлорофилов, их ЛФ и специфических маркеров органелл в клетках K562, приведены в табл. 2.

Уровень колокализации Хл e_6 с митохондриями имеет умеренную корреляцию (ККП порядка 0,5), при этом определен высокий уровень его колокализации с зондами эндоплазматического ретикула и комплекса Гольджи (ККП $> 0,7$). В наименьшей степени Хл e_6 накапливается в лизосомах (ККП = 0,3–0,4).

Из полученных данных видно, что этерифицированные ПХл e_6 и их липосомальные формы имеют однотипное распределение: области флуо-

Таблица 1. Накопление в клетках K562 Хл e_6 и ПХл e_6 , введенных в суспензию клеток в растворе и в составе липосом

Фотосенсибилизатор	Хл e_6	ДМЭ	ТМЭ	ДМЭ–ДМФХ	ТМЭ–ДМФХ
Интегральная интенсивность флуоресценции	72.6 ± 6.0	610.4 ± 24.3	340.4 ± 16.7	320.2 ± 16.1	170.4 ± 12.2

Примечание. Концентрация клеток $1 \cdot 10^6$ /мл; концентрация хлорофилов $5 \cdot 10^{-6}$ М; концентрация ЭСТ в среде инкубирования 5%. Время инкубирования 120 мин; температура инкубирования 37°C. Соотношение пигмент : ДМФХ = 1 : 40. Ошибка рассчитана по трем идентичным экспериментам.

Таблица 2. Значения коэффициентов корреляции Пирсона для Хл e_6 , этерифицированных ПХл e_6 , их ЛФ и колокализаторов для органелл в клетках K562

ФС	Коэффициенты Пирсона для различных компартментов клетки			
	митохондрии	эндоплазматический ретикулум	комплекс Гольджи	ЛТ
Хл e_6	0.517 ± 0.073	0.905 ± 0.081	0.802 ± 0.072	0.386 ± 0.046
ДМЭ	0.641 ± 0.059	0.820 ± 0.073	0.866 ± 0.079	0.380 ± 0.048
ДМЭ–ДМФХ	0.684 ± 0.061	0.852 ± 0.074	0.744 ± 0.067	0.400 ± 0.051
ТМЭ	0.652 ± 0.058	0.684 ± 0.069	0.560 ± 0.058	0.340 ± 0.041
ТМЭ–ДМФХ	0.664 ± 0.061	0.676 ± 0.058	0.520 ± 0.057	0.361 ± 0.043

Примечание. Время инкубирования при накоплении ФС – 3 ч; концентрация хлорофилов – $5 \cdot 10^{-6}$ М; концентрация ЭСТ в среде инкубирования – 5%. Окрашивание колокализаторами – по протоколу. Величина ККП от 1.00 до 0.70 указывает на относительно сильную корреляцию, 0.69–0.36 – на умеренную корреляцию, 0.35–0.20 – на слабую корреляцию, меньше 0.20 – отсутствие корреляции [15].

