

# ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ МЕЗО-ТЕТРА(3-ПИРИДИЛ)БАКТЕРИОХЛОРИНА

Ю.С. Маклыгина<sup>1</sup>, А.В. Бородин<sup>1</sup>, А.В. Рябова<sup>1,2</sup>, Д.В. Поминова<sup>1</sup>, Е.А. Макарова<sup>3</sup>,  
Е.А. Лукьянец<sup>3</sup>, В.Б. Лощенов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

<sup>3</sup>Государственный научный центр «НИОПИК», Москва, Россия

## Резюме

В настоящей статье представлены результаты исследования внутриклеточного распределения молекулярных нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, предлагаемых для использования в качестве терапевтических агентов для фотодинамической терапии. Исследования и оценка изменений спектроскопических свойств молекулярных кристаллов фотосенсибилизатора ближнего инфракрасного диапазона были проведены с помощью специального комплекса оборудования, созданного на базе волоконного спектрометра. В рамках работы проведено исследование и анализ характера внутриклеточного накопления мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в молекулярной (растворитель диметилсульфоксид) и нанокристаллической формах на различных культурах клеток: моноциты человека (THP-1), клетки рака шейки матки человека (HeLa) и клетки злокачественной опухоли мозга мыши (глиома С6). Оценку динамики внутриклеточного накопления исследуемого препарата в концентрациях 5 и 10 мг/л проводили с помощью лазерного микроскопа-спектроанализатора, а также методом конфокальной микроскопии. В ходе исследования было показано, что при взаимодействии с клеточными культурами молекулярные нанокристаллы исследуемого препарата приобретают способность к флуоресценции, откуда следует, что в клеточном окружении наночастицы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина становятся фототоксичными, что открывает перспективы их использования для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Особая роль мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в ряду фотосенсибилизаторов обусловлена его спектральными характеристиками, а именно поглощением и флуоресценцией в ближнем инфракрасном диапазоне, что позволяет анализировать и воздействовать на более глубокие слои биоткани. Таким образом, использование наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в качестве нанофотосенсибилизатора может повысить эффективность диагностики и терапии глубокозалегающих опухолей.

**Ключевые слова:** флуоресцентная диагностика, спектроскопия обратного рассеяния, внутриклеточное распределение фотосенсибилизатора, фотосенсибилизатор ближнего инфракрасного диапазона, мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин, кристаллические наночастицы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина.

**Для цитирования:** Маклыгина Ю.С., Бородин А.В., Рябова А.В., Поминова Д.В., Макарова Е.А., Лукьянец Е.А., Лощенов В.Б. Исследование внутриклеточного распределения кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина // Biomedical Photonics – 2016. – Т. 5, № 4. – С. 25–34.

**Контакты:** Лощенов В.Б., e-mail: loschenov@mail.ru

## STUDY OF SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF CRYSTALLINE MESO-TETRA(3-PYRIDYL)BACTERIOCHLORIN NANOPARTICLES

Maklygina Yu. S.<sup>1</sup>, Borodkin A.V.<sup>1</sup>, Ryabova A.V.<sup>1,2</sup>, Pominova D.V.<sup>1</sup>, Makarova E.A.<sup>3</sup>,  
Lukyanets E.A.<sup>3</sup>, Loshchenov V.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup>National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

<sup>3</sup>State Scientific Center Scientific Research Institute Organic Intermediates and Dyes, Moscow, Russia

## Abstract

The results of the study of subcellular distribution of molecular meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanocrystals proposed as therapeutic agents for photodynamic therapy are represented in the article. Investigations and measurement of spectroscopic properties of molecular crystals of near-infrared photosensitizer were conducted using special device complex based on fiber-optic spectrometer. Investigation and analysis of the pattern of subcellular accumulation of meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin in molecular (dimethyl sulfoxide (DMSO)

as solvent) and nanocrystalline forms on different cell lines: human monocytes (THP-1), human cervical cancer cells (HeLa) and mouse malignant brain tumor cells (glioma C6). The dynamics of subcellular accumulation of the agent at concentration of 5 and 10 mg/l was assessed with laser microscope-spectrum analyzer and by confocal microscopy. The study showed that in the course of interaction with cell lines molecular nanocrystals of the agent developed ability to fluorescence. Hence, in the cellular environment *meso*-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin nanoparticles became phototoxic giving opportunities for their use for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy. Specific role of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin in the range of photosensitizers is determined by its spectral characteristics, i.e. absorption and fluorescence in near-infrared band, which allows measuring and affecting on deeper layers of biotissue. Thus, the use of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles as nanophotosensitizers may improve the efficacy of diagnosis and treatment of deep-seated tumors.

**Key words:** fluorescence diagnosis, backscattering spectroscopy, photosensitizer intracellular distribution, NIR-photosensitizers, *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin, crystalline nanoparticles of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin.

**For citations:** Maklygina Yu. S., Borodkin A.V., Ryabova A.V., Pominova D.V., Makarova E.A., Lukyanets E.A., Loshchenov V.B. Study of subcellular distribution *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 4, pp. 25–34 (in Russian).

**Contacts:** Loschenov V.B., e-mail: loschenov@mail.ru

## Введение

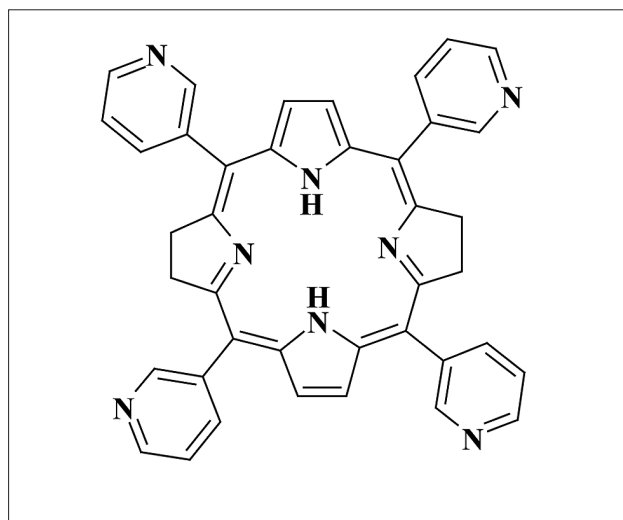
Создание многофункциональных наноматериалов для ранней диагностики и лечения онкологических заболеваний является актуальной задачей. В последнее время особое внимание уделяется повышению чувствительности и функциональной направленности наночастиц, тропных к опухолевым клеткам на ранней стадии развития новообразований, для оптических методов терапии и диагностики. Традиционно используемые для флуоресцентной диагностики фотосенсибилизаторы часто обладают недостаточной селективностью накопления в опухолевых и воспаленных тканях по сравнению с окружающими нормальными.

