

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ХЛОРИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ДВУХМЕРНЫХ И ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

Д.С. Фаррахова^{1,2}, И.В. Яковец^{3,4,5}, В.Б. Лощенов^{1,2}, L.N. Bolotine^{4,5}, В.П. Зорин^{3,6}

¹Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

³Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

⁴Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France

⁵Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁶Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, МГЭИ БГУ, Минск, Республика Беларусь

Резюме

Цель данного исследования заключалась в оценке распределения хлориновых фотосенсибилизаторов – хлорина e_6 (Ce6) и его диметилового эфира (DME) – в клетках HT29 аденокарциномы человека в моделях монослоя клеток и мультиклеточных сфероидов. Согласно полученным данным, DME накапливается в 2,3 раза более эффективно в клетках монослоя по сравнению с Ce6. Высказано предположение, что химическая модификация молекул Ce6 приводит к изменению внутриклеточной локализации, а также к увеличению фотосенсибилизирующей активности. Так, проведение фотодинамической терапии на клетках монослоя с использованием DME показало увеличение способности к фотоповреждению более чем в 2 раза по сравнению с его немодифицированным аналогом.

Процессы распределения DME и Ce6 в опухолевой ткани были изучены на модели мультиклеточных опухолевых сфероидов. Общее количество DME в опухолевых сфероидов превышало накопление Ce6 в 1,3 раза. Согласно данным флуоресцентной микроскопии, характер распределения Ce6 и DME в сфероидов не отличается. Использование двух- и трёхмерных моделей для анализа процессов связывания фотосенсибилизаторов может позволить прогнозировать особенности процессов распределения фотосенсибилизаторов при проведении фотодинамической терапии *in vivo*.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, хлорин e_6 , диметиловый эфир хлорина e_6 , фотодинамическая терапия, мультиклеточные опухолевые сфероиды.

Для цитирования: Фаррахова Д.С., Яковец И.В., Лощенов В.Б., Bolotine L.N., Зорин В.П., Исследование распределения хлориновых фотосенсибилизаторов в двухмерных и трехмерных клеточных культурах // Biomedical Photonics – 2017. – Т. 6, № 2 – С. 4-11.

Контакты: Зорин В.П., e-mail: vpzorin@mail.ru

INVESTIGATION OF CHLORIN PHOTOSENSITIZERS DISTRIBUTION IN MONOLAYER AND SPHEROID CELL CULTURES

Farrakhova D.S.^{1,2}, Yakavets I.V.^{3,4,5}, Loschenov V.B.^{1,2}, Bolotine L.N.^{4,5}, Zorin V.P.^{3,6}

¹National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

²General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Belarusian State University, Minsk, Belarus

⁴Centre de Recherche en Automatique de Nancy, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France

⁵Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁶Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Belarus

Abstract

The aim of this study was to analyze the distribution of chlorin type photosensitizers (PS): chlorin e_6 (Ce6) and dimethyl ester of chlorin e_6 (DME), in human adenocarcinoma HT29 monolayer and multicellular spheroid cell cultures. There is an assumption, that the chemical modification of Ce6 molecules causes a change of intracellular location and the enhanced photosensitizing activity. Indeed, photodynamic therapy on monolayer cell culture with DME showed two times higher photokilling ability comparing with that of non-modified analogue.

Ce6 and DME biodistribution processes in tumor tissue were studied on multicellular tumor spheroids model. Total amount of DME in multicellular tumor spheroids exceeded 1,3 times accumulation of Ce6. According to fluorescence microscopy studies, Ce6 and DME distribution patterns in the spheroids bulk were similar. Application of 2D and 3D tumor models for the analysis of photosensitizer distribution may allow predicting the photosensitizer biodistribution features for photodynamic therapy *in vivo*.

Key words: photosensitizers, chlorin e_6 , chlorin e_6 dimethyl ester, photodynamic therapy, multicellular tumor spheroids.

For citations: Farrakhova D.S., Yakavets I.V., Loschenov V.B., Bolotine L.N., Zorin V.P. Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell cultures, *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 2, pp. 4-11 (in Russian)

Contacts: Zorin V.P., e-mail: vpzorin@mail.ru

Введение

Процессы распределения фотосенсибилизаторов (ФС) в организме являются одним из ключевых факторов, определяющих результативность фотодинамической терапии (ФДТ). Это связано с тем, что синглетный кислород, основной интермедиатор фотодинамических процессов, обладает крайне малым временем жизни в биологических системах [1]. Теоретическая оценка показывает, что средняя длина диффузионного пробега синглетного кислорода в биологических системах составляет 10-100 нм [2]. Поэтому фотодинамическое воздействие приводит к повреждению молекулярных и клеточных структур, расположенных в непосредственной близости от сайтов связывания молекул ФС. В этой связи значительный интерес представляет установление взаимосвязи между особенностями химической структуры молекул ФС и факторами, контролирующими процессы его распространения в различных биологических системах (клетки, ткани, организм).