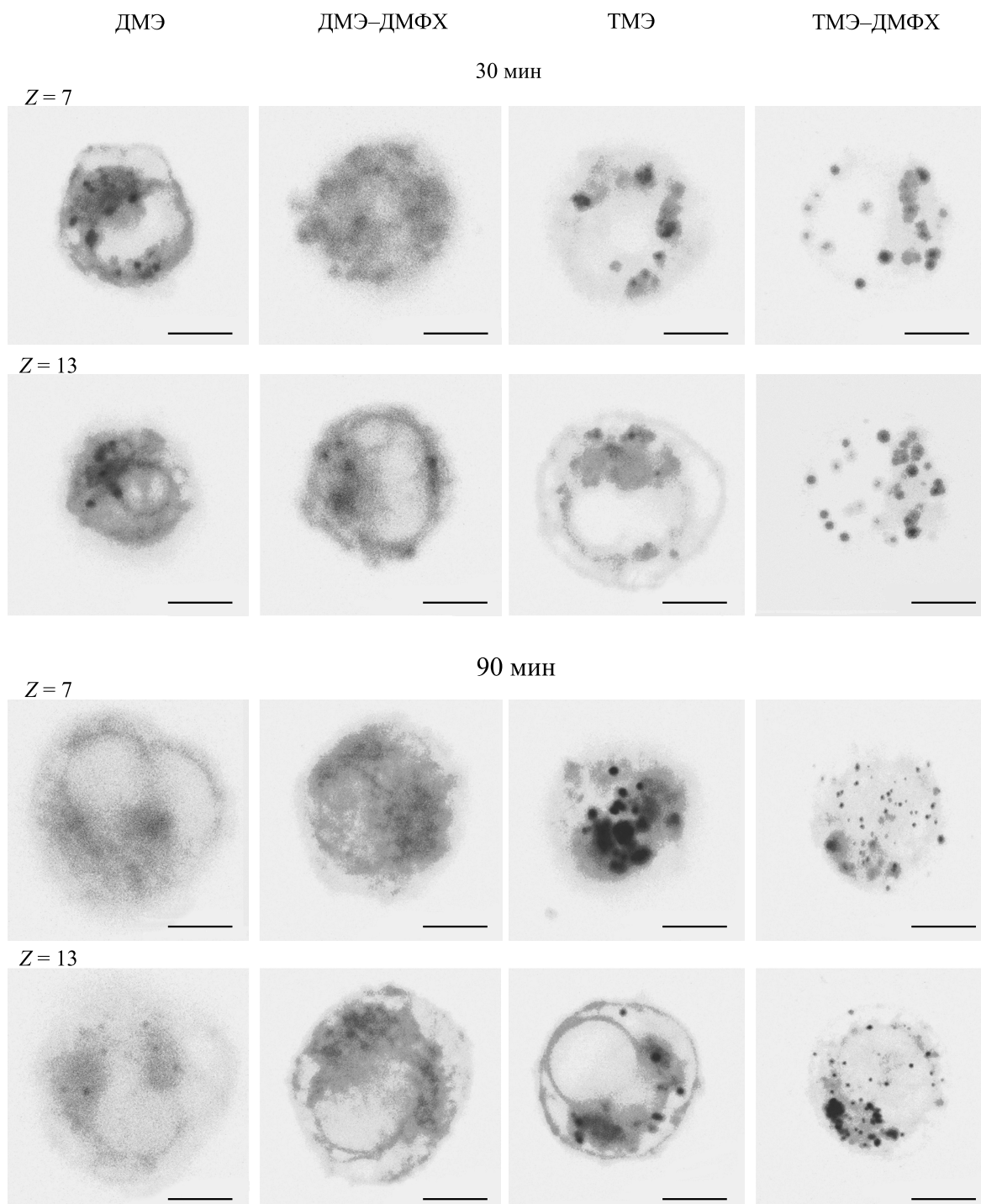


Рис. 4. Изображения клеток K562, окрашенных ПХл e_6 и их липосомальными формами, в режиме флуоресценции (инвертированы) через 30 и 90 мин инкубирования. Концентрация пигмента $1 \cdot 10^{-5}$ М; концентрация ЭСТ – 5%. Срезы клеток представлены для $Z=7$ и $Z=13$, число срезов $Z=20$. Соотношение пигмент : ДМФХ = 1 : 40. Масштабные отрезки на фотографиях – 10 мкм.

ресценции ПХл e_6 и их ЛФ в клетке с относительно высокой вероятностью перекрываются с флуоресценцией зонда эндоплазматического ретикулума (ККП $\geq 0,7$) и аппарата Гольджи (ККП от

0,5 до 0,7). Совпадение областей флуоресценции ПХл e_6 , их ЛФ и митохондриального зонда было умеренным (ККП $> 0,6$). Отмечена очень слабая корреляция между областями флуоресценции ли-

