



УДК 547.979.733.057:543.42

ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 13,15-*N*-(КАРБОКСИМЕТИЛ)- И 13,15-*N*-(2-КАРБОКСИЭТИЛ)ЦИКЛОИМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА р6

© 2004 г. А. В. Феофанов^{##}, А. И. Назарова^{*}, Т. А. Кармакова^{**}, А. Д. Плютинская^{**},
А. И. Гришин^{*}, Р. И. Якубовская^{**}, В. С. Лебедева^{***}, Р. Д. Рузиев^{***},
А. Ф. Миронов^{***}, Ж.-К. Моризо^{****}, П. Вини^{****}

^{*}Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**}Московский онкологический научно-исследовательский институт им. П.А. Герцена, Москва;

^{***}Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва;

^{****}Центр молекулярной биофизики Национального центра научных исследований, Орлеан, Франция

Поступила в редакцию 18.09.2003 г. Принята к печати 05.12.2003 г.

Показано, что липофильные производные хлорина р6 – метиловые эфиры 13,15-*N*-(карбоксиметил)циклоимида хлорина р6 (С1С1) и 13,15-*N*-(2-карбоксиэтил)циклоимида хлорина р6 (С1С2), поглощающие свет в области 710 нм, являются эффективными ИК-фотосенсибилизаторами. Фототоксичность С1С1 и С1С2 в отношении культуры клеток аденокарциномы легкого человека А549 практически одинакова и превышает активность хлорина р6 и используемого в клинике Фотогема в 40 и 100 раз. С1С1 и С1С2 не обладают цитотоксичностью в отсутствие облучения. По данным метода конфокальной микроспектроскопии и реконструкции спектральных изображений, высокая фототоксичность этих соединений определяется их способностью легко проникать в клетки и связываться в мономерной фотоактивной форме с клеточными мембранами и липидсодержащими структурами. При облучении светом мембраносвязанные С1С1 и С1С2 характеризуются высокими квантовыми выходами генерации синглетного кислорода 0.6 и 0.65 соответственно, но не образуют гидроксил-радикалов. При содержании в среде, равном 1.5 мкМ, средние цитоплазматические концентрации С1С1 и С1С2 достигают 21 и 16.5 мкМ соответственно. Время полунакопления С1С1 и С1С2 в клетках А549 составляет 30 ± 6 и 24 ± 12 мин, а время полувыведения – 17 ± 4 и 50 ± 10 мин. Для С1С2 характерно диффузное распределение с преимущественным накоплением в мембранах аппарата Гольджи и митохондрий. Для С1С1, помимо этого, обнаружено значительное концентрирование в липидных каплях, клеточных органеллах, ответственных за хранение и метаболизм нейтральных липидов и стероидных эфиров. Полученные результаты показывают, что, изменяя структуру имидного заместителя, можно влиять на внутриклеточную локализацию и скорость выведения производных циклоимида хлорина р6 из клеток при сохранении их высокой фотодинамической активности.

Ключевые слова: конфокальная микроспектроскопия, спектральные изображения, циклоимидные производные хлорина р6, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор.

ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – новый, быстро развивающийся метод лечения злокачественных опухолей [1, 2]. Заметные успехи в лечении онкологических заболеваний, достигнутые в клинике с использованием фотосенсибилизаторов (ФС) первого поколения [1–6], стимулирова-

ли интенсивную разработку более эффективных ФС, поглощающих свет в диапазоне 700–800 нм. Проницаемость тканей для света возрастает с увеличением длины волны излучения, что обеспечивает более глубокое поражение опухоли. В качестве одного из способов создания ФС, поглощающих в диапазоне 690–750 нм, была разработана высокоэффективная синтетическая про-

Сокращения: АО – акридин оранжевый; BODIPY-церамид – *N*-((4-(4,4-дифлуоро-5-(2-тионил)-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-3-ил)фенокси)ацетил)сфингозин; CrEL – кремнефор EL, производное касторового масла и оксида этилена; С1С1 – метиловый эфир 13,15-*N*-(карбоксиметил)циклоимида хлорина р6; С1С2 – метиловый эфир 13,15-*N*-(2-карбоксиэтил)циклоимида хлорина р6; С1С3 – 13,15-*N*-(3-гидроксипропил)циклоимид хлорина р6; метод КОМИРСИ – метод конфокальной микроспектроскопии и реконструкции спектральных изображений; NDMA – 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин; НК – нильский красный; Rh6G – родамин 6Ж; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор; ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 336-64-55; факс: (095) 336-17-66; эл. почта: alexei@nmr.ru).

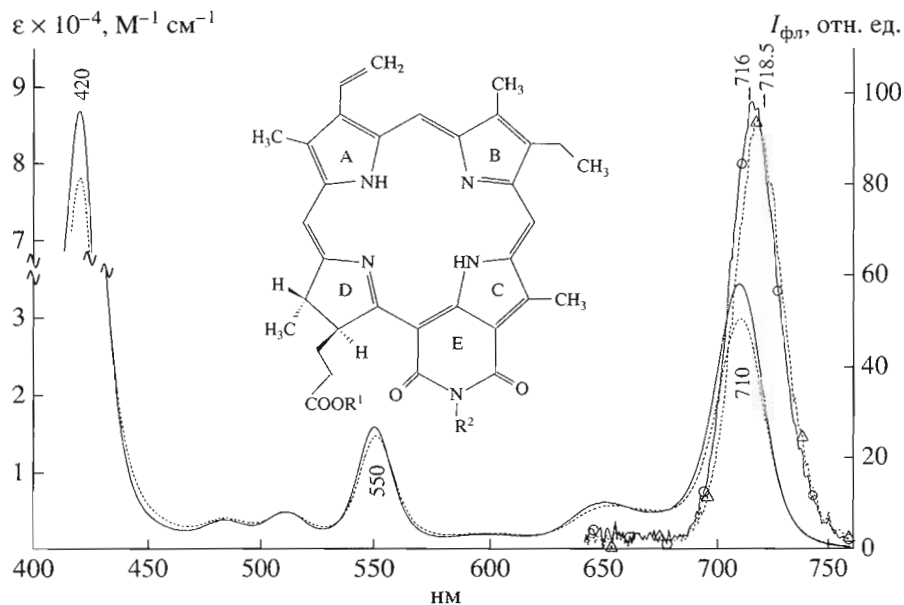


Рис. 1. Спектры поглощения ClC1 (сплошная линия), ClC2 (пунктирная линия) и флуоресценции ClC1 (круги) и ClC2 (треугольники) в растворе 1% CrEL (50 мМ Трис-НСl, рН 7.4). Вставка: структурные формулы ClC1 ($R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{CH}_2\text{COOH}$), ClC2 ($R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = (\text{CH}_2)_2\text{COOH}$) и ClC3 ($R^1 = \text{H}$, $R^2 = (\text{CH}_2)_3\text{OH}$).

цедура введения дополнительного имидного цикла в структуру хлорина рб, хорошего по своим физико-химическим свойствам ФС, с поглощением в области 665 нм [7, 8]. Исследование одного из циклоимидных производных хлорина рб (ClC-производных), 13,15-*N*-(3-гидроксипропил)циклоимида хлорина рб (ClC3, рис. 1), показало [9], что данная модификация структуры хромофора сохраняет способность молекулы к свето-индуцированной генерации синглетного кислорода и улучшает ее внутриклеточное проникновение, обеспечивая в итоге существенно более высокую фотоиндуцированную цитотоксичность, чем исходный хлорин рб и используемый в клинике Фотогем, отечественный ФС первого поколения, созданный на основе смеси производных гематопорфирина [1]. Это послужило основанием для синтеза ClC-производных с варьируемой структурой заместителей, изучения взаимосвязи между структурой молекулы и ее фотобиологическими свойствами и поиска соединений, наиболее перспективных для дальнейших исследований на животных.

