



УДК 547.979.733.057:543.42

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ НА ФОТОХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 13,15-*N*-ЦИКЛОИМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА р6

© 2005 г. А. И. Назарова*, А. В. Феофанов**[#], Т. А. Кармакова^{2*},
Г. В. Шаронов*, А. Д. Плютинская^{2*}, Р. И. Якубовская^{2*}, В. С. Лебедева^{3*},
А. Ф. Миронов^{3*}, Ж.-К. Моризо^{4*}, П. Вини^{4*}

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

^{2*}Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва;

^{3*}Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва;

^{4*}Центр молекулярной биофизики Национального центра научных исследований, Орлеан, Франция

Поступила в редакцию 15.02.2005 г. Принята к печати 05.05.2005 г.

Исследовано влияние электроноакцепторных заместителей в положении 3 макроцикла в нейтральных и карбоксилсодержащих отрицательно заряженных циклоимидных производных хлорина р6 (ЦИХЛ) на фотохимические и биологические свойства этих фотосенсибилизаторов. На основе полученных данных об их фотониндуцированной цитотоксичности, эффективности генерирования активных форм кислорода, фотостабильности, внутриклеточной локализации, количественных параметров накопления в клетках и особенности клеточной фармакокинетики проведен анализ зависимости между структурой и свойствами ЦИХЛ. Показано, что изученные соединения могут быть использованы для создания фотосенсибилизаторов с интенсивным поглощением в области 740 нм, контролируемой внутриклеточной локализацией и высокой фотодинамической активностью в отношении опухолевых клеток.

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

ВВЕДЕНИЕ

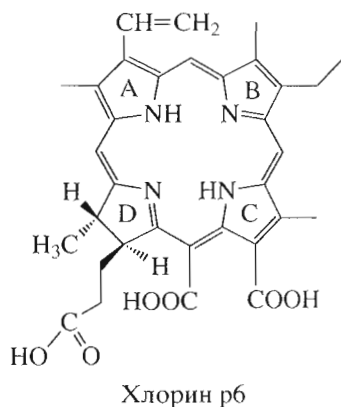
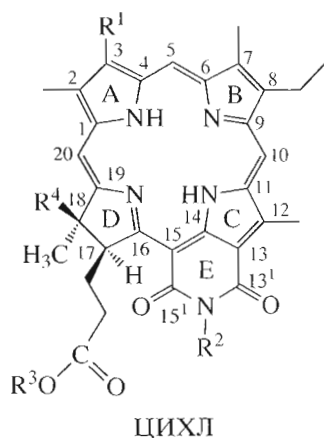
Метод фотодинамической терапии (ФДТ) рака находит все более широкое применение в клинической онкологии [1–3]. Метод основан на накоплении в опухолевой ткани введенного в организм фотосенсибилизатора (ФС), действие которого активируется локальным световым облучением и сопровождается генерированием активных форм кислорода (АФК), вызывающих гибель опухолевых клеток [4]. ФДТ выгодно отличается от химиотерапии избирательностью поражения опухоли и отсутствием общего токсического воздействия на организм. Оптимальный ФС должен сочетать в себе ряд свойств, а именно – высокий

квантовый выход АФК и фотостабильность, селективность накопления в опухоли, высокую фототоксичность и низкую токсичность в отсутствие воздействия светом, быстрое выведение из организма. Проницаемость тканей для света возрастает с увеличением длины волны излучения, что обеспечивает более глубокое поражение опухоли [2]. С этим связан интерес к разработке ФС, поглощающих в длинноволновой области спектра (700–800 нм).

Для направленного создания эффективного ФС необходимо глубокое понимание взаимосвязи между структурой молекулы и ее физико-химическими и биологическими свойствами. К настоящему времени изучено много соединений, эффективно генерирующих АФК [5, 6]. Однако на основе опубликованных данных довольно сложно проследить закономерности влияния структуры на свойства ФС в биологических системах (клетках и тканях), поскольку варьируются и хромофорный центр, и боковые заместители. Многие известные ФС предоставляют ограниченные возможности для направленной модификации их структуры. Например, фталоцианины и нафталоцианины –

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; DMPC – димиристоилфосфатидилхолоин; $O_2^{\cdot-}$ – супероксид-ион; CrEL – Кремофор EL; метод КОМИРСИ – метод конфокальной микроскопии и реконструкции спектральных изображений; NBT – нитросиний тетразолий; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор; ЦИХЛ – циклоимидные производные хлорина р6; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка.