В данной работе приведены результаты сравнительного исследования процессов связывания, локализации и фотосенсибилизирующей активности хлорина e_6 (Себ) и его диметилового эфира (DME) в клетках HT29 аденокарциномы человека. Себ является известным фотосенсибилизатором второго поколения и является действующим веществом ряда коммерческих лекарственных препаратов-фотосенсибилизаторов, в том числе фотолон (РУП «Белмед-препараты», Республика Беларусь, регистрационное удостоверение П N015948/01 от 30.11.2012) и радахлорина (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС-001868 от 16.12.2011), которые применяются в настоящее время в клинической практике [3,4]. Ранее было показано, что DME также является перспективным ФС для ФДТ [5-7]. Показано, что этерифицирование боковых карбоксильных групп в молекуле Себ сопровождается значительным увеличением накопления ФС в ряде типов опухолевых клеток, в клетках эндотелия кровеносных сосудов и ряде типов клеток крови [8,9], а также увеличением эффективности их фотосенсибилизированного повреждения. Предполагается, что повышенная фотосенсибилизирующая активность DME обусловлена кинетическими особенностями процессов его распределения в биологических системах.

В данной работе были изучены процессы распределения ФС в двухмерной (монослой) и трёхмерной (мультиклеточные опухолевые сфероиды) моделях клеток HT29 аденокарциномы человека. Монослой клеток использовали для исследования процессов взаимодействия препаратов с единичными клетками. Мультиклеточные опухолевые сфероиды представляют собой трёхмерную модель опухолевой ткани сферической формы, которая отражает все основ-

ные морфологические и функциональные особенности неваккуляризованной опухолевой ткани *in vivo* и позволяет моделировать процессы распределения противоопухолевых препаратов в опухолевой ткани [10,11].

Материал и методы

Исследуемые фотосенсибилизаторы

В работе использовали Себ производства Frontier Scientific (США). DME предоставлен НИЛ биофизики и биотехнологии Белорусского государственного университета (Минск, Беларусь). Структурные формулы ФС приведены на рис. 1. Концентрацию Себ и DME определяли фотометрически в длинноволновом максимуме поглощения с использованием коэффициента молярной экстинкции $50\,000\text{ см}^{-1}(\text{моль/л})^{-1}$ [12]. Для экспериментов *in vitro* использовали раствор ФС с концентрацией 5 мкмоль/л, предварительно проинкубированный с 2% сыворотки в культуральной среде RPMI-1640 в течение 1 ч.

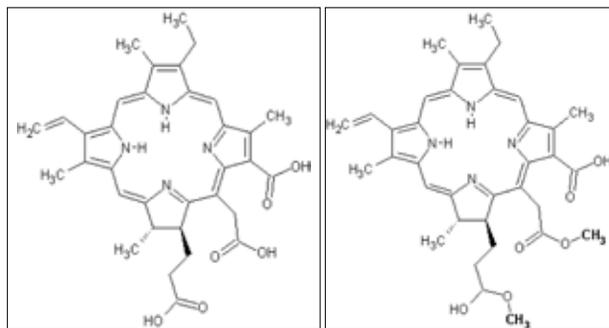


Рис. 1. Химические формулы:
а – хлорина e_6 ;
б – диметилового эфира хлорина e_6 .
Fig. 1. The chemical formulas of:
a – chlorin e_6 ;
б – dimethyl ester of chlorin e_6 .

Биологические модели

Для проведения эксперимента в качестве биологических моделей были использованы монослой и опухолевые сфероиды модели клеточных структур, образованные клетками HT29 аденокарциномы человека. Культивирование монослоя клеток проводили в среде RPMI-1640 без фенолового красного (Sigma, США) с добавлением 9% инактивированной телячьей сыворотки (Sigma, США) и 1 ммоль/л глутамина (Invitrogen, Франция). Монослой инкубировали при температуре 37 °С в 5% атмосфере CO_2 . Жизнеспособность клеток, использованных в экспериментах, была не менее 95%.

В работе использовали мультиклеточные сфероиды размером 370-520 мкм. Опухолевые сфероиды инкубировали в колбах со спинерами 75 об/с (Integra Biosciences, США), содержащих 150 мл культуральной среды, помещенных на магнитную подставку (Integra

Biosciences, США) при температуре 37°C в газовой среде, содержащей 5% CO₂. Для отсева сфероидов нужного размера использовали фильтры 370 нм и 520 нм.

Исследование накопления ФС в клеточных культурах

Для оценки накопления ФС клетки инкубировали с раствором ФС в течение 1, 3, 6 и 15 ч для монослоя и 6 ч для мультиклеточных опухолевых сфероидов. После инкубации клетки/сфероиды дважды отмывали от несвязанного ФС с использованием буфера и трипсинизировали для получения суспензии клеток. После трипсинизации клеток монослоя/сфероидов накопление ФС оценивали с использованием проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, США), оснащенного аргоновым лазером с длиной волны возбуждения 488 нм (20 мВ). Регистрацию флуоресцентного сигнала производили в канале FL4 (661±16 нм).

Эпифлуоресцентная микроскопия

Распределение ФС в клетках/сфероидах было изучено при помощи эпифлуоресцентной микроскопии на микроскопе AX-70 Provis (Olympus, Япония), оборудованном 100 Вт ртутной лампой. Клетки/сфероиды инкубировали с раствором ФС в течение 6 ч. Изображения были получены при возбуждении ФС с использованием возбуждающего фильтра с полосой пропускания 400–440 нм и были зарегистрированы в видимом диапазоне длин волн более 590 нм.