В данной работе представлены результаты изучения новых циклоимидных производных хлорина рб – метиловых эфиров 13,15-*N*-(карбоксиметил)циклоимида хлорина рб (ClC1) и 13,15-*N*-(2-карбоксиил)циклоимида хлорина рб (ClC2, рис. 1). Помимо сравнительной оценки фотоиндуцированной цитотоксичности этих соединений в отношении культуры клеток исследованы факторы, определяющие активность ФС, такие, как эффективность генерации активных форм кислорода,

способность к проникновению в клетки, внутриклеточная локализация, количественные характеристики накопления и особенности клеточной фармакокинетики. Знание этих характеристик и их взаимосвязей со структурой молекулы позволяет глубже понять механизмы действия ФС и прогнозировать их эффективность *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ClC1 и ClC2 являются гидрофобными соединениями, нерастворимыми в воде. В то же время поддержание мономерной формы ClC-производных имеет большое значение, так как агрегирование снижает способность к проникновению ФС в клетки и, как следствие, уменьшает фотоиндуцированную цитотоксичность [9]. Поэтому в качестве растворителя был выбран кремофор EL (CrEL), который, как показали наши эксперименты, обеспечивает стабилизацию мономерной формы соединений как в концентрированных (5–10% CrEL), так и в очень разбавленных водных растворах (0.002–0.005% CrEL, 50 мМ Трис-НСl, рН 7.4). Кроме того, CrEL разрешен к применению в клинике при системном введении, что важно в перспективе для создания лекарственных препаратов на основе исследуемых соединений. Мы выявили, что для оптимальной стабилизации мономерной формы важно соотношение между содержанием ClC-производных и CrEL. Превышение в водных растворах соотношения 0.4 ммоль/л ClC1 (ClC2) на 10 мг/мл CrEL приводит к выпадению части растворенных соединений в осадок.

Таблица 1. Параметры, характеризующие фотобиологические свойства С1С1 и С1С2

ФС	ИК ₅₀ , нМ	ИК ₉₀ , нМ	φ	K _к , мкМ	T _{ур} , мин	T _{эф} , мин
С1С1	128 ± 5	230 ± 9	0.60 ± 0.08	14 ± 1	30 ± 6	17 ± 4
С1С2	110 ± 20	240 ± 20	0.65 ± 0.04	11 ± 1	24 ± 12	50 ± 10
С1С3*	90 ± 10	180 ± 20	0.66 ± 0.02	6.6 ± 0.2	30 ± 5	60 ± 10

* По данным работы [9].

ИК₅₀ (ИК₉₀) – концентрация С1С-производного, при которой после 2 ч инкубации и облучения (см. “Эксперимент. часть”) наблюдается 50% (90%) ингибирование роста клеток; φ – квантовый выход генерации синглетного кислорода; K_к – максимальное значение коэффициента накопления при инкубации клеток с 1.5 мкмоль/л исследуемых соединений; T_{ур} – время полунакпления (50% от уровня K_к) исследуемых соединений клетками А549; T_{эф} – время полувыведения соединений из клеток А549.

Спектры поглощения и спектры испускания флуоресценции С1С1 и С1С2 в 1% CrEL представлены на рис. 1. Спектры флуоресценции С1С1 (С1С2) в 1% CrEL, 1% Тритоне X-100 и лецитиновых липосомах совпадают, что свидетельствует о схожем спектральном отклике данных соединений на различное липидоподобное окружение. С1С1 и С1С2 слабо связываются с такими белками, как сывороточный альбумин, лизоцим, α-, β- и γ-глобулины и не взаимодействуют с ДНК и РНК (данные не представлены). Таким образом, связывание с липидными структурами, предположительно, является доминирующим типом молекулярных взаимодействий С1С1 и С1С2.

Исследование фотоиндуцированной генерации активных форм кислорода соединениями С1С1 и С1С2 показало, что в мономерном состоянии в липидоподобном окружении они с высоким квантовым выходом (φ) способны продуцировать синглетный кислород (табл. 1), но не образуют гидроксил-радикалов. Из табл. 1 видно, что структура имидных заместителей, введенных в С1С-производные, слабо влияет на величину φ, хотя и просматривается небольшая тенденция к увеличению φ при удалении заряженной карбоксильной группы от хромофора. В агрегированном состоянии в водных растворах С1С1 и С1С2 синглетный кислород не образуют.

Исследования С1С1 и С1С2 в клетках были проведены с применением метода конфокальной микроспектроскопии и реконструкции спектральных изображений (КОМИРСИ) [9–13]. Эти исследования показали, что С1С1 и С1С2 эффективно проникают в клетки А549 и накапливаются там в мономерной флуоресцирующей форме (рис. 2, 3). Распределение С1С2 внутри клеток диффузно с преимущественной локализацией вблизи ядра (рис. 3а, в). Спектры флуоресценции С1С2 в клетках полностью совпадают с его спектрами в липидоподобном окружении (рис. 3д). Это позволяет заключить, что С1С2 находится в клетках преимущественно в мембраносвязанном состоянии. Для С1С1, помимо диффузного распределения с околядерным концентрированием, наблюдается накопление в гранулах диаметром 0.5–0.8 мкм (рис. 2). Эти грану-

лы можно наблюдать в клетках в проходящем белом свете (рис. 2а, б; 3а, б), и инкубация с С1С1 не меняет их числа, размера и распределения в цитоплазме. Спектры флуоресценции диффузно распределенного и концентрирующегося около ядра С1С1 полностью совпадают со спектрами в липидоподобном окружении (рис. 2к). В гранулах у С1С1 появляются измененные спектры с максимумом 711 нм и шириной на полувысоте 21 нм (рис. 2и). Воспроизвести микроокружение С1С1, характерное для гранулярных клеточных структур, и объяснить причину, вызывающую изменение спектра С1С1, пока не удалось.

В дальнейших исследованиях методом КОМИРСИ каждый внутриклеточный спектр С1С1 представляли в виде линейной комбинации двух спектров с максимумами 716 и 711 нм, и анализ проводили для компонентов С1С1d (диффузно распределенный С1С1 в липидоподобном окружении, λ_{max} 716 нм) и С1С1g (С1С1 в гранулах, λ_{max} 711 нм). Внутриклеточную концентрацию С1С1g рассчитывали на основе калибровочной зависимости, измеренной для С1С1 в 1% CrEL, в приближении, что эквимольные концентрации С1С1g и С1С1d имеют равную интегральную интенсивность спектра.

Для выяснения внутриклеточной локализации С1С1 и С1С2 нами проведено исследование с использованием флуоресцентных зондов клеточных органелл: акридин оранжевого (АО), окрашивающего лизосомы, нильского красного (НК), накапливающегося в липидных каплях, родамина 6Ж (Rh6G), окрашивающего митохондрии, и N-((4-(4,4-дифлуоро-5-(2-тионил)-4-бора-3а,4а-ди-аза-s-индацен-3-ил)феноксид)ацетил)сфингозина (BODIPY-церамид), концентрирующегося в аппарате Гольджи. Исследование показало, что концентрирование С1С1 в околядерной области вызвано предпочтительным накоплением соединения в аппарате Гольджи и митохондриях (табл. 2, рис. 4). Гранулярное распределение С1С1, очевидно, не связано с лизосомами, а отражает накопление С1С1 в липидных каплях (рис. 4, табл. 2), клеточных органеллах, отвечающих за хранение и метаболизм нейтральных липидов и стероидных