Решением в сложившейся ситуации может быть использование наночастиц, за счет размерности которых можно повысить селективность накопления в тканях-мишенях на несколько порядков. В частности, такими наночастицами могут быть молекулярные нанокристаллы на основе уже известных фотосенсибилизаторов [1]. Водонерастворимые и нетоксичные в кристаллическом виде, при контакте с опухолевыми или иммунными клетками они меняют свои спектроскопические свойства: приобретают способность флуоресцировать, становятся фототоксичными, чем обуславливается дополнительная избирательность воздействия [2]. Важнейшей характеристикой фотосенсибилизаторов наряду с высокой фотодинамической эффективностью и высоким квантовым выходом флуоресценции является спектральный диапазон оптического возбуждения. Тетрагидропроизводные порфиринов – бактериохлорины, обладая пиком поглощения в ближнем инфракрасном диапазоне, соответствующем области максимальной оптической прозрачности биологических тканей, способны обеспечить наибольшую глубину терапевтического воздействия, что делает их наиболее перспективными из ныне существующих фотосенсибилизаторов, особенно в аспекте диагностики и терапии глубокозалегающих новообразований [3–10].

## Материал и методы

### Исследуемый фотосенсибилизатор

В качестве фотосенсибилизатора использовали мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин (рис. 1) производства ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» (Россия) [11–12].



**Рис. 1.** Химическая формула мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина

**Fig. 1.** Chemical formula of *meso*-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin

Для проведения исследований был приготовлен водный коллоид молекулярных нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина. Для этого поликристаллический порошок добавляли в дистиллированную воду до получения концентрации 1 мг/мл. Полученную суспензию подвергали диспергированию в ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin SONOPLUS HD2070 (Германия) с насадкой KE76 (20 кГц, амплитуда 165 мкм). С помощью многоугольного спектрометра динамического рассеяния света Photocor Complex (Россия), позволяющего путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного

света получить распределение по размерам наночастиц, было установлено, что средний диаметр частиц в водном коллоиде составил 220÷240 нм.

Спектры поглощения были получены с помощью компьютеризированного спектрофотометра Hitachi U-3400 (Япония). Истинный раствор мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в полярном растворителе диметилсульфоксиде (ДМСО) демонстрировал максимумы поглощения на длинах волн 350, 373, 516 и 761 нм, соответствующие спектру поглощения мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, и малоинтенсивные максимумы на длинах волн 417 и 655 нм, соответствующие спектру поглощения примеси хлорина (рис. 2). Если сравнить спектры раствора и водного коллоида мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, то можно заметить, что длины волн пиков поглощения раствора совпадают с пиками пропускания коллоида.

Этот довольно необычный факт можно объяснить тем, что поверхностные молекулы наночастицы образуют своего рода антенну, которая эффективно рассеивает излучение в спектральном диапазоне, соответствующем поглощению свободных молекул. Нетрудно заметить, что в спектре поглощения кол-

лоида мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина имеется два провала. Один соответствует пику поглощения молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина при 516 нм, а второй – пику поглощения молекулы хлорина при 660–670 нм. Предположительно, эти молекулы связаны с поверхностью кристаллической наночастицы силами ван-дер-ваальса (диполь-дипольное притяжение), которые меняются под действием растворителя или других органических молекул. В зависимости от ближайшего окружения поверхностные молекулы могут «лежать», принимая пара-положение относительно поверхности наночастицы, или «вставать», принимая орто-положение, удерживаясь на поверхности и проявляя спектроскопические свойства раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина. Начало взаимодействия наночастиц с клеточной мембраной и органеллами клеток происходит через поверхностные молекулы, которые в зависимости от силы взаимодействия могут удерживаться на поверхности или отрываться от наночастицы, вероятно, оставляя отдельные молекулы в виде мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина, связанные с биоорганическими молекулами.