Фотодинамическое воздействие на монослой клеток

Оценка фотоцитотоксичности ФС на модели монослоя клеток была проведена с использованием диодного лазера (Biolitec AG, Germany), излучение которого соответствует длине волны 652±4 нм. В ходе эксперимента были использованы различные дозы облучения равные 0,2; 0,5 и 1,0 Дж/см². Мощность лазерного излучения на выходе из волокна составляла 0,45 Вт. В контроле облучение не проводили. Инкубация клеток с раствором ФС происходила в течение 15 ч. Трипсинизацию производили спустя 1 ч после облучения для оценки доли погибших клеток методом проточной цитометрии.

Для оценки токсических свойств ФС использовали тест на целостность цитоплазматической мембраны, а также проточную цитофлуориметрию. Клетки с нарушенной плазматической мембраной – некротические клетки и клетки на поздних стадиях апоптоза – способны накапливать флуоресцентный краситель пропиридиум йодид (PI) на 2-3 порядка больше относительно интактных клеток.

Статистический анализ

Все экспериментальные данные представлены как $M \pm m$ (M – среднее значение, m – относительная погрешность). Статистический анализ проводили с использованием системы Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Исследование взаимодействия ФС с клетками в монослое

Анализ процессов накопления ФС в монослойе клеток HT29 проводили с использованием техники проточной цитофлуориметрии. Монослой клеток инкубировали в присутствии 5 мкмоль/л ФС, затем трипсинизировали. Регистрировали гистограммы распределения единичных клеток по уровню интенсивности флуоресценции в полосе испускания ФС (661±16 нм).

При увеличении времени инкубации клеток с ФС наблюдали смещение гистограммы распределения в сторону большей интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о связывании и локализации исследуемых ФС в клетках. Ранее было показано, что спектрально-флуоресцентные характеристики Себ и DME практически не различаются [7, 12], поэтому интенсивность флуоресценции единичных клеток может быть использована для сравнения процессов накопления данных ФС. На рис. 2 представлена кинетика изменения средней интенсивности флуоресценции клеток, инкубированных различное время в присутствии 5 мкмоль/л ФС.

Согласно полученным данным, кинетика накопления DME и Себ в клетках существенно отличаются. Для Себ наблюдается медленное увеличение интенсивности флуоресценции клеток на протяжении 5–6 ч инкубации. Для DME равновесный уровень окраски достигается значительно быстрее, при этом максимальное значение средней интенсивности флуоресценции превышает данный параметр для Себ в 2,3 раза. Аналогичные результаты исследования кинетики накопления Себ и DME были получены ранее для лейкоэмических клеток Raji [5] и клеток рака мочевого пузыря [12].

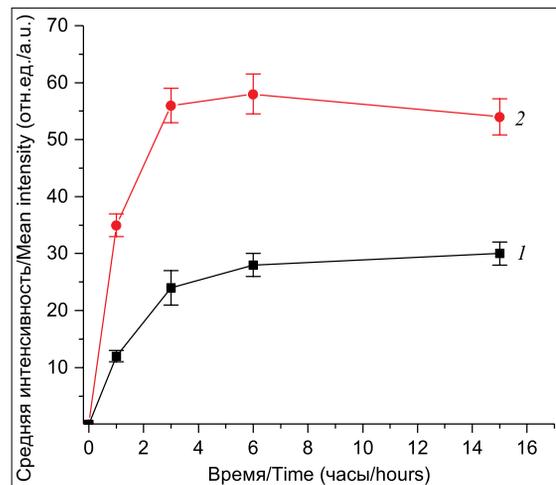


Рис. 2. Кинетика изменения средней интенсивности флуоресценции клеток HT29, инкубированных с:

1 – хлорином e₆ (5 мкмоль/л);

2 – диметилэфиром хлоринового эфира e₆ (5 мкмоль/л)

Fig. 2. The mean fluorescence intensity kinetics of HT29 monolayer cells treated by:

1 – chlorin e₆ (5 μM);

2 – dimethyl ester of chlorin e₆ (5 μM)

Особенности окрашивания монослоя клеток HT29 исследуемыми ФС были также исследованы методом флуоресцентной микроскопии. На рис. 3 представлены фотографии монослоя клеток HT29 в свете флуоресценции ФС. Как видно из изображений, клетки накапливают значительное большее количество DME по сравнению с Себ. Компьютерный анализ полученных изображений показал, что средняя интенсивность флуоресценции DME в клетках в 2,5 раза выше в сравнении с Себ, что полностью согласуется с данными проточной цитофлуориметрии.