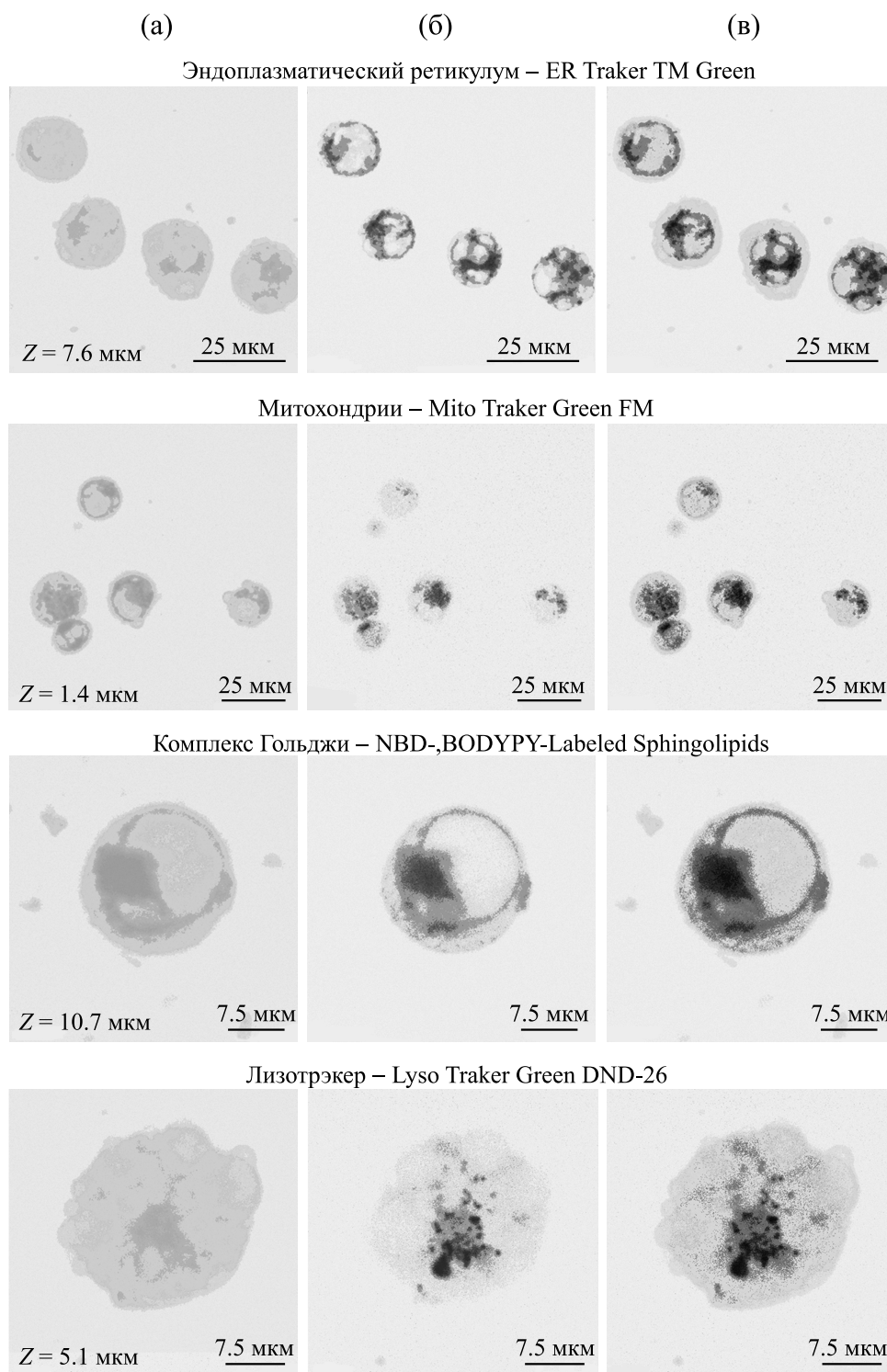


Рис. 5. Конфокальное изображение клеток K562 (инвертировано), окрашенных комплексом ДМЭ-ДМФХ (1 : 40) в свете флуоресценции ДМЭ (а); (б) – в свете флуоресценции колокализаторов и (в) – комбинарованное свечение клеток в результате наложения двух каналов регистрации флуоресценции (а и б).

зосомальных зондов и ДМЭ, ТМЭ и их ЛФ (ККП = 0,34–0,40) – что позволяет сделать заключение об относительно низком уровне накопления ПХл e_6 и их ЛФ в лизосомах.