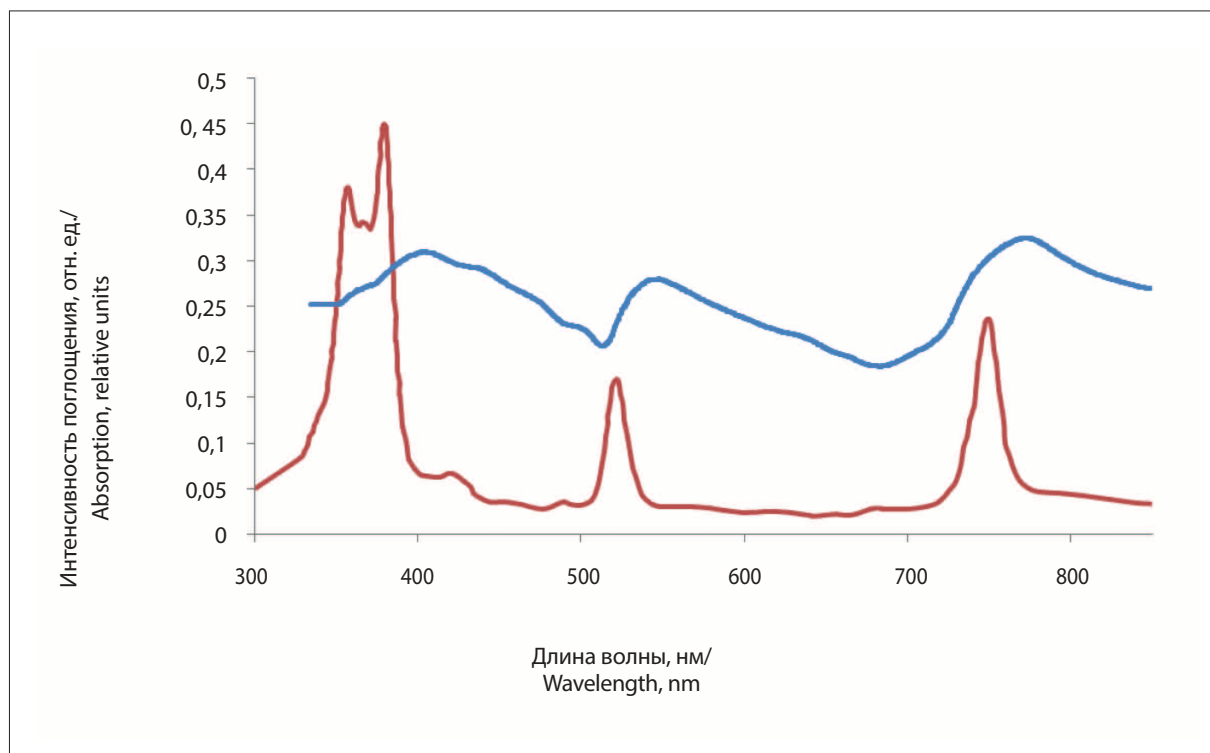


Рис. 2. Спектры поглощения раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в ДМСО (•) и водного коллоида нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (•)

Fig. 2. Absorption spectra of meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin solution in DMSO (•) and aqueous colloid of meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanocrystals (•)

**Биологические материалы**

Для проведения экспериментов по внутриклеточному распределению использовали клетки иммунной системы – моноциты человека THP-1, культуру клеток рака шейки матки человека HeLa и культуру клеток злокачественной опухоли мозга мыши глиому С6. Водный коллоид мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (1 мг/мл) добавляли к культуральной среде в объеме 5 мкл и 10 мкл на 1 мл среды – соответственно, концентрация препарата в наноформе в экспериментах составляла 5 мг/л и 10 мг/л. Раствор мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в ДМСО (0,5 мг/мл) добавляли к культуральной среде в объеме 10 мкл на 1 мл среды – соответственно, концентрация препарата в экспериментах составляла 5 мг/л.

**Методы исследования***Спектральная лазерная микроскопия*

Для проведения спектральной лазерной микроскопии использован лазерный микроскоп-спектроанализатор [13], который позволяет одновременно получать микроскопическое изображение исследуемого объекта с визуализацией центров флуоресценции и спектры флуоресценции, регистрируемые в диапазоне 0,4–1,1 мкм с помощью волоконного спектрометра ЛЭСА-01-Биоспек (Россия), модифицированного специальными оптическими фильтрами, при возбуждении образца лазером с длиной волны излучения 510,6 нм и выходной плотностью мощности 100 мВт/см<sup>2</sup>. Устройство микроскопа-спектроанализатора позволяет зондировать заданную область пространства и, сфокусировавшись визуально на интересующей области, получать спектр флуоресценции в заданной точке накопления фотосенсибилизатора.

*Конфокальная микроскопия*

С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в различных клеточных культурах: клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1, и опухолевых клетках мозга мыши – глиомы С6.

**Результаты****Культура опухолевых клеток HeLa**

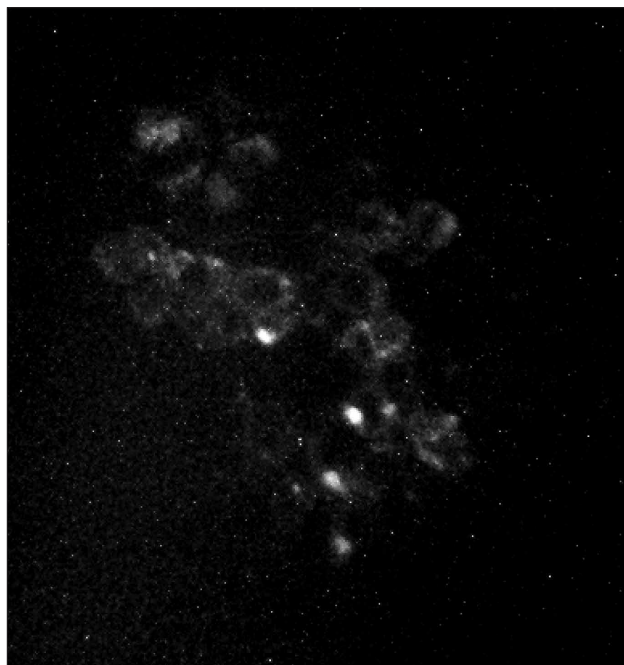
В ходе исследований по внутриклеточному распределению коллоида наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина для культур клеток HeLa и THP-1 были выявлены некоторые различия.

Так, спустя 2 ч после инкубации коллоида наночастиц с опухолевыми клетками HeLa (концентрация раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 10 мг/л), цитоплазматическая мембрана и отдельные внутриклеточные органеллы

проявляли интенсивную флуоресценцию, соответствующую спектру флуоресценции раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина с максимумом на 752 нм. Микроскопические изображения клеток HeLa с центрами интенсивной флуоресценции мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина представлены на рис. 3, а спектр флуоресценции в области с интенсивной флуоресценцией – на рис. 4.