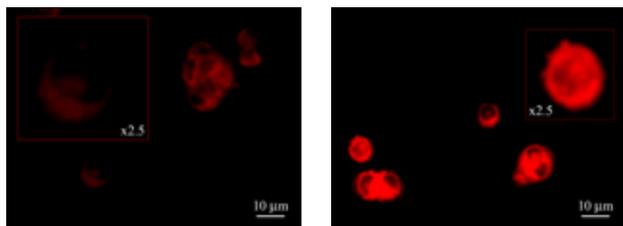


Рис. 3. Флуоресцентные изображения клеток HT29 через 6 ч после начала инкубации с:
а – хлорином e_6 (5 мкмоль/л);
б – диметилловым эфиром хлорина e_6 (5 мкмоль/л)
Fig. 3. Fluorescence images of HT29 monolayer cells 6 hours post treated by:
а – chlorin e_6 (5 μ M);
б – dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)

Флуоресцентная микроскопия позволяет оценить характер распределения ФС по телу клеток. Согласно полученным результатам (рис. 3), Себ и DME в основном распределены в плазматической мембране и цитоплазме клеток и практически не накапливаются в области локализации клеточного ядра. Детальный анализ процессов локализации Себ и DME, проведенный в работах [13-15], выявил отличия в характере распределения исследуемых ФС между цитоплазматическими структурами. Низкая скорость трансмембранного переноса полярного Себ обуславливает большой вклад в общую флуоресценцию клеток молекул ФС, связанных с плазматической мембраной [8,13,16]. В то же время, высокая скорость пересечения мембраны в случае DME способствует быстрому окрашиванию всех цитоплазматических структур клетки. Использование техники колокализационного анализа указывает на возможные отличия в сайтах преимущественного связывания ФС внутри клетки [14,15]. Если Себ накапливается преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме клеток плоскоклеточной карциномы FaDu [14], то DME локализуется преимущественно в митохондриях клеток Raji [15].

Согласно литературным данным, схожие закономерности были установлены в случае исследования процессов накопления DME и Себ на клетках Raji [5,15]. Показано, что изменение химической структуры молекулы ФС оказывает значительное влияние на процессы взаимодействия ФС с клетками, при этом не

влияя на фотофизические свойства молекулы хлорина [12]. Этерифицирование молекулы Себ приводит к увеличению уровня накопления ФС в клетках. Так, умеренно неполярный DME, имеющий относительно высокую диффузионную подвижность, с максимальной скоростью проникает через плазматическую мембрану, накапливается в клетках в концентрации, в несколько раз превышающей концентрацию полярного Себ, для которого характерны более низкие значения константы скорости трансмембранного перемещения [17].

Считается, что ФС может проникать в клетки как путем пассивной диффузии через плазматическую мембрану, так и за счет эндоцитоза [18]. При этом, ключевым фактором, обуславливающим транспорт ФС в клетку является взаимодействие с различными транспортными белками сыворотки крови [8,19]. Связывание с различными белками сыворотки в основном определяется зарядом и гидрофобностью молекулы ФС. Так, ранее было показано, что повышение гидрофобности молекул DME приводит к увеличению сродства данного ФС к липопротеинам, в то время как полярный Себ главным образом связывается с сывороточным альбумином [8]. При этом связывание ФС с липопротеинами облегчает транспорт препарата в клетки путем эндоцитоза [19], когда как транспортировка в составе сывороточного альбумина способствует накоплению ФС в строме опухоли [20].

Различия в механизмах транспорта в клетку в свою очередь могут оказывать влияние на локализацию ФС в клетках, как это было показано в работах [13,16]. В этой связи, преимущественное накопление DME в митохондриях может увеличивать эффективность фотодинамического воздействия путем запуска процессов апоптоза уже при малых дозах светового излучения [21].

Себ и DME обладают хорошими фотосенсибилизирующими свойствами, что подтверждается высокой фотоповреждающей активностью в отношении клеточных и тканевых структур [22,23]. Исследуемые ФС характеризуются низкой темновой токсичностью. Согласно работам [5,15,22,24], присутствие ФС во внеклеточной среде в концентрациях вплоть до 10 мкмоль/л не оказывает цитотоксического эффекта. Полученные в нашей работе результаты согласуются с опубликованными ранее данными. Инкубирование монослоя клеток HT29 в присутствии 5 мкмоль/л ФС в течение 15 ч сопровождается лишь незначительным увеличением числа поврежденных клеток (2-4%) по сравнению с образцами, инкубированными в среде, не содержащей ФС.

Результаты исследования способности ФС индуцировать фотоповреждение клеток HT29 представлены в таблице. Согласно полученным данным, фототоксичность Себ и DME значительно различается. Облучение монослоя клеток, окрашенных ФС, в световой дозе 0,5 Дж/см² и более сопровождается гибелью практически всех клеток. При менее интенсивном облучении эф-

Таблица

Темновая и фотоиндуцированная токсичность хлорина e₆ и его диметилового эфира в клетках HT29

Table

Dark and photoinduced cellular toxicity of chlorin e₆ and dimethyl ester of chlorin e₆ in HT29 monolayer

ФС PS	Концентрация ФС PS concentration	Доля погибших клеток: Death cells fraction:			
		в контроле in control	при облучении: 10 мВт/см ² , 0,2 Дж/см ² , for irradiation: 10 mW/cm ² , 0.2 J/cm ²	при облучении: 10 мВт/см ² , 0,5 Дж/см ² , for irradiation: 10 mW/cm ² , 0.5 J/cm ²	при облучении: 10 мВт/см ² , 1,0 Дж/см ² , for irradiation: 10 mW/cm ² , 1.0 J/cm ²
Себ	5 мкмоль/л 5 μm	2±1%	11±2%	83±6%	92±4%
DME	5 мкмоль/л 5 μM	4±1%	40±5%	91±8%	97±2%

ФС – фотосенсибилизатор; Себ – хлорин e₆; DME – диметилловый эфир хлорина e₆
 PS – photosensitizer; Себ – chlorin e₆; DME – dimethyl ester of chlorin e₆

Фективность фотодеструкции клеток значительно выше в случае DME. Полученные результаты подтверждают хорошо известную зависимость фоточувствительности клеток от количества ФС, накопленного ими [15,16].