Оценка механизмов фотоцитотоксического действия этерифицированных производных Хл e_6 и их липосомальных форм. При исследовании влияния свойств различных типов и форм введения на ак-

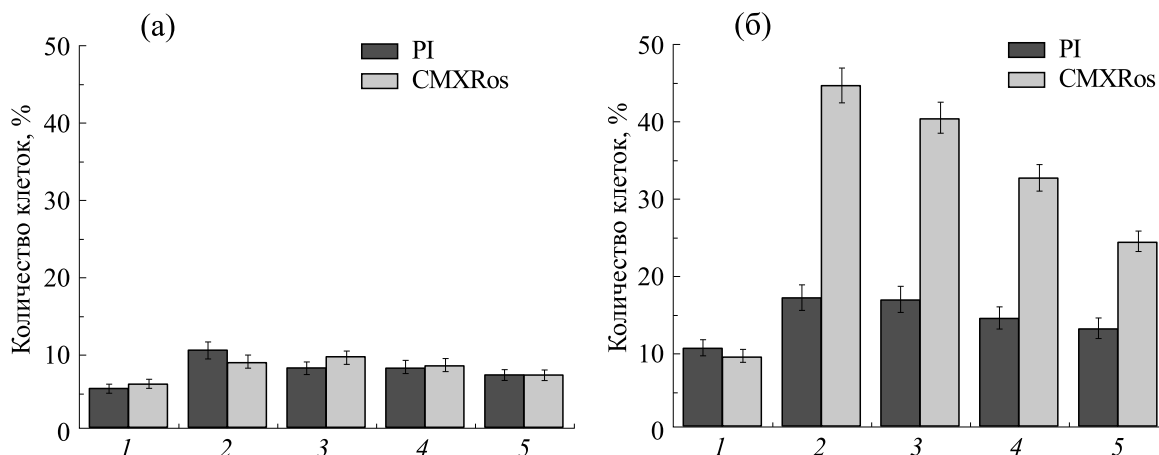


Рис. 6. Относительное содержание апоптотических (по тесту с CMXRos) и некротических (по тесту с иодидом пропидиума) клеток при фотосенсибилизации Хл e₆, ПХл e₆ и их ЛФ при времени инкубирования после фотооблучения 30 мин (а) и 180 мин (б). 1 – Хл e₆; 2 – ДМЭ; 3 – ДМЭ–ДМФХ; 4 – ТМЭ; 5 – ТМЭ–ДМФХ. Концентрация клеток K562 – $1 \cdot 10^6$ /мл. Общее количество клеток в образце принято за 100 %. Соотношение ДМЭ (ТМЭ) : ДМФХ = 1 : 40; концентрация хлоринов – $2 \cdot 10^{-7}$ М; концентрация сыворотки в среде инкубирования – 2%. Доза светового воздействия – 0,4 Дж/см², $\lambda = 660$ нм. Представлены средние значения и ошибка среднего ($M \pm m$) для трех независимых экспериментов.

тивность ФС представляет значительный интерес сравнение их способности сенсибилизировать некротические и апоптотические повреждения клеток.

Оценка цитотоксичности исследованных ФС и их ЛФ по МТТ-тесту показала, что при концентрациях хлоринов от $2 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ М в необлученных образцах не наблюдалось изменения жизнеспособности клеток K562. Действие световых потоков с дозой от 0,5 до 2 Дж/см² в отсутствие ФС также не приводило к росту гибели клеток.

Результативность фотосенсибилизированного воздействия на клетки оценивали после фотооблучения суспензии клеток K562, нагруженных Хл e₆, ПХл e₆ или их ЛФ, с использованием метода цитофлуориметрии с CMXRos и флуоресцирующим ДНК-красителем иодидом пропидиума.