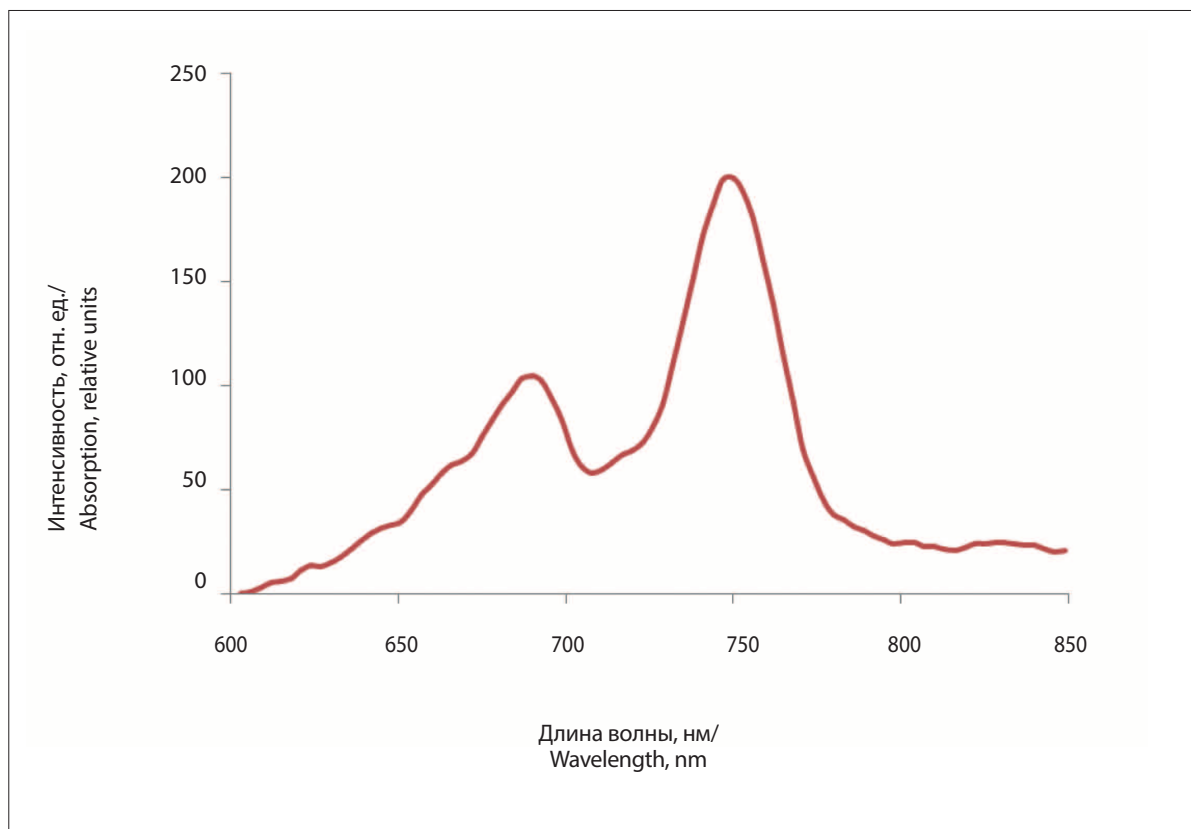
**Клетки иммунной системы THP-1**

После инкубации коллоида наночастиц с клетками иммунной системы (концентрация раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 10 мг/л) спустя 2 ч сигнала флуоресценции, соответствующего раствору мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, зарегистрировано не было. Однако при дополнительном лазерном освещении с длиной волны 510,6 нм наблюдалось возникновение флуоресценции с максимумом на длине волны 760 нм. Этот эффект вероятно можно объяснить трансформацией кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина на границе



**Рис. 3.** Микроскопическое изображение (60-кратное увеличение) очагов флуоресценции, вызванной повышенной локальной концентрацией растворенного мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри органелл клеток HeLa, полученное при возбуждении лазерным излучением ( $\lambda=510,6$  нм)

**Fig. 3.** A micrograph (60-fold image magnification) of fluorescence foci caused by increased local concentration of dissolved meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin inside cell organelles HeLa, obtained with excitation by laser radiation ( $\lambda=510,6$  nm)



**Рис. 4.** Спектр флуоресценции молекулярного раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной среде HeLa при возбуждении лазерным излучением ( $\lambda=510,6$  нм) (\*)

**Fig. 4.** Fluorescence spectrum of molecular *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin solution in cell medium HeLa with excitation by laser radiation ( $\lambda=510,6$  nm) (\*)

клеток благодаря поглощению энергии лазерного излучения, вследствие чего отдельные молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина приобрели способность к флуоресценции (рис. 5–6).

В ходе работы была изучена динамика накопления и взаимодействие с клетками иммунной системы водного коллоидного раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, в частности проведена оценка изменения интенсивности флуоресценции изучаемого препарата при взаимодействии с клетками (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л).

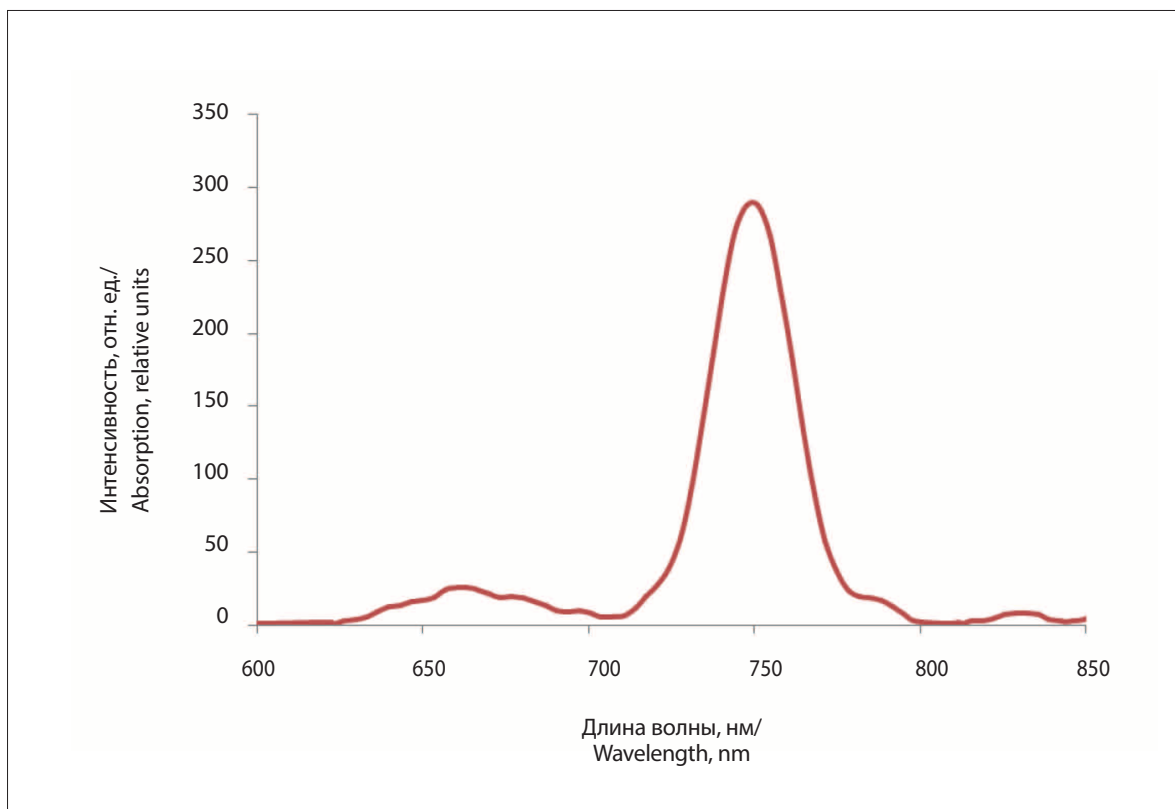
С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1. Полученное микроскопическое изображение внутриклеточного распределения коллоидного раствора наночастиц демонстрирует диффузное распределение мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур (рис. 7).