Исследование распределения ФС в мультиклеточных сфероидов

Установление механизмов накопления препарата в клетках может быть недостаточно для описания особенностей процессов распределения ФС в твердых тканях *in vivo*. Сложная трехмерная структура организации и морфологические особенности опухолевой ткани обуславливают различия в доступности препарата к различным слоям клеток ткани. Для изучения процессов распределения ФС в опухолевой ткани в работе была использована модель мультиклеточных опухолевых сфероидов. Данная модель воспроизводит неваккуляризованную опухолевую ткань с общими морфологическими особенностями, такими как наличие пролиферирующих слоев клеток, находящихся на поверхности сфероидов, а также клеток с ограниченным доступом к кислороду и питательным веществам, находящихся в глубине опухолевой ткани (рис. 4) [10].

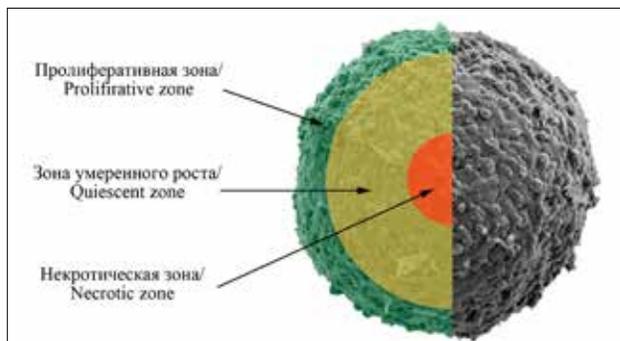


Рис. 4. Схематическое изображение мультиклеточного опухолевого сфероида
Fig. 4. Scheme of multicellular tumor spheroid

Процессы накопления и локализации Себ и DME в сфероидов HT29 были исследованы с использованием эпифлуоресцентной микроскопии. На рис. 5 представлены изображения флуоресцирующих сфероидов, инкубированных в присутствии хлоринов в течение 24 ч.

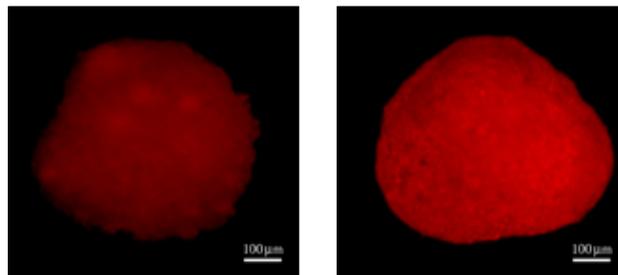


Рис. 5. Флуоресцентные изображения окрашенных сфероидов через 24 ч после начала инкубации с:
 а – хлорином e₆ (5 мкмоль/л);
 б – диметилловым эфиром хлорина e₆ (5 мкмоль/л)
Fig. 5. Fluorescence images of spheroid in 24 hours post treated by:
 а – chlorin e₆ (5 μM)
 б – dimethyl ester of chlorin e₆ (5 μM)

Количественная оценка свечения (по группам из 7 сфероидов) свидетельствует, что уровень средней интенсивности флуоресценции сфероидов, окрашенных DME, более чем в 2 раза выше в сравнении с Себ. Как видно из полученных флуоресцентных изображений, ФС распределяются равномерно по сфероидов.

Неравномерность окрашивания отдельных клеточных слоев сфероида обычно проявляется в увеличении степени гетерогенности распределения отдельных клеток по уровню накопления ФС, что может быть легко зафиксировано с использованием проточной цитофлуориметрии [25]. Согласно данным, представленным на рис. 6, гистограммы распределения окрашенных в течение 24 ч хлоринами клеток в составе сфероида

близки по своим параметрам к гистограммам клеток, окрашенных в монослой. При этом, значение средней интенсивности флуоресценции клеток сфероидов, окрашенные DME, в 1,3 раза выше по сравнению с Себ, что согласуется с результатами эпифлуоресцентной микроскопии. Следует отметить, что процедура разделения сфероидов на отдельные клетки путем трипсинизации осуществляется быстро (около 5 мин), поэтому она не может оказывать значительного влияния на уровень накопления ФС отдельными клетками. Исходя из полученных данных, можно заключить, что относительный уровень внутриклеточного накопления ФС при длительных временах окраски не зависит от расположения клеток в составе сфероидов. Сходные результаты анализа распределения Себ были получены на модели сфероидов A375 [26]. В то же время, согласно работам [27,28], для некоторых ФС и их лекарственных форм может наблюдаться значительная гетерогенность локализации в мультиклеточных опухолевых сфероидов. Так, уровень накопления темпорфина в клетках, локализованных на поверхности сфероидов, повышен в 50 раз в сравнении с клетками, локализованными во внутренних слоях сфероидов. В отличие от производных Себ, молекулы тем-

порфина характеризуются крайне низкой скоростью диссоциации из комплексов с липопротеинами, что значительно снижает вероятность окрашивания клеток, расположенных в глубине сфероидов [28].