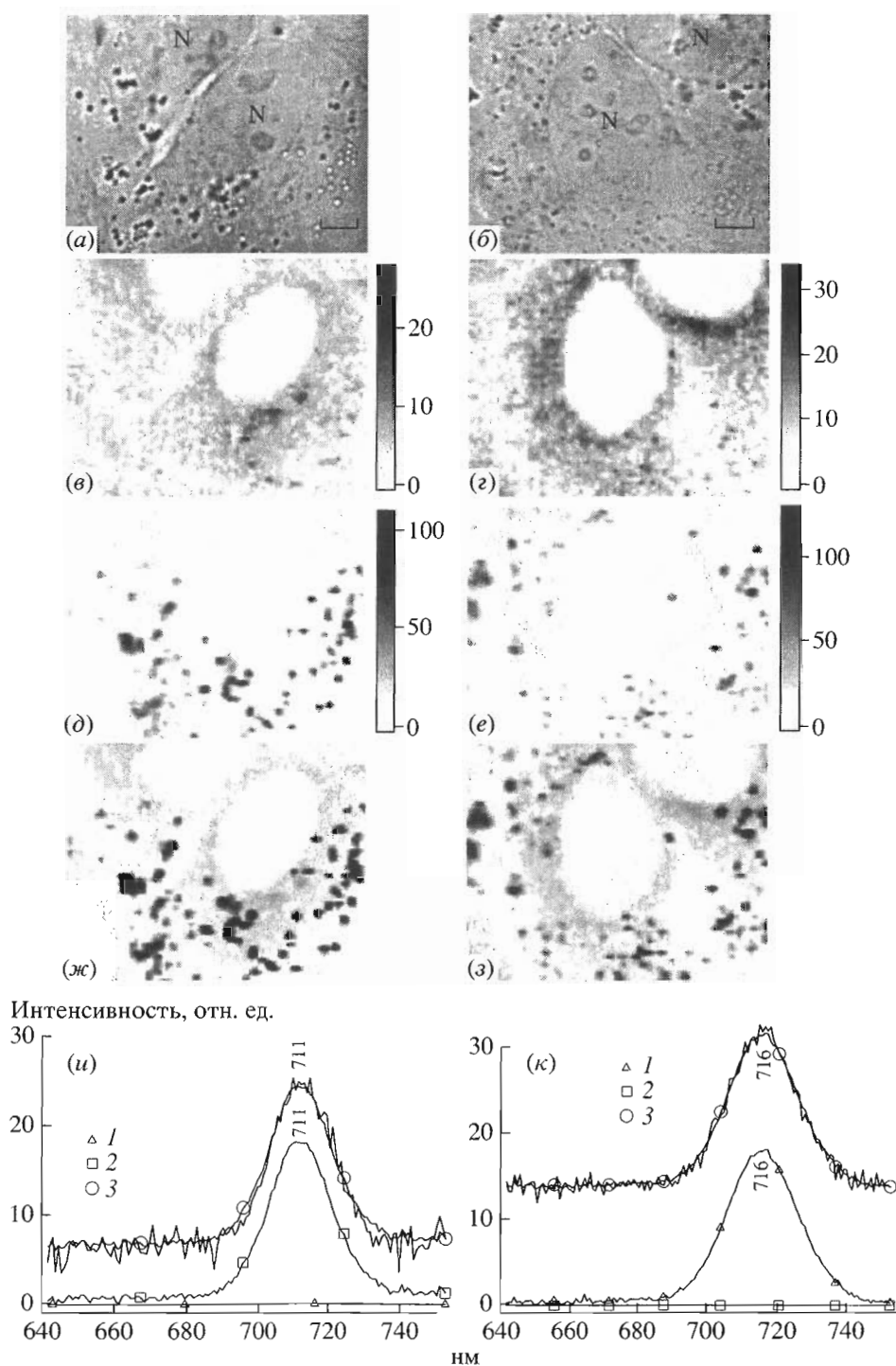


Рис. 2. Типичные картины внутриклеточного распределения и спектры флуоресценции SIC1 в живых клетках A549. Клетки инкубировали с SIC1 (1.5 мкМ) в течение 1 (а, в, д, ж) и 7 ч (б, г, е, з). (а, б) – микрофотографии клеток. Метка соответствует 5 мкм; N – ядро. (в, г) – распределение компонента SIC1d. (д, е) – распределение компонента SIC1g. (ж, з) – суммарное распределение SIC1. Шкалы интенсивности отражают концентрацию (мкМ). (и, к) – примеры внутриклеточных спектров флуоресценции SIC1 в липидных каплях (и, соответствует компоненту SIC1g) и в околоядерной области (к, соответствует компоненту SIC1d). Показано представление экспериментальных внутриклеточных спектров в виде линейной комбинации модельных спектров: спектра SIC1, связанного с мембранными структурами (1), и спектра SIC1 в липидных каплях (2). Расчетные (3) и экспериментальные спектры перекрываются; они сдвинуты по оси ординат, чтобы избежать наложения на модельные спектры. Относительные интенсивности модельных спектров соответствуют их вкладу в расчетный спектр.

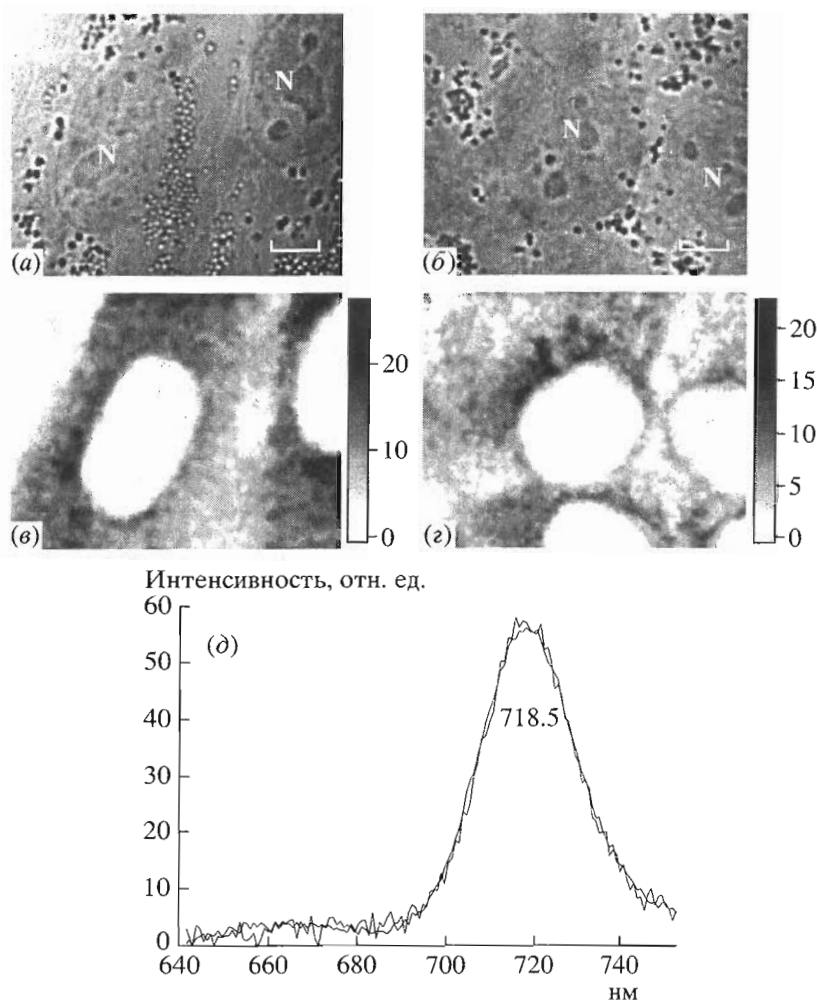


Рис. 3. Типичные картины внутриклеточного распределения (а–г) и спектр флуоресценции (д) SIC2 в живых клетках А549. Клетки инкубировались с SIC2 (1.5 мкМ) в течение 1 (а, в) и 7 ч (б, г). (а, б) – микрофотографии клеток. Метка соответствует 5 мкм; N – ядро. (в, г) – распределение SIC2. Шкалы интенсивности отражают концентрацию в мкМ. (д) – типичный внутриклеточный спектр флуоресценции SIC2 и демонстрация степени совпадения его с модельным спектром SIC2 в липидоподобном окружении (спектры перекрываются).

эфиров [14]. Хотя в областях преимущественного накопления SIC1 обнаруживаются лизосомы, концентрирования SIC1 ни в околоядерных, ни в периферических лизосомах не зарегистрировано (рис. 4).