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



Соединение	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
(I)	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H	H
(II)	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ OH	H	H
(III)	CH=CH ₂	OCOCH ₃	H	H
(IV)	CH=CH ₂	OH	CH ₃	H
(V)	CH=CH ₂	OCH ₃	CH ₃	H
(VI)	CH=CH ₂	CH ₂ COOH	CH ₃	H
(VII)	CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ COOH	CH ₃	H
(VIII)	CH=CH ₂	OH	H	H
(IX)	CHO	(CH ₂) ₃ OH	H	H
(X)	CHO	OCH ₃	CH ₃	H
(XI)	CH=NOH	OCH ₃	CH ₃	H
(XII)	CHO	OH	CH ₃	H
(XIII)	CH=CHCHO	OCOCH ₃	CH ₃	H
(XIV)	CH=CHCHO	OH	CH ₃	H
(XV)	CH=CH ₂	(CH ₂) ₃ OH	H	OH

симметричные молекулы, и введение заместителей происходит по нескольким положениям одновременно [7, 8]. Еще сложнее ввести в эти ФС разные функциональные группы и, тем более, контролировать их взаимное расположение.

Для изучения возможности управления свойствами ФС за счет изменения структуры нами была исследована серия ЦИХЛ с различными заместителями в пиррольных циклах А, D и имидном цикле Е. Наличие имидного цикла в структуре ЦИХЛ обуславливает батохромный сдвиг Q-полосы поглощения на 40–50 нм по сравнению с хлорином р6 [9, 10] и улучшает внутриклеточное проникновение ЦИХЛ, обеспечивая в итоге существенно более высокую фотоиндуцированную цитотоксичность [11–14]. При исследовании влияния заместителей R² и R³ на свойства соединений (I)–(VII) нами, помимо оценки их фотоиндуцированной цитотоксичности, был проведен сравнительный анализ таких характеристик, как эффективность генерирования АФК, способность к проникновению в клетки, внутриклеточная локализация, количественные параметры накопления в клетках и особенности клеточной фармакокинетики [12–14]. Было обнаружено, что, варьируя заместители, можно изменять внутриклеточную локализацию ЦИХЛ, направляя их преимущественно

в аппарат Гольджи (соединения (I)–(IV), (VII)) или во внутриклеточные липидные капли (соединения (V), (VI)). При этом оба типа локализации ФС обеспечивают высокую фотоиндуцированную цитотоксичность этих соединений. Изменяя структуру заместителей R² и R³, можно влиять на кинетику проникновения ЦИХЛ в клетки, увеличивать цитоплазматическую концентрацию мономерной фотоактивной формы ФС и варьировать скорость выведения соединений из клеток. Отмечено [14], что определенные комбинации заместителей уменьшают квантовый выход (φ) генерирования синглетного кислорода (например, соединения (III)) или снижают стабильность молекулы в растворе (соединение (VIII)).

В данной работе продолжено изучение взаимосвязей между структурой и свойствами ЦИХЛ. Исследовано влияние электроноакцепторных заместителей в пиррольном цикле А на свойства соединений (IX)–(XIV). На примере соединения (XV) исследована целесообразность увеличения полярности ЦИХЛ за счет введения 18-гидрокси-группы. Охарактеризована фотостабильность соединений, уточнена внутриклеточная локализация и изучена способность ЦИХЛ участвовать в фотоиндуцированном образовании супероксид-ионов. Сопоставлены особенности связывания ЦИХЛ с ком-