Эффективность накопления ФС (оцененная по уровню флуоресценции) в опухолевых клетках в зависимости от расположения клеток в сфероидов, очевидно, определяется кинетическими и равновесными параметрами, контролирующими распространение молекул ФС в тканевых структурах. Среди кинетических характеристик основное влияние на процессы распределения оказывают скорости перемещения молекул ФС между различными центрами связывания во внеклеточной среде, а также скорость трансмембранного перемещения молекулы ФС через плазматическую мембрану. В качестве равновесных параметров выступают относительное сродство молекул ФС к белкам сыворотки и клеточным мембранным структурам. Себ и DME характеризуются высокой скоростью диффузии между различными центрами связывания во внеклеточной среде и способны равномерно окрашивать мультиклеточный сфероид при длительных временах инкубирования. Более высокий уровень накопления DME в клетках может быть обусловлен повышенным сродством его молекул к клеточным структурам в сравнении с Себ.

Заключение

Исследования, проведенные в модельных клеточных системах, показали, что изменение физико-химических свойств ФС оказывает значительное влияние на процессы взаимодействия ФС с опухолевыми клетками и процессы распределения ФС в опухолевой ткани.

На модели монослоя клеток HT29 были изучены процессы взаимодействия хлорина и его диметилового эфира с индивидуальными клетками. Показано, что изменение химической структуры молекулы Себ оказывает значительное влияние на процессы взаимодействия ФС с клетками и относительную фотосенсибилизирующую активность Себ и DME. Согласно полученным данным, химическая модификация молекулы Себ, связанная с этерификацией боковых карбоксильных групп, сопровождается увеличением накопления и изменением характера локализации ФС в клетках. Данные изменения также обуславливают увеличение фотосенсибилизирующей активности DME в отношении клеток HT29 в сравнении с Себ.

С использованием трёхмерной модели, показано, что этерификация молекулы Себ не оказывает влияния на характер распределения ФС по телу сфероидов. В то же время, повышенное сродство DME к опухолевым клеткам обуславливают увеличение общего уровня накопления ФС в сфероидов.

Использование двух- и трёхмерных моделей для анализа процессов связывания ФС может позволить прогнозировать особенности процессов распределения ФС при проведении ФДТ *in vivo*.

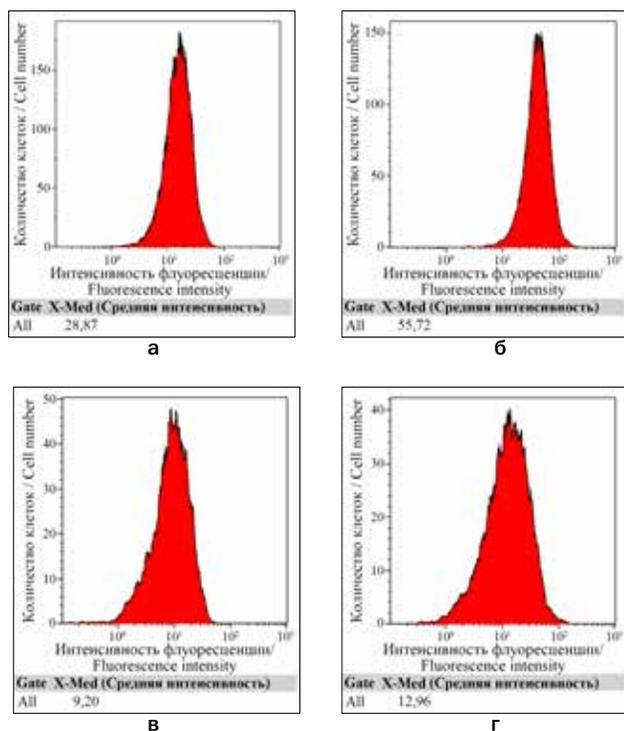


Рис. 6. Гистограммы накопления:

- а – в клетках монослоя хлорина e_6 (5 мкмоль/л);
- б – в клетках монослоя диметилового эфира хлорина e_6 (5 мкмоль/л);
- в – в клетках сфероидов хлорина e_6 (5 мкмоль/л);
- г – в клетках сфероидов диметилового эфира хлорина e_6 (5 мкмоль/л)

Fig. 6. Uptake histograms:

- а – in monolayer cells of chlorin e_6 (5 μ M)
- б – in monolayer cells dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)
- в – in spheroid cells of chlorin e_6 (5 μ M)
- г – in spheroid cells of dimethyl ester of chlorin e_6 (5 μ M)