Для SIC2 концентрирование в околоядерной области также связано с предпочтительным накоплением соединения в аппарате Гольджи и митохондриях (табл. 2, рис. 5, 6). Заметного накопления SIC2 в лизосомах и липидных каплях не об-

Таблица 2. Коэффициенты, описывающие степень солокализации селективных зондов клеточных органелл и исследуемых SIC1 и SIC2 в живых клетках А549*

ФС	АО		Rh6G		BODIPY-церамид		NK	
	S_{lab}	S_{PS}	S_{lab}	S_{PS}	S_{lab}	S_{PS}	S_{lab}	S_{PS}
SIC1d	0.3 ± 0.1	0.06 ± 0.02	0.71 ± 0.03	0.63 ± 0.03	0.74 ± 0.03	0.6 ± 0.1	0.23 ± 0.07	0.13 ± 0.04
SIC1g	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.33 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.5 ± 0.1	0.50 ± 0.05	0.68 ± 0.05
SIC2	0.80 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.79 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.58 ± 0.02	0.86 ± 0.03	–	–

* Пояснения см. в “Эксперимент. части”.

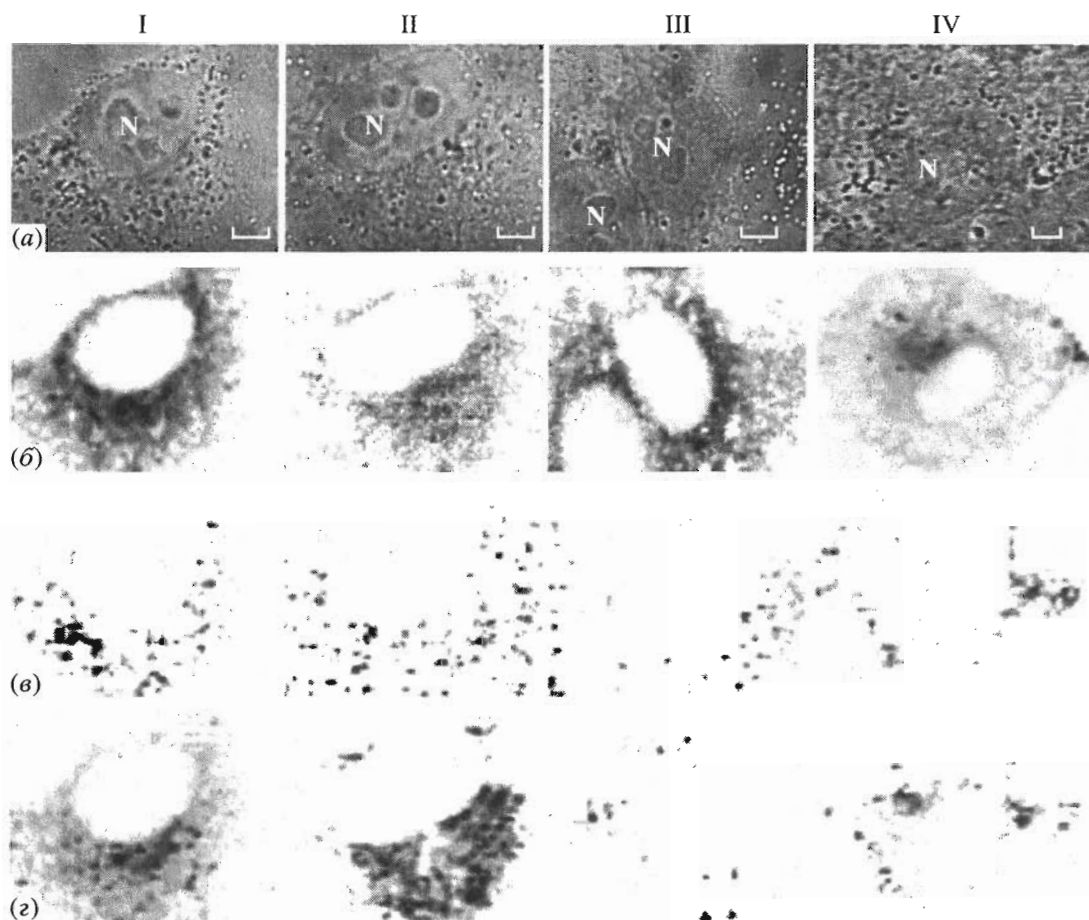


Рис. 4. Анализ внутриклеточной локализации SIC1 в живых клетках A549 с использованием флуоресцентных зондов клеточных органелл: BODIPY-церамида, окрашивающего аппарат Гольджи (I); Rh6G, окрашивающего митохондрии (II); AO, окрашивающего лизосомы (III), и NK, окрашивающего липидные капли (IV). (a) – микрофотография клетки (метка – 5 мкм; N – ядро). Распределения в клетках компонента SIC1d (б), компонента SIC1g (в) и соответствующих флуоресцентных зондов клеточных органелл (г). Черный цвет на спектральных изображениях (б–г) соответствует наибольшей интенсивности сигнала.

наружено. Это внутриклеточное распределение в точности повторяет распределение исследованного ранее соединения SIC3 [9]. Отметим, что с использованием метода КОМИРСИ удалось провести эксперименты по одновременному селективному мечению двух типов органелл в присутствии исследуемого ФС (рис. 6). Полученные результаты еще раз подтвердили, что митохондрии и аппарат Гольджи являются основными органеллами, преимущественно накапливающими SIC2. В этих экспериментах анализ полных внутриклеточных спектров флуоресценции с разложением их на составляющие компоненты позволяет наиболее корректно выделить сигналы каждого из флуорофоров, несмотря на перекрывание спектров, и повышает точность экспериментов по изучению внутриклеточной локализации флуорофоров (рис. 6).

Следует отметить, что описанное выше внутриклеточное распределение SIC1 и SIC2 (рис. 2, 3)

формируется за 10–15 мин и при увеличении времени инкубации меняется только количественно. Для обоих производных характерен линейный рост цитоплазматической концентрации в течение 1 ч инкубации клеток, а через 2 ч цитоплазматическая концентрация достигает насыщения (рис. 7). При этом максимальный коэффициент накопления SIC2 в 1.3 раза меньше, чем у SIC1 (табл. 1).

Выведение SIC1 из клеток происходит довольно быстро (рис. 7): за 1 ч уровень SIC1 в клетках снижается в 7 раз, а половина вещества высвобождается из клеток за 17 мин (табл. 1). Из анализа спектральных изображений следует, что из митохондрий и аппарата Гольджи SIC1 выводится быстрее, чем из липидных капель (не показано). Выведение из клеток SIC2 происходит в 3 раза медленнее, чем SIC1 (табл. 1).

При увеличении концентрации SIC1 и SIC2 во внешней среде от 0.5 до 16 мкМ происходит прак-