С использованием описанных выше методик проведено сравнение результативности фотоповреждения клеток K562 при их сенсибилизации хлоринами и их липосомальными формами (рис. 6). При использовании в качестве фотосенсибилизаторов ПХл e₆ и их липосомальных форм степень как некротического, так и апоптотического повреждения клеток K562 через 30 мин после облучения была выше по сравнению с Хл e₆ (рис. 6а). После 3 ч инкубирования число апоптотически поврежденных клеток для Хл e₆ увеличилось в 1,5 раза, для ДМЭ, ЛФ ДМЭ, ТМЭ и ЛФ ТМЭ – в 2,1, 2,8, 2,6 и 2,4 раза соответственно. Сравнение эффективности воздействия показало,

что выход некротически измененных клеток для ПХл e₆, их ЛФ был также выше по сравнению с Хл e₆. Наиболее высокая эффективность фотосенсибилизации апоптотических повреждений клеток наблюдалась в случае ДМЭ и его ЛФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные в данной работе результаты показывают, что химическая модификация известного фотосенсибилизатора Хл e₆ посредством последовательной этерификация боковых карбоксильных групп оказывает неоднозначное влияние на скорость накопления ПХл e₆ в клетках. Использование ЛФ для введения этерифицированных ПХл e₆ практически не влияет на кинетику накопления этих ФС в клетках, в тоже время увеличение центров связывания, при введении ПХл e₆ в составе липосом, сопровождалось снижением уровня накопления ФС (табл. 1). Исходя из полученных данных по уровню накопления в клетках K562 исследованные ФС располагаются в ряду ДМЭ > ТМЭ > ЛФ ДМЭ > ЛФ ТМЭ >> Хл e₆. Отличия в скоростях накопления ПХл e₆ в клетках не связаны с влиянием процессов агрегации ФС во внеклеточной среде: с целью мономеризации неполярные ФС в растворах вводили в культуральную среду с ЭСТ за 60 мин до добавления клеток.

Ранее проведенные исследования с использованием клеток лейкоцитарной линии Raji, мононуклеарных клеток периферической крови доноров, лейкоцитарных клеток пациентов с острым лимфобластным лейкозом и пациентов с острым миелоидным лейкозом показали, что основными детерминантами, определяющими уровень накопления и эффективность сенсibilизации повреждения клеток, являются различия скоростей перераспределения ФС на плазматическую мембрану с белков сыворотки и наноносителей, а также скорость их трансмембранного переноса [13–16]. Согласно работам [14,17], при увеличении степени этерификации боковых групп Хл e_6 данные кинетические параметры претерпевают значительные разнонаправленные изменения. Процесс накопления относительно полярного Хл e_6 , способного быстро перераспределяться с белков среды и связываться с поверхностью клеток, ограничен крайне низкой скоростью трансмембранного переноса. Вследствие этого флуоресценция данного ФС регистрируется в первые 15–20 мин окрашивания клеток преимущественно в составе плазматической мембраны, а величина интегральной флуоресценции клеток, инкубированных с Хл e_6 , значительно ниже аналогичной характеристики для клеток, окрашенных ДМЭ и ТМЭ. Основным фактором, контролирующим скорость накопления ТМЭ в клетках, является низкая скорость диссоциации из комплексов с белками среды или из липидных везикул [18]. Умеренно неполярный ДМЭ, сочетающий высокую проницаемость в мембранных структурах с относительно высокой диффузионной подвижностью во внеклеточной среде накапливается в клетках с максимальной эффективностью.

Локализация ФС в клетке является важной детерминантой в определении эффективности механизмов повреждения клетки. Использование колокализаторов для различных клеточных органелл позволило провести оценку внутриклеточного распределения ПХл e_6 . Полученные значения коэффициентов корреляции Пирсона между флуоресценцией ДМЭ, ТМЭ, ЛФ ПХл e_6 и свечением митохондриального зонда, а также колокализаторов эндоплазматического ретикулаума и аппарата Гольджи свидетельствуют о преимущественной локализации ФС и их ЛФ в этих компартаментах клетки. Проведенные исследования с лизосомальным зондом показали низкий уровень корреляции между флуоресценцией лизосомальных зондов и флуоресценцией ПХл e_6 и их ЛФ. На основании этого можно предполо-

жить, что процессы эндоцитоза не играют важной роли при накоплении как ПХл e_6 , так и их липосомальных форм.