ЛИТЕРАТУРА

1. Baker A., Kanofsky J.R. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – Vol. 55, No. 4. – P. 523-528.
2. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1990. – Vol. 6, No. 3. – P. 343-344.
3. Shliakhtsin S.V., Trukhachova T.V., Isakau H.A., Istomin Y.P. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon (Fotolon) in intact and tumor-bearing rats // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2009. – Vol. 6, No. 2. – P. 97-104.
4. Kochneva E.V., Filonenko E.V., Vakulovskaya E.G., et al. Photosensitizer Radachlorin: Skin cancer PDT phase II clinical trials // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2010. – Vol. 7, No. 4. – P. 258-267.
5. Zorina T.E., Yankovskii I.V., Kravchenko I.E., et al. Liposomal formulations of chlorin e6 ester derivatives and features of their cellular uptake // *BSU Her.* – 2013. – No. 3. – P. 30-35.
6. Zorin V.P., Michalovsky I.S., Zorina T.E., Khludeyev I.I. Distribution of chlorin-e6 derivatives in biological systems: investigation of pH-effect // *Proceeding SPIE.* – 1996. – Vol. 2625. – P. 146-155.
7. Соколов С.Н., Федорук С.Л., Трухачева Т.В., Хейдоров В.П. 13¹,15²-диметилловый эфир хлорина Е6 – новый фотосенсибилизатор. Доказательство структуры и чистоты // *Вестник Фармации.* – 2016. – № 4 (74). – С. 53-61.
8. Zorin V.P., Khludeyev I.I., Mikhalovsky I.S., et al. Kinetic characteristics of porphyrin distribution in the blood // *Proceeding SPIE.* – 2000. – Vol. 4059. – P. 139-146.
9. Savitsky V.P., Zorin V.P., Potapnev M.P. Selective phototoxicity of chlorin-e6 derivatives toward leukemic cells // *Exp. Oncol.* – 2002. – Vol. 24, No. 2. – P. 142-144.
10. Khanna S., Bhatt A.N., Dwarakanath B.S. Chapter 11 – Multicellular Spheroid: 3-D Tissue Culture Model for Cancer Research A2 – Verma, Ashish S. // *Animal Biotechnology / ed. Singh A.* – San Diego: Academic Press, 2014. – P. 195-210.
11. Patel N.R., Aryasomayajula B., Abouzeid A.H., Torchilin V.P. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems // *Ther. Deliv.* – 2015. – Vol. 6, No. 4. – P. 509-520.
12. Losev A.P., Nichiporovich I.N., Zhuravkin I.N., Zhavrid E.I. Energetics of chlorins as potent photosensitizers of PDT // *Proceeding SPIE.* – 1996. – Vol. 2924. – P. 40-48.
13. Mojzisoва H., Bonneau S., Vever-Bizet C., Brault D. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1768, No. 11. – P. 2748-2756.
14. Bastien E., Schneider R., Hackbarth S., et al. PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2015. – Vol. 14, No. 12. – P. 2203-2212.
15. Zorina T.E., Yankovsky I.V., Kravchenko I.E., et al. Evaluation of Phototoxicity and cytotoxicity for chlorin e6 ester derivatives and their liposomal forms // *Biophysics.* – 2015. – Vol. 60, No. 5. – P. 759-766.
16. Cunderlíková B., Gangeskar L., Moan J. Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1999. – Vol. 53, No. 1-3. – P. 81-90.
17. Zorin V.P. et al. Intra- and intermembrane distribution of chlorin e6 derivatives // *Proceedings SPIE.* – 1994. – Vol. 2325. – P. 87-101.
18. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2004. – Vol. 1, No. 4. – P. 279-293.
19. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers // *Int. J. Biochem.* – 1993. – Vol. 25, No. 10. – P. 1369-1375.
20. Akhlynina T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. Insulin-mediated intracellular targeting enhances the photodynamic