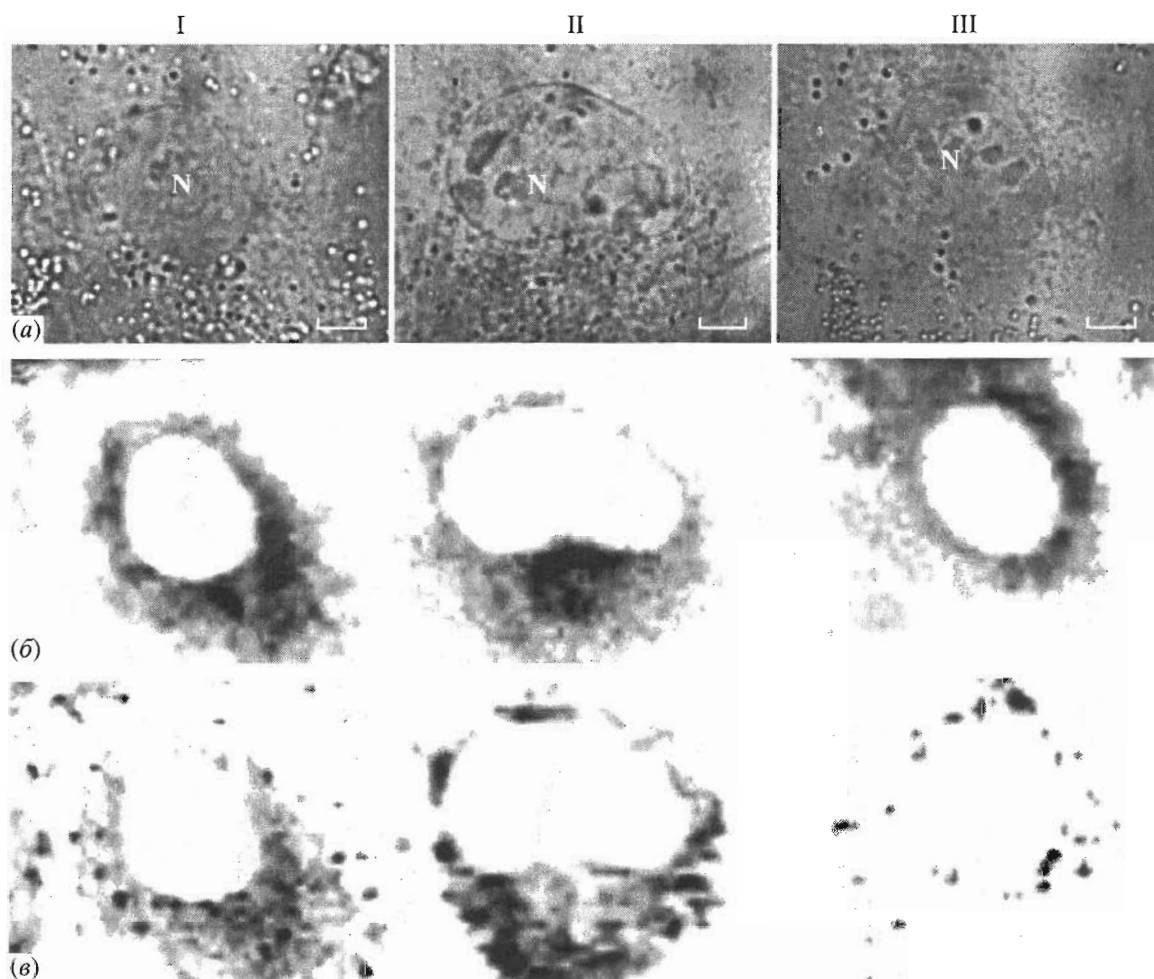


Рис. 5. Анализ внутриклеточной локализации CIC2 в живых клетках A549 с использованием флуоресцентных зондов, окрашивающих (I) аппарат Гольджи (BODIPY-церамид); (II) митохондрии (Rh6G) и (III) лизосомы (АО). (а) – микрофотография клетки (метка – 5 мкм; N – ядро). Распределение в клетках CIC2 (б) и соответствующих флуоресцентных зондов клеточных органелл (б'). Черный цвет на спектральных изображениях (б–в) соответствует наибольшей интенсивности сигнала.

тически линейное возрастание их цитоплазматической концентрации (рис. 8). При этом увеличение внутриклеточного накопления CIC1 при концентрации в среде более 3 мкМ происходит только за счет его концентрирования в аппарате Гольджи и митохондриях, а накопление CIC1 в липидных каплях достигает насыщения (рис. 8).

Таким образом, анализ кинетической и концентрационной зависимостей накопления позволяет предположить, что число центров связывания CIC1 в липидных каплях ограничено, что и является причиной быстрого насыщения накопления в этих органеллах. Известно, что внутренняя гидрофобная область липидных капель заполнена нейтральными липидами и стеринными эфирами, а граница с цитозолем сформирована из монослоя фосфолипидов с небольшим количеством встроженных белков [14]. Поэтому связывание заряженного CIC1 возможно только в пределах монослоя

фосфолипидов, а электростатическое отталкивание, по-видимому, является основной причиной, создающей барьер для роста концентрации CIC1 на поверхности липидных капель. Отметим, что соединения CIC1 и CIC2 выгодно отличаются от CIC3 линейной концентрационной зависимостью внутриклеточного накопления в более широком диапазоне концентраций. Для CIC3 значительное отклонение от линейной зависимости за счет насыщения накопления наблюдалось уже при концентрации соединения во внешней среде, равной 5 мкМ [9].

Облучение клеток в присутствии CIC1 и CIC2 вызывает концентрационно зависимую гибель клеток (рис. 9). Без облучения CIC1 и CIC2 не оказывают цитотоксического действия на клетки A549 (рис. 9). Фототоксичность CIC1 и CIC2 практически одинакова (рис. 9, табл. 1) и сопоставима с фототоксичностью CIC3 (табл. 1), определен-