**Рис. 5.** Микроскопическое изображение (60-кратное увеличение) флуоресценции, вызванной повышенной внутриклеточной концентрацией кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, полученное при возбуждении лазерным излучением ( $\lambda=510,6$  нм)

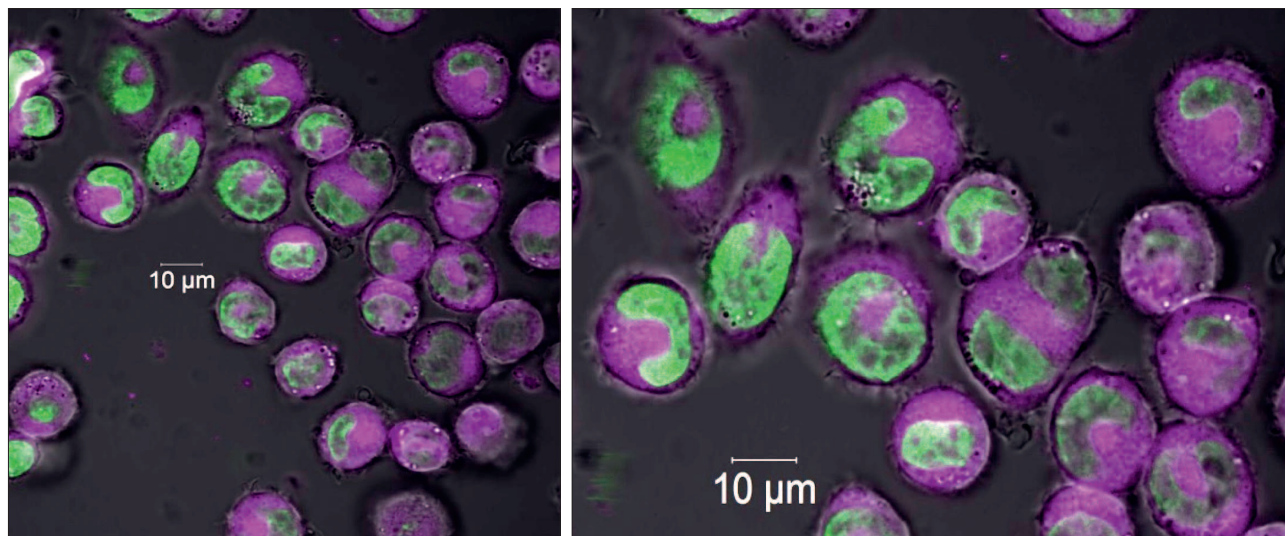
**Fig. 5.** A micrograph (60-fold image magnification) of fluorescence caused by increased intracellular concentration of crystalline *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles obtained with excitation by laser radiation ( $\lambda=510.6$  nm)





**Рис. 6.** Спектр флуоресценции коллоидного раствора наночастиц *мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина* в клеточной среде макрофагов при возбуждении лазерным излучением ( $\lambda=510,6$  нм) (\*)

**Fig. 6.** Fluorescence spectrum of colloid solution of *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* nanoparticles in the macrophages' cell medium with excitation by laser radiation ( $\lambda=510,6$  nm) (\*)



**Рис. 7.** Внутриклеточное распределение наночастиц *мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина* в клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1

**Fig. 7.** *Meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* nanoparticle subcellular distribution within the immune system cells, i.e. human monocytes THP-1

### Клетки злокачественной глиомы С6

С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках злокачественной опухоли мозга мыши – глиоме С6 (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л). Полученное микроскопическое изображение внутриклеточного распределения коллоидного раствора наночастиц демонстрирует диффузное распределение мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур (рис. 8).

### Обсуждение

Как уже было сказано ранее, в зависимости от ближайшего окружения поверхностные молекулы исследуемого вещества могут иметь различную пространственную ориентацию или положение, которые можно обозначить как орто- и пара-положения. Взаимодействие наночастиц с мембраной и органеллами клеток происходит за счет поверхностных молекул, конфигурация которых зависит от силы этого взаимодействия с клетками. Таким образом, поверхностные молекулы наночастиц могут удерживаться на поверхности или отрываться от наночастицы, оставляя отдельные молекулы в виде мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина в контакте с клеточными структурами. В зависимости от того какое именно положение приняли поверхностные молекулы при контакте с клетками исследуемый препарат проявляет спектроскопические свойства моле-

кулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина.

Для оценки флуоресцентного сигнала молекул хлорина использовали спектральный диапазон 633–691 нм, а для оценки флуоресцентного сигнала молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина – спектральный диапазон 691–758 нм (рис. 9).

Экспериментальная оценка изменения интенсивности флуоресценции наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л) при взаимодействии с клетками иммунной системы (моноцитами человека THP-1) и клетками злокачественной опухоли мозга мыши (глиомой С6) показала, что интенсивность флуоресценции молекул со спектроскопическими свойствами хлорина выше интенсивности флуоресценции молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина. Полученная временная зависимость позволяет сделать вывод о том, что интенсивность флуоресценции наночастиц меняется во времени в средах с различными культурами клеток по-разному (рис. 10). Так, в экспериментах с клетками глиомы головного мозга мыши было установлено, что интенсивность флуоресцентного сигнала поверхностно-активных молекул наночастиц, которые приняли положение, отличающееся спектроскопическими свойствами, характерными для молекулы хлорина, со временем изменяется слабо, и в течение 24 ч был зафиксирован незначительный рост интенсивности сигнала. Интенсивность флуоресценции молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина меняется со временем так, что можно выделить