Способность ФС накапливаться в отдельных клеточных структурах, наряду с режимами фотооблучения, во многом определяет тип механизма фотосенсibilизированного повреждения клеток [1,19].

Результаты исследования сенсibilизации ПХл e_6 клеток K562 подтверждают наличие корреляции между уровнем накопления ФС и относительной эффективностью фотоповреждения клеток. Процент поврежденных клеток в образцах с Хл e_6 в 3,0 и 2,5 раза меньше в сравнении с ДМЭ и ТМЭ соответственно. В образцах, содержащих ЛФ ДМЭ и ТМЭ, процент некротически поврежденных клеток остается неизменным в пределах статистической погрешности в сравнении со свободными ПХл e_6 . Существенной особенностью процессов фотоповреждения клеток K562 при использовании в качестве ФС Хл e_6 и его производных являются отличия в относительном выходе апоптотически и некротически поврежденных клеток. При использовании Хл e_6 относительное количество поврежденных клеток, определяемое в тестах с иодидом пропидиума и CMXRos, одинаково. При облучении клеток в присутствии ДМЭ, ТМЭ и их ЛФ процент апоптотически поврежденных клеток значительно превышает процент числа клеток с поврежденной плазматической мембраной (некротические изменения). Полученные в данной работе результаты о различиях механизмов фотосенсibilизированного Хл e_6 и его производными повреждения клеток полностью согласуются с данными анализа степени экспрессии фосфатидилсерина — известного маркера апоптотических клеток, на внешней поверхности плазматической мембраны. Как показано в работе [17], фотосенсibilизированное ПХл e_6 воздействие на культуру лейкоцитарных клеток пациентов с острым лимфобластным лейкозом приводило к увеличению в 2,5–4,0 раза числа Annexin V — положительного пула клеток по сравнению с Хл e_6 .

Отличия в клеточных механизмах фотоцитотоксичности Хл e_6 и его производных не связаны с различной интенсивностью фотосенсibilизированного воздействия на клетки вследствие отличий количества накопленных ими фотосенсibilизаторов. При уменьшении в 3–10 раз концентрации ДМЭ и ТМЭ в клеточных суспензиях фотоповреждения клеток протекают преимуще-

ственно по механизму апоптоза (данные не приведены).

Следует отметить, что основные фотофизические характеристики всех исследованных соединений в мономерной форме, в том числе при включении их в липосомы, практически совпадают. В выбранных условиях экспериментов для Хл e_6 и его производных практически отсутствуют различия в генерации синглетного кислорода, основного интермедиатора фотохимических повреждений в клетках [12,14]. Можно предположить, что различия в механизмах повреждения обусловлены особенностями внутриклеточной локализации и, как следствие, различиями в мишенях фотосенсибилизированного действия исследуемых ФС в клетках. В этой связи следует обратить внимание на отличия в локализации Хл e_6 и его производных в митохондриях клетки. Ряд экспериментальных данных свидетельствует, что сенсибилизированное фотовоздействие на митохондрии клеток активизирует преимущественно апоптотические пути их гибели [15,20]. Повышенное сродство ПХл e_6 к митохондриям при более высоком общем уровне накопления в клетках обеспечивает значительно более высокую интенсивность (степень) сенсибилизированного воздействия на эти органеллы и, как следствие, преимущественную гибель клеток по механизму апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Физико-химические свойства ФС и фармакологические формы их введения определяют уровень и кинетику накопления ФС в клетках.

2. Липосомальные формы позволяют предотвратить агрегацию хлоринов и не приводят к снижению их фотосенсибилизирующей активности.

3. Этерифицированные производные хлорина e_6 – ДМЭ и ТМЭ и их ЛФ преимущественно локализуются в эндоплазматическом ретикулуме клетки и комплексе Гольджи, а также имеют умеренную локализацию в митохондриях. Установлено более низкое значение ККП для митохондриального зонда и Хл e_6 по сравнению с его производными и их ЛФ. В липосомах отмечен низкий уровень локализации для Хл e_6 , его производных и их ЛФ.