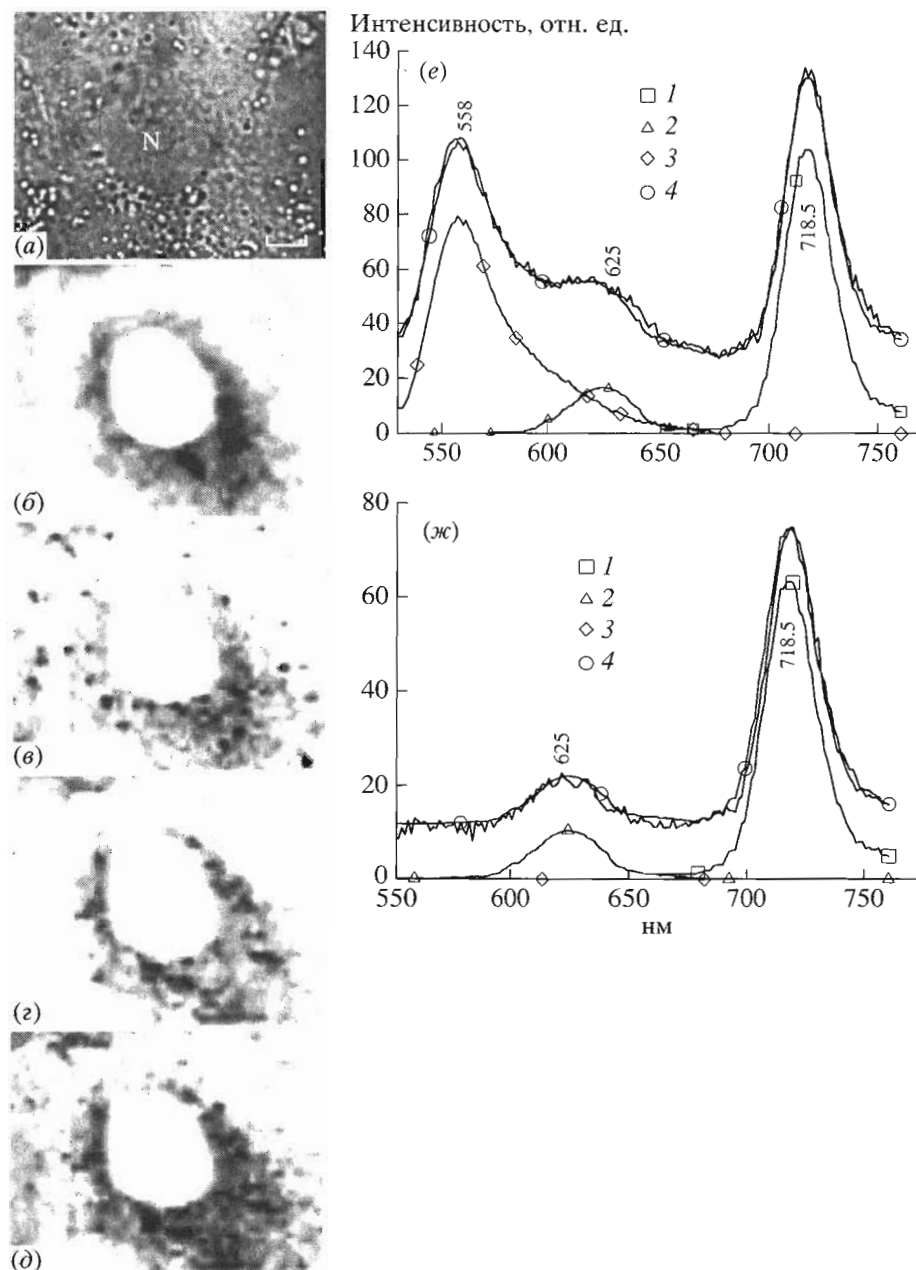


Рис. 6. Анализ внутриклеточной локализации CIC2 в живых клетках A549 с использованием параллельного окрашивания аппарата Гольджи (BODIPY-церамид) и митохондрий (Rh6G). (а) – микрофотография клетки (метка – 5 мкм; N – ядро). Распределение в клетке CIC2 (б), BODIPY-церамида (в), Rh6G (г), а также суммарное распределение BODIPY-церамида и Rh6G (д), демонстрирующее хорошее совпадение с картиной распределения CIC2 (б). Черный цвет на спектральных изображениях (б–д) соответствует наибольшей интенсивности сигнала. Внутриклеточное распределение флуорофоров установлено методом КОМИРСИ с применением анализа полных внутриклеточных спектров флуоресценции. (е, ж) – примеры разложения спектров флуоресценции, измеренных в разных областях цитоплазмы, на линейную комбинацию модельных спектров: спектра CIC2, связанного с мембранными структурами (1); спектра BODIPY-церамида (2) и спектра Rh6G (3). Расчетный (4) и экспериментальные спектры перекрываются; они сдвинуты по оси ординат, чтобы избежать наложения на модельные спектры. Относительные интенсивности модельных спектров соответствуют их вкладу в расчетный спектр.

ной в тех же условиях [9]. С учетом данных, полученных нами ранее [9, 10], фототоксичность исследованных CIC-производных в 40, 60 и 100 раз выше, чем фототоксичность хлорина р6, 3-формил-3-девинилхлорина р6 и используемого в клинике Фотогема соответственно.

Фототоксичность не снижалась при удалении CIC1 и CIC2 из внешней среды перед облучением, т.е. воздействие обусловлено ФС, накапливающимися внутри клеток, а активные формы кислорода, образующиеся во внешней среде, вызывают незначительный повреждающий эффект. Увели-

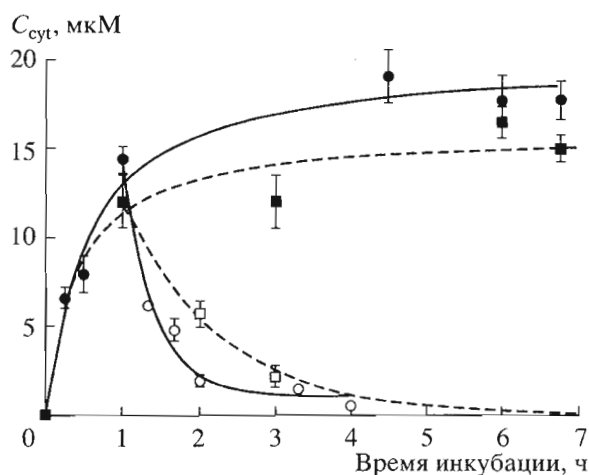


Рис. 7. Кинетика накопления (закрашенные символы) и удерживания (незакрашенные символы) C1C1 (кружки, сплошная линия) и C1C2 (квадраты, пунктирная линия) в цитоплазме клеток A549. $C_{\text{цит}}$ – средняя цитоплазматическая концентрация C1C-производного. Клетки инкубировали с 1.5 мкМ C1C1 или C1C2. Удерживание соединений оценивали, поместив клетки после инкубации с C1C1 или C1C2 (1 ч) в свежую среду, не содержащую C1C-производных.

чение времени инкубации клеток с соединениями с 2 до 4 ч не приводило к заметному возрастанию фототоксичности: параметр ИК₉₀ (определение параметра дано в “Эксперимент. части”) в этом случае составил 220 ± 25 и 240 ± 20 нМ для C1C1 и C1C2 соответственно. Этот результат хорошо согласуется с тем, что к этому времени внутриклеточная концентрация C1C-производных достигает насыщения (рис. 7).

При концентрациях, использованных в тестах на фототоксичность, фракция C1C1, локализованная в липидных гранулах, составляет заметную долю ФС в клетках. С учетом высокой активности C1C1, а также высокой реакционной способности и короткого времени жизни синглетного кислорода можно заключить, что липидные капли являются эффективной мишенью фотодинамического воздействия.

Отметим, что изменение структуры заместителей в C1C1 и C1C2 по сравнению с C1C3 привело к двукратному увеличению их внутриклеточного накопления, однако их клеточная фототоксичность не возросла (табл. 1). Одно из возможных объяснений – это изменение локализации C1C1 и C1C2 в мембранах по сравнению с C1C3, связанное с особенностями структуры молекул и приводящее к увеличению расстояния между хромофором и молекулярными мишенями, чувствительными к фотодинамическому воздействию. В частности, можно предположить уменьшение глубины встраивания C1C1 и C1C2 в липидный бислой по сравнению с C1C3 и, следовательно, увеличение расстояния между хромофором и двойными свя-

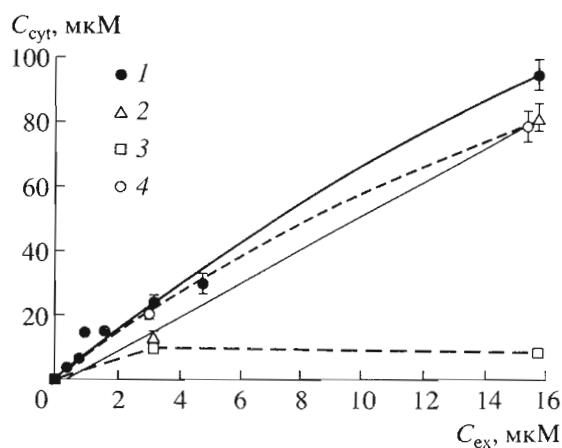


Рис. 8. Зависимость средней цитоплазматической концентрации C1C1 (1), концентраций его внутриклеточных компонентов C1C1d (2), C1C1g (3) и C1C2 (4) в клетках A549 от концентрации C1C-производных во внешней среде. Клетки инкубировали с C1C1 и C1C2 в течение 1 ч.

зями липидов, способными к окислению под действием активных форм кислорода и свободных радикалов.

Обнаруженные нами различия во внутриклеточной локализации свидетельствуют, что путем изменения структуры заместителей можно управлять внутриклеточным транспортом C1C-производных, обеспечивая их накопление в различных чувствительных к фотодинамическому воздействию клеточных органеллах.

Таким образом, исследованные в данной работе C1C-производные обладают высокой фотоди-

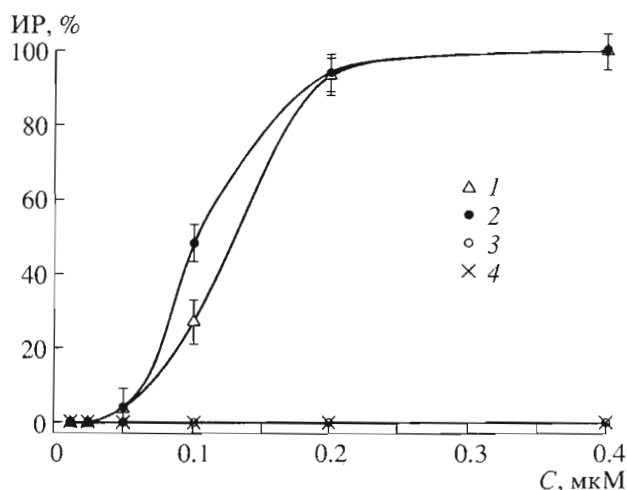


Рис. 9. Зависимость фотоиндуцированного ингибирования роста клеток A549 (ИР) от концентрации C1C1 (1) и C1C2 (2) в среде. Клетки инкубировали с C1C-производными в течение 2 ч и проводили облучение. Контрольные клетки инкубировали с C1C1 (3) и C1C2 (4) в течение 26 ч без облучения.