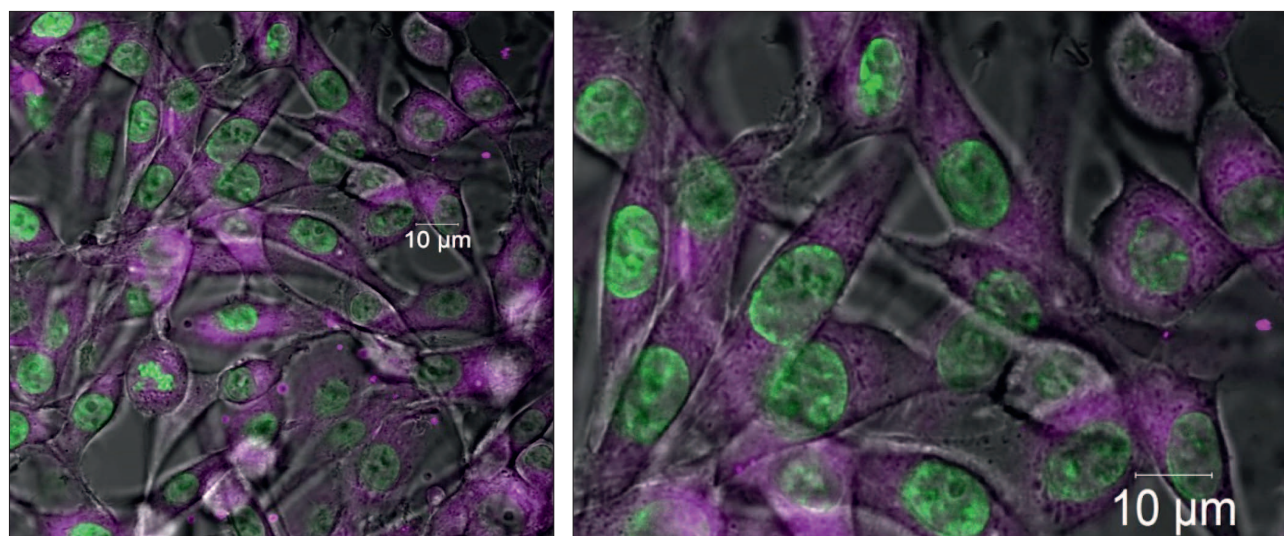
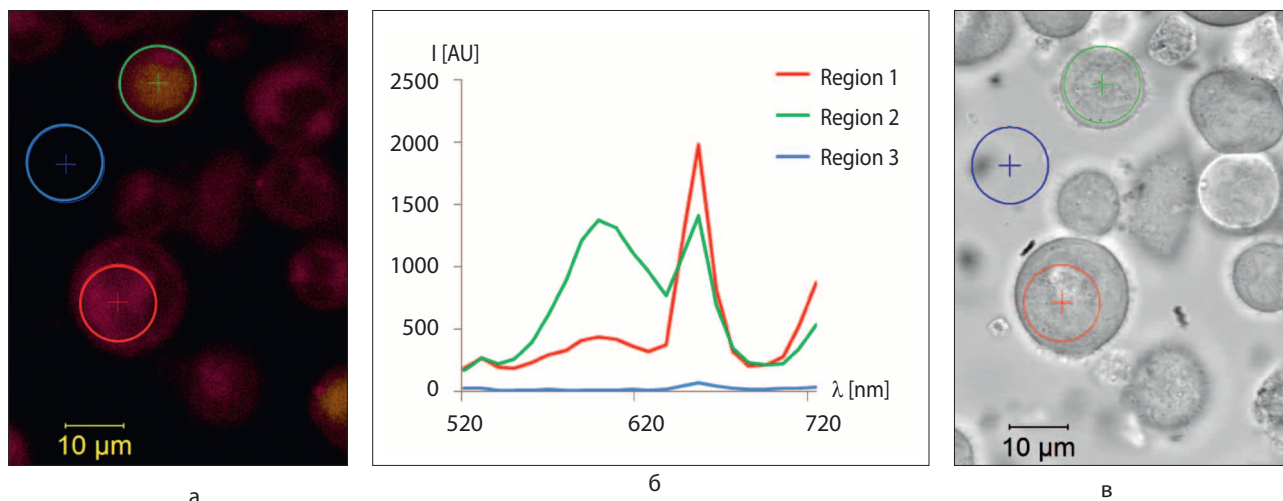


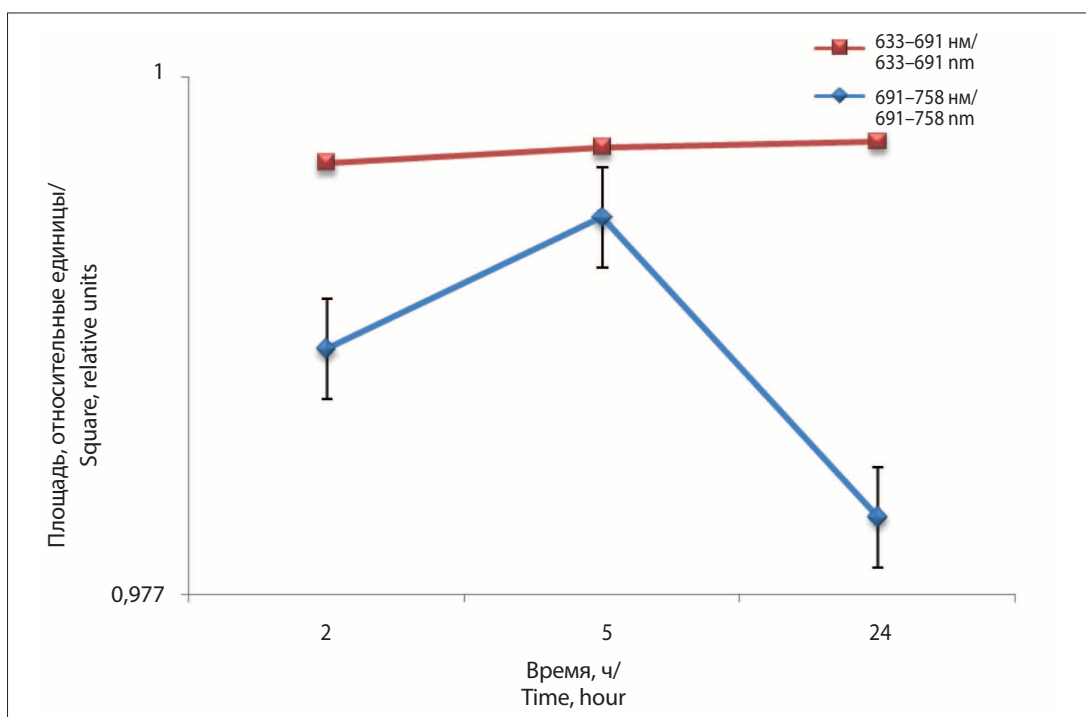
Рис. 8. Внутриклеточное распределение наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках злокачественной опухоли мозга мыши – глиомы С6