REFERENCES

1. Baker A., Kanofsky J.R. Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells, *Photochem. Photobiol.*, 1992, Vol. 55, No. 4, pp. 523-528.
2. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1990, Vol. 6, No. 3, pp. 343-344.
3. Shliakhtsin S.V., Trukhachova T.V., Isakau H.A., Istomin Y.P. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon (Fotolon) in intact and tumor-bearing rats, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2009, Vol. 6, No. 2, pp. 97-104.
4. Kochneva E.V., Filonenko E.V., Vakulovskaya E.G., Scherbakova E.G., Seliverstov O.V., Markichev N.A., Reshetnikov A.V. Photosensitizer Radachlorin: Skin cancer PDT phase II clinical trials, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2010, Vol. 7, No. 4, pp. 258-267.
5. Zorina T.E., Yankovskii I.V., Kravchenko I.E., Shman I.E., Zorin V.P. Liposomal formulations of chlorin e6 ester derivatives and features of their cellular uptake, *BSU Her.*, 2013, No. 3, pp. 30-35.
6. Zorin V.P., Michalovsky I.S., Zorina T.E., Khludeyev I.I. Distribution of chlorin-e6 derivatives in biological systems: investigation of pH-effect, *Proceeding SPIE*, 1996, Vol. 2625, pp. 146-155.
7. Sokolov S.N., Fedoruk S.L., Trukhacheva T.V., Kheidorov V.P. 13¹,15²-Dimethyl ester of chlorin e6 is a new photosensitizer. the proof of structure and purity, *Vestnik Farmatsii*, 2016, No. 4 (74), pp. 53-61. (in Russian).
8. Zorin V.P., Khludeyev I.I., Mikhalovsky I.S., Zorina T.E., Savitskiy V.P., Kochubyeva N.D., Kravchenko I.E. Kinetic characteristics of porphyrin distribution in the blood, *Proceeding SPIE*, 2000, Vol. 4059, pp. 139-146.
9. Savitsky V.P., Zorin V.P., Potapnev M.P. Selective phototoxicity of chlorin-e6 derivatives toward leukemic cells, *Exp. Oncol.*, 2002, Vol. 24, No. 2, pp. 142-144.
10. Khanna S., Bhatt A.N., Dwarakanath B.S. Chapter 11 – Multicellular Spheroid: 3-D Tissue Culture Model for Cancer Research A2 – Verma, Ashish S. In *Animal Biotechnology*, by ed. Singh A. San Diego, Academic Press Publ., 2014. pp. 195-210.
11. Patel N.R., Aryasomayajula B., Abouzeid A.H., Torchilin V.P. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems, *Ther. Deliv.*, 2015, Vol. 6, No. 4, pp. 509-520.
12. Losev A.P., Nichiporovich I.N., Zhuravkin I.N., Zhavrid E.I. Energetics of chlorins as potent photosensitizers of PDT, *Proceeding SPIE*, 1996, Vol. 2924, pp. 40-48.
13. Mojzisoва H., Bonneau S., Vever-Bizet C., Brault D. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2007, Vol. 1768, No. 11, pp. 2748-2756.
14. Bastien E., Schneider R., Hackbarth S., Dumas D., Jasniowski J., Röder B., Bezdetnaya L., Lassalle H.P. PAMAM G4.5-chlorin e6 dendrimeric nanoparticles for enhanced photodynamic effects, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, Vol. 14, No. 12, pp. 2203-2212.
15. Zorina T.E., Yankovsky I.V., Kravchenko I.E., Zorin V.P., Shman T.V., Belevtsev M.V. Evaluation of Phototoxicity and cytotoxicity for chlorin e6 ester derivatives and their liposomal forms, *Biophysics*, 2015, Vol. 60, No. 5, pp. 759-766.
16. Cunderlíková B., Gangeskar L., Moan J. Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1999, Vol. 53, No. 1-3, pp. 81-90.
17. Zorin V.P. et al. Intra- and intermembrane distribution of chlorin e6 derivatives, *Proceedings SPIE*, 1994, Vol. 2325, pp. 87-101.
18. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004, Vol. 1, No. 4, pp. 279-293.
19. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers, *Int. J. Biochem.*, 1993, Vol. 25, No. 10, pp. 1369-1375.

- activity of chlorin e6 // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55, No. 5. – P. 1014-1019.
21. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1, No. 1. – P. 1-21.
 22. Gurinovich G.P., Zorina T.E., Melnov S.B., et al. Photodynamic activity of chlorin e6 and chlorin e6 ethylenediamide *in vitro* and *in vivo* // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1992. – Vol. 13, No. 1. – P. 51-57.
 23. Sheleg S.V., Zhavrid E.A., Khodina T.V., et al. Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* – 2004. – Vol. 20, No. 1. – P. 21-26.
 24. Luo W., Liu R.S., Zhu J.G., et al. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 9, No. 2. – P. 551-556.
 25. West C.M., Moore J.V. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – Vol. 55, No. 3. – P. 425-430.
 26. Yuan A., Yang B., Wu J., et al. Dendritic nanoconjugates of photosensitizer for targeted photodynamic therapy // *Acta Biomater.* – 2015. – Vol. 21. – P. 63-73.
 27. Gaio E., Scheglmann D., Reddi E., Moret F. Uptake and phototoxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2016. – Vol. 161. – P. 244-252.
 28. Coutier S., Bezdetnaya L.N., Foster T.H., et al. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice // *Radiat. Res.* – 2002. – Vol. 158, No. 3. – P. 339-345.
 20. Akhlylina T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. Insulin-mediated intracellular targeting enhances the photodynamic activity of chlorin e6, *Cancer Res.*, 1995, Vol. 55, No. 5, pp. 1014-1019.
 21. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, Vol. 1, No. 1, pp. 1-21.
 22. Gurinovich G.P., Zorina T.E., Melnov S.B., Melnova N.I., Gurinovich I.F., Grubina L.A., Sarzhenskaya M.V., Cherenkevich S.N. Photodynamic activity of chlorin e6 and chlorin e6 ethylenediamide *in vitro* and *in vivo*, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1992, Vol. 13, No. 1, pp. 51-57.
 23. Sheleg S.V., Zhavrid E.A., Khodina T.V., Kochubeev G.A., Istomin Y.P., Chalov V.N., Zhuravkin I.N. Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 2004, Vol. 20, No. 1, pp. 21-26.
 24. Luo W., Liu R.S., Zhu J.G., Li Y.C., Liu H.C. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca8113 cell line, *Oncol. Lett.*, 2015, Vol. 9, No. 2, pp. 551-556.
 25. West C.M., Moore J.V. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study, *Photochem. Photobiol.*, 1992, Vol. 55, No. 3, pp. 425-430.
 26. Yuan A., Yang B., Wu J., Hu Y., Ming X. Dendritic nanoconjugates of photosensitizer for targeted photodynamic therapy, *Acta Biomater.*, 2015, Vol. 21, pp. 63-73.
 27. Gaio E., Scheglmann D., Reddi E., Moret F. Uptake and phototoxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2016, Vol. 161, pp. 244-252.
 28. Coutier S., Bezdetnaya L.N., Foster T.H., Parache R.M., Guillemin F. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice, *Radiat. Res.*, 2002, Vol. 158, No. 3, pp. 339-345.