намической активностью при возбуждении их в ближней ИК-области и интересны тем, что изменение длины *N*-алкилкарбоксильного заместителя на одну CH_2 -группу приводит к изменению внутриклеточной локализации соединений и скорости их выведения из клеток. Зависимость внутриклеточной локализации ФС от структуры молекулы создает основу для отбора ФС, действие которых нацелено на определенные клеточные органеллы. Тот факт, что изменение структуры заместителей влияет на кинетику выведения ФС из клеток, может быть интересен для направленного создания субстанций, фармакокинетика которых оптимизирована для конкретных задач фотодинамической терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследованиях использованы: АО и Rh6G (ICN, США); Тритон X-100, *L*-гистидин, метиленовый синий, 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин (NDMA) и CrEL (Sigma, США); BODIPY-церамид (Molecular Probes Inc., США); NK, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-бифенил тетразолиум бромид и раствор Хенкса (ДиаМ, Россия).

SIC1 и SIC2 были синтезированы как описано ранее [7, 8]. Концентрированные растворы SIC1 и SIC2 готовили растворением сухого вещества в небольшом количестве 100% CrEL с последующим разбавлением водой в 10–20 раз до концентрации 1 мМ по активному веществу. Точные концентрации SIC1 и SIC2 рассчитывали на основе определенных нами молярных коэффициентов поглощения в 1% CrEL (50 мМ Трис-НСl, pH 7.4) в максимуме Q-полосы поглощения: ϵ_{710} 34400 и $30000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для SIC1 и SIC2 соответственно.

Измерение активных форм кислорода. Определение квантовых выходов генерации синглетного кислорода (ϕ) соединениями SIC1 и SIC2 проводилось спектрофотометрически по обесцвечиванию NDMA в присутствии гистидина в процессе облучения раствора, содержащего исследуемый ФС [15]. В качестве стандарта с известным значением ϕ использовали метиленовый синий (ϕ 0.52) [16]. Насыщенную воздухом реакционную смесь (50 мМ Трис-НСl, pH 7.4), содержащую NDMA (30 мкМ), гистидин (10 мМ) и метиленовый синий (11.7 мкМ) или SIC-производное (8 мкМ в 0.1% CrEL), облучали He-Ne-лазером (543.5 нм, 0.6 мВт/см², 2 ч) и каждые 10–20 мин измеряли изменения в спектре поглощения NDMA. В остальном измерения и расчеты проводили как описано ранее [9]. Реакция фотоиндуцированного обесцвечивания NDMA в присутствии ФС, но без гистидина [17], использована для выявления способности SIC-производных образовывать $\cdot\text{OH}$ -радикалы.

Эксперименты на культуре клеток. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 были получе-

ны из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского. Клетки культивировали в среде ИГЛА-МЕМ с добавлением 2 мМ *L*-глутамин и 6% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 .

Для изучения накопления и распределения ФС методом КОМИРСИ клетки высевали на покровные стекла в 24-луночные планшеты (плотность посева 5×10^4 клеток/мл) и через 24 ч в среду вносили исследуемые соединения. При исследовании **кинетики накопления** клетки инкубировали с 1.5 мкМ SIC1 или SIC2 в течение 20 мин – 7 ч. **Для измерения концентрационной зависимости** клетки инкубировали с 0.3–15.8 мкМ SIC1 или SIC2 в течение 1 ч в стандартных условиях. При исследовании **кинетики выведения** SIC-производных клетками их инкубировали с 1.5 мкМ SIC1 или SIC2 в среде с 6% ЭБС в течение 1 ч, затем отбирали среду, дважды отмывали клетки теплым (37°C) сбалансированным солевым раствором Хенкса и инкубировали в свежей среде в течение 20 мин – 3 ч.

В экспериментах по изучению внутриклеточной локализации SIC-производных клетки инкубировали с исследуемым соединением (4 мкМ, 1 ч), а затем либо с Rh6G (10 нг/мл, 10 мин, 37°C) для идентификации митохондрий, либо с АО (0.5 мкг/мл, 5 мин, 37°C) для идентификации лизосом. Для окрашивания липидных капель NK вносили в среду в концентрации 5 мкМ из 0.1 мМ раствора в 1% CrEL одновременно с SIC1 (4 мкМ) и инкубировали 1 ч. Для окрашивания аппарата Гольджи клетки тщательно отмывали от среды с ЭБС, инкубировали с комплексом BODIPY-церамид-бычий сывороточный альбумин (5 мкМ, 15 мин) в растворе Хенкса (37°C), меняли раствор Хенкса на среду с ЭБС и инкубировали с исследуемым соединением (4 мкМ) в течение 1 ч (37°C). Для параллельного окрашивания аппарата Гольджи и митохондрий в конце описанной выше инкубации клеток с BODIPY-церамидом и SIC-производным в среду вносили на 10 мин Rh6G (10 нг/мл). После завершения вышеописанных процедур клетки переносили на предметное стекло, закрывали покровным стеклом, под которое вводили 30 мкл раствора Хенкса, и помещали под микроскоп для исследования.

Для определения фототоксичности SIC-производных клетки высевали в 96-луночные плоскостонные планшеты. Тестируемые вещества вносили в лунки через 24 ч после посева, варьируя концентрацию от 0.01 до 8 мкМ. Для оценки фототоксичности через 2 ч инкубации с SIC-производными клетки облучали галогеновой лампой через широкополосный фильтр КС-13 (пропускание >640 нм) и водный фильтр толщиной 5 см. Плотность мощности составляла 13–14 мВт/см² при световой дозе ~10 Дж/см². После облучения

клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч и затем определяли выживаемость клеток в культуре с использованием теста на основе 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-бифенил тетразолиум бромида (МТТ-тест) [18]. Оценку цитотоксичности соединений в отсутствие облучения проводили через 26 ч инкубации в темноте с применением МТТ-теста. Уровень ингибирования роста (ИР) культуры вычисляли по формуле:

$$\text{ИР (\%)} = [(A_k - A_0)/A_k] \times 100\%,$$

где ИР – уровень ингибирования роста клеток в культуре; A_0 и A_k – поглощение в опыте и в контроле на длине волны 550 нм. Для сравнительной оценки фототоксичности соединений рассчитывали величины ИК₅₀ и ИК₉₀, соответствующие концентрации ФС, при которой наблюдается 50 или 90% ингибирование роста клеток.

Микроспектральные измерения проводили методом КОМИРСИ, методические основы которого описаны ранее [9–13]. Для исследования внутриклеточной локализации СИС-производных использовали конфокальный сканирующий микроспектрометр V-45 (Dilor, Франция). Возбуждение флуоресценции осуществляли аргоновым ионным лазером (Spectra Physics, модель 2020-03, США) с длиной волны 514.5 нм и мощностью света на образце 100 мкВт. Кинетические и концентрационные зависимости клеточного накопления (выведения) СИС-производных исследовали с использованием экспериментальной установки для микроспектрального конфокального анализа, созданной на основе спектрографа OMARS-89 (Dilor, Франция), микроскопа Olympus BH-2 (Япония) и предметного столика с электронной системой микропозиционирования (Marzhauser-Wetzlar, Германия). В качестве системы детекции использован прибор с зарядовой связью (1024 × 256 элементов) с воздушным охлаждением на основе эффекта Пельтье (Wright Instruments LTD, Англия). Возбуждение флуоресценции осуществляли гелий-неоновым лазером (Spectra Physics, США) с длиной волны 632.8 нм и мощностью на образце 3–18 мкВт. Процедуры измерения изображений и их обработки описаны ранее [9–13].

Для описания кинетической кривой накопления использовалось уравнение:

$$C_{\text{цит}}(t) = C_{\text{ex}} K_k t / (T_{\text{уп}} + t), \quad (1)$$

где $C_{\text{цит}}(t)$ – средняя цитоплазматическая концентрация ФС, зависящая от времени инкубации t ; C_{ex} – концентрация ФС во внешней среде; K_k – максимальное значение отношения $C_{\text{цит}}/C_{\text{ex}}$ при насыщении накопления; $T_{\text{уп}}$ – время инкубации, при котором $C_{\text{цит}}$ достигает 50% от уровня насыщения.