Fig. 8. Meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticle subcellular distribution within cancer cells of mouse cerebral tumor, i.e., glioma C6



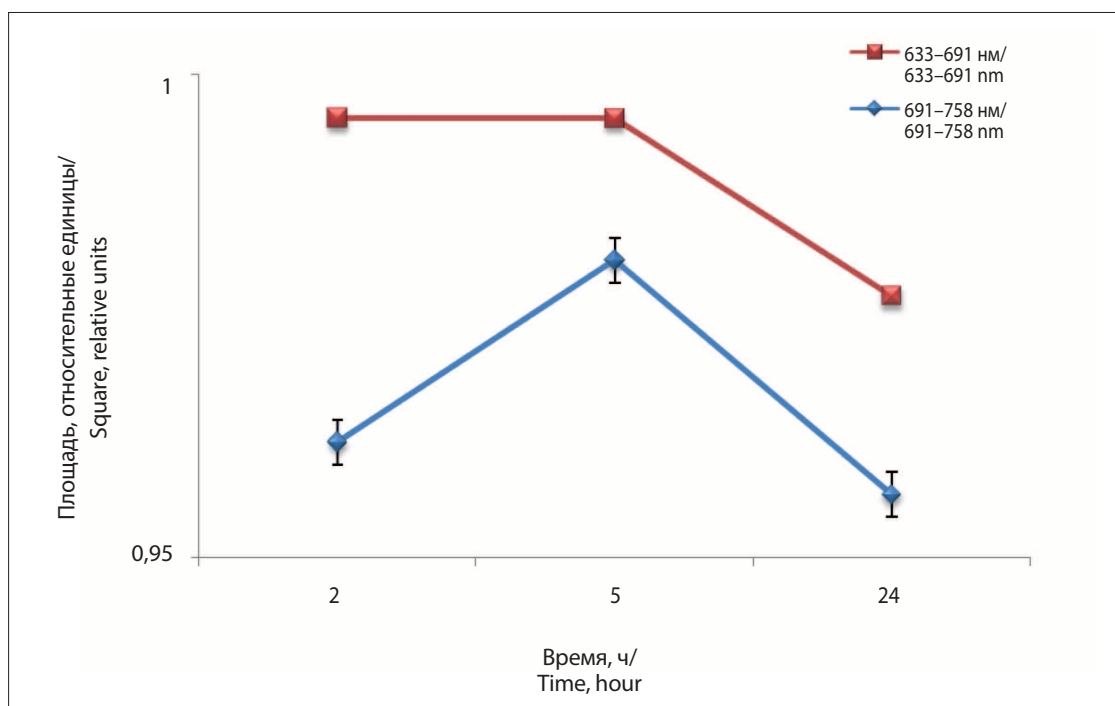
**Рис. 9.** Флуоресцентные свойства мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в культуре клеток моноцитов человека THP-1: а – флуоресцентное микроскопическое изображение, полученное со спектральным разрешением при возбуждении лазером с длиной волны 514 нм; б – спектры флуоресценции, соответствующие выделенным областям: 1 – клетка, накопившая мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин, обладающая повышенным уровнем аутофлуоресценции в области 600 нм, 2 – клетка, накопившая мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин, обладающая повышенным уровнем аутофлуоресценции в области 600 нм, 3 – фоновое свечение культуральной среды; в – изображение клеток в проходящем свете

**Fig. 9.** Fluorescence properties of *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* within culture of human monocytes THP-1 cells: а – fluorescence microscopy image is obtained with a spectral resolution with laser excitation on the wavelength of 514 nm; б – fluorescence spectra correspond to the selected areas: 1 – cell accumulated *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin*, 2 – cell accumulated *meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin* with elevated autofluorescence level in the 600 nm, 3 – background glow of cell culture medium; в – the cell image in the transmitted light



а





6

**Рис. 10.** Временная зависимость интенсивности сигнала флуоресценции поверхностно активных молекул наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина:

а – в клетках глиомы С6;

б – в клетках иммунной системы – моноцитах человека THP-1

(•) 633–691 нм: флуоресцентный сигнал, соответствующий поверхностно активным молекулам, которые имеют спектроскопические свойства молекулы хлорина

(•) 691–758 нм: флуоресцентный сигнал, соответствующий поверхностно активным молекулам, которые имеют спектроскопические свойства молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина

**Fig. 10.** Fluorescence signal time dependency for the surface-active molecules of *meso*-tetra(3-pyridyl) bacteriochlorin nanoparticle

a – within the glioma C6 cells

b – within the immune system cells, i.e., human monocytes THP-1

(•) 633–691nm: fluorescent signal corresponding to the surface-active molecules, which have the spectroscopic properties of chlorin molecule

(•) 691–758 nm: fluorescent signal corresponding to the surface-active molecules, which have the spectroscopic properties of *meso*-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin molecule

период разгорания флуоресценции в течение первых 5 ч инкубации и период выведения по прошествии 5 ч (5–24 ч) после начала инкубации с клетками глиомы С6 (рис. 10а). Эксперименты с клетками иммунной системы показали, что и для молекул хлорина, и для молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина характерны период разгорания флуоресценции в течение первых 5 ч инкубации с клетками и период выгорания при инкубации препарата с клетками более 5 ч (5–24 ч) (рис. 10б).

## Заключение

Взаимодействие молекулярных нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина с клетками приводит к появлению спектра флуоресценции,

характерного для раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина. Водный коллоид нанокристаллов мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, изначально не являясь фототоксичным, в условиях клеточного окружения демонстрирует свойства фотосенсибилизатора ближнего инфракрасного диапазона. С помощью конфокальной микроскопии продемонстрировано диффузное распределение мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур. Продemonстрировано, что исследованный мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин является перспективным соединением для создания препарата на основе его молекулярных нанокристаллов для использования в качестве терапевтического агента с большой глубиной фотодинамического воздействия.