4. Различия в механизмах повреждения клеток Хл e_6 , его производными и их ЛФ определяются различной векторизацией (направленностью) сенсибилизированного действия исследуемых ФС в клетках K562: более высокая апоптотическая активность ПХл e_6 и их ЛФ, по сравнению с Хл e_6 , обусловлена различиями в уровне накопления в митохондриях клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, проект № Б17-106.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Li, Y. Yu, L. Kang, and Y. Lu, *Int. J. Clin. Exp. Med.* **7** (12), 4867 (2014).
2. А. А. Красновский мл., в кн. «Проблемы регуляции в биологических системах», под ред. А. Б. Рубина (М.-Ижевск, 2006), сс. 223–244.
3. M. H. Teiten, L. Bezdetnaya, P. Morliere, et al., *Brit. J. Cancer* **88**, 146 (2003).
4. H. Abrahamse, M. R. Hamblin, *Biochem. J.* **473**, 4, 347 (2016).
5. V. P. Zorin, V. P. Savitskiy, and M. P. Potapnev, *Experiment. Oncol.* **24**, 142 (2002).
6. Т. Е. Зорина, А. А. Далидович, Л. Н. Марченко и др., *Офтальмология. Восточная Европа* **4**, 93 (2011).
7. M. K. Riaz, M. A. Riaz, X. Zhang, et al, *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 195 (2018).
8. L. A. S. Abu and T. Ishida, *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 1 (2017).
9. H. Fischer and H. Orth, *Die chemie des pyrrolis* (Acad. Verlag, 1937).
10. R. Taylor, *J. Liagn. Med. Sonogr.* **6**, 35 (1990).
11. А. П. Шпакова, К. С. Палова и Т. И. Булычева, *Иммунология* **2**, 20 (2000).
12. Т. Е. Зорина, И. В. Янковский, И. Е. Кравченко и др., *Биофизика* **60**, 922 (2015).
13. V. P. Zorin., I. I. Khludeyev, T. E. Zorina, et al., *Proc. SPIE. Lazer Use in Oncology II.* **4059**, 139 (2000).
14. В. П. Зорин, И. И. Хлудеев и Т. Е. Зорина, *Биофизика* **45**, 313 (2000).
15. E. Bastein, R. Schneider, S. Hackbarth, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 2203 (2015).
16. В. П. Савицкий, В. П. Зорин, М. П. Потапенко и А. Я. Потапенко, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **138** (8), 180 (2004).
17. В. П. Савицкий. Автореферат дис. ... канд. биол. наук (РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, 2008).
18. В. П. Зорин, И. С. Михаловский, Т. Е. Зорина и др., *Биофизика* **40**, 328 (1995).
19. I. O. Basselar, T. M. Tsubone, C. Pavani, and M. S. Baptista, *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 20523 (2015).
20. J. Wu, Q. Xiao, Na Zhang, et al., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **15** (2016).

Intracellular Localization and Mechanisms of Phototoxicity of Chlorin E₆ Derivatives and Their Liposomal Formulations

T.E. Zorina*, I.V. Yankovsky*, I.V. Yakovets*, I.E. Kravchenko*, T.I. Ermilova**, T.V. Shman**, M.V. Belevtsev**, and V.P. Zorin*

*Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Republic of Belarus

**Belarusian Research Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Frunzenskaya ul. 43, Borovlyany, Minsk Region, 223053 Republic of Belarus

Confocal microscopy and colocalization analysis with Pearson correlation coefficients were used to show that esterified chlorin e₆ derivatives and their liposomal forms are mainly localized in the endoplasmic reticulum, Golgi complex, cell mitochondria and levels of their localization in lysosomes are low. Routes of photosensitizer administration in pharmacology strongly affect the level and kinetics of photosensitizer accumulation in cells, but do not have a considerable effect on intracellular localization of chlorin e₆ derivatives. Differences in the photodynamic activity and sensitization mechanisms for chlorin e₆ derivatives and their liposomal forms were shown when compared to those of chlorine e6 photosensitizers in K562 cells. It is assumed that observed differences in the mechanisms of cellular damage are to a greater extent due to specific photosensitizer localization.

Keywords: chlorin e₆ derivatives, liposomal formulations, intracellular localization, cytotoxicity, apoptosis