Данные по выведению ФС из клеток анализировали с помощью уравнения:

$$C_{\text{цит}}(t) = C_{\text{цит}}(0) \exp(-\ln 2 t / T_{\text{ef}}), \quad (2)$$

где $C_{\text{цит}}(0)$ – средняя цитоплазматическая концентрация ФС в момент времени, когда ФС был удален из внешней среды; T_{ef} – время полувыведения ФС из клеток.

В исследованиях СИС1 и СИС2, проведенных методом КОМИРСИ, в частности в экспериментах по идентификации внутриклеточной локализации ФС, спектры флуоресценции соединений в клетках представляли в виде суперпозиции спектров исследуемого ФС и спектров флуоресцентных зондов клеточных органелл (АО, Rh6G, BODIPY-церамид, НК) с соответствующими весовыми коэффициентами как описано ранее [9]. В случае СИС1 в рассмотрении вводили два спектра, соответствующие разным внутриклеточным сигналам СИС1 (см. “Результаты и обсуждение”). На основе данного анализа реконструировали двумерные карты весовых коэффициентов – спектральные изображения, описывающие распределение каждого флуоресцентного сигнала в клетках. Полученные спектральные изображения подвергали визуальному и поточечному анализу для обнаружения совпадения внутриклеточной локализации исследуемого ФС и флуоресцентных зондов клеточных органелл.

Степень совпадения локализации характеризовали с помощью коэффициентов S_{lab} и S_{PS} , которые рассчитывали следующим образом. Сначала в двумерных матрицах весовых коэффициентов обнуляли неспецифический сигнал низкой интенсивности, а затем рассчитывали новую матрицу, элементы $a_{i,j}$ которой являлись произведением элементов двумерных матриц весовых коэффициентов исследуемого соединения $b_{i,j}$ и зондов $c_{i,j}$ после процедуры обнуления неспецифического сигнала. S_{lab} получали как отношение числа ненулевых элементов $a_{i,j}$ к числу ненулевых элементов $c_{i,j}$. S_{PS} рассчитывали как отношение числа ненулевых элементов $a_{i,j}$ к числу ненулевых элементов $b_{i,j}$. S_{lab} и S_{PS} меняются от 0 (отсутствие солокализации) до 1 (полная солокализация). S_{lab} характеризует отношение площади элементов изображения, в которых обнаружено совпадение сигналов, к общей площади, соответствующей на изображении изучаемым органеллами. S_{PS} характеризует отношение площади элементов изображения, в которых обнаружено совпадение сигналов, к общей площади, соответствующей на изображении распределению изучаемого соединения. Величины S_{lab} и S_{PS} рассчитывали для каждой исследованной клетки и усредняли по 10–20 клеткам.

Проведенные исследования поддержаны грантами РФФИ (№ 01-04-49298 и 02-04-08043), молодежными грантами РФФИ (№ 02-04-06181/06182, 03-04-06225/06226), грантом “Поддержка научных школ РФ” НШ-2013.2003.3, а также грантами РИС Национального центра научных исследований Франции, ИНТАС № 01-0461 и НАТО № LST.CLG.9777077.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. // Росс. хим. журн. 1998. Т. 42. С. 5–9.
2. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. // Nat. Rev. Cancer. 2003. V. 3. P. 380–387.
3. Moghissi K., Dixon K. // Technol. Cancer Res. Treat. 2003. V. 2. P. 319–326.
4. Eljamel M.S. // Technol. Cancer Res. Treat. 2003. V. 2. P. 303–310.
5. Kendall C.A., Morton C.A. // Technol. Cancer Res. Treat. 2003. V. 2. P. 283–288.
6. Overholt B.F., Panjehpour M., Halberg D.L. // Gastrointest. Endosc. 2003. V. 58. P. 183–188.
7. Mironov A.F., Lebedeva V.S., Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Fomina G.I. // Proc. SPIE. 1999. V. 3563. P. 59–67.
8. Mironov A.F., Lebedeva V.S. // Tetrahedron Lett. 1998. V. 39. P. 905–907.
9. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Filyasova A., Yakubovskaya R., Mironov A., Egret-Charlier M., Vigny P. // Photochem. Photobiol. 2002. V. 74. P. 633–643.
10. Grichine A., Feofanov A., Karmakova T., Kazachkina N., Pecherskih E., Yakubovskaya R., Mironov A., Egret-Charlier M., Vigny P. // Photochem. Photobiol. 2001. V. 73. P. 267–277.
11. Feofanov A., Charonov S., Kudelina I., Fleury F., Nabiev I. // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 3317–3327.
12. Feofanov A., Charonov S., Fleury F., Kudelina I., Nabiev I. // Biophys. J. 1997. V. 73. P. 3328–3336.
13. Феофанов А., Гришин А., Куделина И., Шитова Л., Кармакова Т., Якубовская Р., Эгрет-Шарлье М., Вини П. // Биооргани. химия. 1999. Т. 25. С. 892–902.
14. Zweytick D., Athenstaedt K., Daum G. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1469. P. 101–120.
15. Blum A., Grossweiner L.I. // Photochem. Photobiol. 1985. V. 41. P. 27–32.
16. Usui Y., Kamogawa K. // Photochem. Photobiol. 1974. V. 19. P. 245–247.
17. Bors W., Saran M., Lengfelder E., Michel C., Fuchs C., Frenzel C. // Photochem. Photobiol. 1978. V. 28. P. 629–638.
18. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 936–942.

Photobiological Properties of 13,15-*N*-(Carboxymethyl)- and 13,15-*N*-(2-Carboxyethyl)cycloimide Derivatives of Chlorin p6

A. V. Feofanov[#], A. I. Nazarova^{*}, T. A. Karmakova^{**}, A. D. Plyutinskaya^{**},
A. I. Grishin^{*}, R. I. Yakubovskaya^{**}, V. S. Lebedeva^{***}, R. D. Ruziev^{***},
A. F. Mironov^{***}, J.-C. Maurizot^{****}, and P. Vigny^{****}

[#]Phone: +7 (095) 336-6455; fax: +7 (095) 336-1766; e-mail: alexei@nmr.ru

^{*}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**}Herzen Oncological Research Institute, Moscow, Russia

^{***}Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology,
pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

^{****}Centre de Biophysique Moleculaire CNRS, Orleans, France

Lipophilic derivatives of chlorin p6, 13,15-*N*-(carboxymethyl)cycloimide methyl ester (CIC1) and 13,15-*N*-(2-carboxyethyl)cycloimide methyl ester (CIC2), were shown to absorb light in 710 nm region and to be efficient IR photosensitizers. They exhibit similar phototoxicities on the cells of A549 human lung adenocarcinoma, which are 40- and 100-fold higher than those of chlorin p6 and the clinically used Photogem, respectively, and are not toxic in the absence of light irradiation. The confocal spectral imaging technique allowed us to demonstrate that the high phototoxicity of CIC1 and CIC2 is due to their ability to readily penetrate to cells and to be bound to the cell membranes and lipid-containing structures in the monomeric photoactive form. Under the irradiation, the membrane-bound CIC1 and CIC2 are characterized by high quantum yields of singlet oxygen generation (0.6 and 0.65, respectively) and the inability to produce hydroxyl radicals. A 1.5- μM content of CIC1 and CIC2 in the incubation medium provides for their average cytoplasmic concentrations of 21 and 16.5 μM , respectively. The incubation times to achieve 50% level of maximum accumulation for CIC1 and CIC2 in A549 cells are 30 ± 6 and 24 ± 12 min, and the times for 50% release of the dyes from the cells are 17 ± 4 and 50 ± 10 min, respectively. A diffuse distribution with the predominant accumulation in the membranes of the Golgi apparatus and mitochondria is characteristic of both CIC2 and CIC1, whereas, in addition, CIC1 is considerably accumulated in lipid droplets (cellular organelles responsible for the storage and metabolism of neutral lipids and steryl esters). Our results demonstrate that changes in the structure of the imide substituent could affect the intracellular localization and the rate of release of chlorin p6 cycloimide derivatives from cells while preserving their high photodynamic activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: chlorin p6 cycloimide derivatives, confocal spectral imaging, photodynamic therapy, photosensitizer