Работа была поддержана грантами РФФИ № 15-29-04869 офи\_м, Министерства Образования и науки РФ, соглашение №14.604.21.0014 от 17/06/2014 (RFMEFI60414X0014), FP7-PEOPLE-2013-IRSES No.612620.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Breymayer J., Rück A., Ryabova A.V., и др. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticle // *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2014. – Vol. 11, Is. 3. – P. 380-390.
2. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation // *J. Biophoton*. – 2010. – Vol. 3, No. 5-6. – P. 336-346.
3. Oertel M., Schastak S.I., Tannapfel A., et al. Novel bacteriochlorin for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in a mouse tumour model // *J. Photochem. Photobiol. B*. – 2003. – Vol. 71. – P. 1-10.
4. Mazor O., Brandis A., Plaks V., et al. WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution, and vascular targeted photodynamic activity against melanoma tumors // *Photochem. Photobiol.* – 2005. – Vol. 81. – P. 342-351.
5. Rovers J.P., de Jode M.L., Rezzoug H., Grahn M.F. In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5, 10, 15, 20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – Vol. 72. – P. 358-364.
6. Миронов А.Ф., Грин М.А., Кармакова Т.А., и др. Новые фотосенсибилизаторы для ФДТ рака на основе природного бактериохлорофилла а // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 33-34.
7. Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., и др. Аминоамиды в ряду бактериохлорофилла а и их фотоиндуцированная активность в системах in vitro и in vivo // *Biomedical photonics*. – 2013. – № 3. – С. 29-30.
8. Грин М.А., Пантюшенко И.В., Плотникова Е.А., и др. Новые фотосенсибилизаторы на основе бактериопурпуринимида и их фотоиндуцированная противоопухолевая активность // *Biomedical photonics*. – 2013. – № 3. – С. 33-34.
9. Решетников Р.И., Грин М.А., Харитонов О.В., и др. Бактериохлорин-содержащая триада для совместной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии рака // *Biomedical photonics*. – 2013. – № 3. – С. 34.
10. Миронов А.Ф., Грин М.А., Ципровский А.Г., и др. Новые фотосенсибилизаторы бактериохлоринового ряда для фотодинамической терапии рака // *Биоорганическая химия*. – 2003. – Т. 29, № 2. – С. 214-221.
11. Якубовская Р.И., Соловьева Л.И., Койфман О.И., и др. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии // *Патент России № 2548726*. – 2015. – Бюл. № 11.
12. Dudkin S.V., Makarova E.A., Slivka L.K., Lukyanets E.A. Synthesis and properties of tetra- and octacationic meso-tetrakis(3-pyridyl)bacteriochlorin derivatives // *J. Porphyrins Phthalocyanines*. – 2014. – Vol. 18, No. 1-2. – P. 107-114.
13. Маклыгина Ю.С., Бородкин А.В., Лощенов В.Б. Лазерный микроскоп-спектроанализатор для исследования внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов ближнего инфракрасного диапазона спектра in vitro // *Biomedical Photonics*. – 2015. – № 3. – С. 3-9.

## REFERENCES

1. Breymayer J., Rück A., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Steiner R.W. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticle, *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2014, Vol. 11, Is. 3, pp. 380-390.
2. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Konov V.I., Mamedov A.A., Kuzminand S.G., Lukyanets E.A. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation, *J. Biophoton*, 2010, Vol. 3, No. 5-6, pp. 336-346.
3. Oertel M., Schastak S.I., Tannapfel A., Hermann R., Sack U., Mossner J., Berr F. Novel bacteriochlorin for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in a mouse tumour model, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2003, Vol. 71, pp. 1-10.
4. Mazor O., Brandis A., Plaks V., Neumark E., Rosenbach-Belkin V., Salomon Y., Scherz A. WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution, and vascular targeted photodynamic activity against melanoma tumors, *Photochem. Photobiol*, 2005, Vol. 81, pp. 342-351.
5. Rovers J.P., de Jode M.L., Rezzoug H., Grahn M.F. In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5, 10, 15, 20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin, *Photochem. Photobiol*, 2000, Vol. 72, pp. 358-364.
6. Mironov A.F., Grin M.A., Karmakova T.A., Plyutinskaya A.D., Yakubovskaya R.I., Feofanov A.V., Vini P. Novel photosensitizers for PDT of cancer based on natural bacteriochlorophyll a, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2003, Vol. 2, No. 1, pp. 33-34. (in Russian).
7. Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Grin M.A., Mironov A.F. Aminoamides derivative of bacteriochlorophyll a and their photo-induced activity in vitro and in vivo, *Biomedical photonics*, 2013, No. 3, pp. 29-30. (in Russian).
8. Grin M.A., Pantyushenko I.V., Plotnikova E.A., Plyutinskaya A.D., Malygina A.I., Kashirtseva I.V., Mikhailovskaya A.A., Yakubovskaya R.I., Kaplan M.A., Mironov A.F. Novel photosensitizers based on bacteriopurpurinimide and their photo-induced antitumor activity, *Biomedical photonics*, 2013, No. 3, pp. 33-34. (in Russian).
9. Reshetnikov R.I., Grin M.A., Kharitonova O.V., Kozlov A.C., Krasnovskii A.A., Feofanov A.V., Ermakova D.E., Mironov A.F. Bacteriochlorin-containing triad for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy, *Biomedical photonics*, 2013, No. 3, p. 34. (in Russian).
10. Mironov A.F., Grin M.A., Tsiprovsii A.G., Segenevich A.V., Dzardanov D.V., Golovin K.V., Tsygankov A.A., Shim Ya.K. Novel bacteriochlorin photosensitizers for photodynamic therapy of cancer, *Bioorganicheskaya khimiya*, 2003, Vol. 29, No 2, pp. 214-221. (in Russian).
11. Yakubovskaya R.I., Solov'eva L.I., Koifman O.I., Ponomarev G.V., Lastovoi A.P., Luk'yanets E.A., Morozova N.B., Plotnikova E.A. Photosensitizer for photodynamic therapy, Patent RF No. 2548726, 2015.
12. Dudkin S.V., Makarova E.A., Slivka L.K., Lukyanets E.A. Synthesis and properties of tetra- and octacationic meso-tetrakis(3-pyridyl)bacteriochlorin derivatives, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2014, Vol. 18, No. 1-2, pp. 107-114.
13. Maklygina Yu.S., Borodkin A.V., Loshchenov V.B. Laser microscope-spectrum analyzer for studying intracellular accumulation of near infrared emitting photosensitizers in vitro, *Biomedical Photonics*, 2015, No. 3, pp. 3-9. (in Russian).