Таблица 1. Физико-химические характеристики ЦИХЛ*

ЦИХЛ [лит. источник]	λ_Q , нм	ϵ , $\times 10^4$ М ⁻¹ см ⁻¹	P , мм	$\Phi_{pb} \times 10^5$	Φ	$V_{отн}$
(I) [10]	711	3.25	1.6	$2.1 \pm 0.1^{**}$	0.66 ± 0.02	1
(II) [12]	709	3.15	0.5	–	0.59 ± 0.06	0.6
(III) [12]	711	3.42	1.6	–	0.35 ± 0.04	0.2
(IV) [12]	713	3.91	1.6	–	0.51 ± 0.05	0.14
(V) [12]	710	2.91	0.7	$1.63 \pm 0.02^{**}$	0.73 ± 0.06	0.6
(VI) [11]	708	3.44	1.6	$2.3 \pm 0.1^{**}$	0.60 ± 0.08	0.7
(VII) [11]	708	3.0	1.6	$1.5 \pm 0.1^{**}$	0.65 ± 0.06	0.4
(IX)	742	3.7	1.3	0.27 ± 0.01	0.53 ± 0.06	0.5
(X)	742	2.62	0.9	0.27 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.06
(XI)	720	3.06	1.7	1.5 ± 0.1	0.53 ± 0.03	0.4
(XII)	742	2.75	0.35	–	–	–
(XIII)	734	2.8	0.3	–	–	–
(XIV)	744	2.5	0.2	–	–	–
(XV)	710	3.03	0.7	2.6 ± 0.1	0.63 ± 0.03	0.25

* λ_Q – максимум Q -полосы поглощения ЦИХЛ в 1% CrEL; ϵ – молярный коэффициент поглощения при длине волны λ_Q ; P – концентрация насыщенного раствора в 10% CrEL, Φ – квантовый выход генерирования синглетного кислорода в 0.1% CrEL (для соединений (IX)–(XI) – 1% CrEL) при pH 7.3; Φ_{pb} – квантовый выход фотовыгорания; $V_{отн}$ – относительная эффективность фотоиндуцированного генерирования $O_2^{\cdot-}$ в 1% CrEL (32°C, pH 7.3), за единицу принята эффективность генерирования $O_2^{\cdot-}$ соединением (I).

** Эти и все остальные специально не оговоренные данные получены в настоящей работе.

понентами эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и внутриклеточная локализация ЦИХЛ. Установлены значительные отличия в профилях взаимодействия ЦИХЛ с компонентами плазмы крови человека и ЭТС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Растворимость, спектры поглощения и флуоресценции ЦИХЛ. Соединения (IX)–(XV) гидрофобны. В табл. 1 указана растворимость соединений (IX)–(XV) в 10% эмульсии CrEL, то есть максимальная концентрация, при которой в течение недели в растворах не наблюдалось образования осадка. Не обнаружено изменения спектров поглощения растворов соединений (XI)–(XV) и (IX) при хранении их в темноте при +4°C в течение 6 месяцев. Соединение (X) менее стабильно: при хранении раствора в течение месяца (+4°C) наблюдалось уменьшение интенсивности полосы поглощения 740 нм на 40% и появление полосы поглощения 710 нм, соответствующей новому продукту, с максимумом флуоресценции 715 нм (не показано). Разложение усиливалось под действием света и при комнатной температуре, поэтому в исследованиях мы использовали только свежеприготовленные растворы соединения (X). Таким образом, варьируя заместители R¹, R² и R³ в ФС, наряду с другими характеристиками необ-

ходимо учитывать влияние этих заместителей на стабильность молекулы.

Как и предполагалось, замена винильной группы в положении 3 макроцикла на электроноакцепторные заместители вызывает bathochromный сдвиг в спектрах флуоресценции и длинноволнового поглощения: 10 для соединения (XI), 24 для соединения (XIII), 34 для соединения (XIV), 32 нм для соединений (IX), (X) и (XII) по сравнению, например, со спектром соединения (XV) (рис. 1, табл. 1). Отметим, что спектры соединений (XV) и (I), отличающихся только гидроксильной группой в положении 18 (R⁴), совпадали.

Фотостабильность. Фотостабильность исследована для соединений (IX)–(XI), обладающих высокой фототоксичностью в отношении клеток в культуре (смотри ниже), в сравнении с ранее синтезированными соединениями (V)–(VII) и (I). Линейные зависимости количества разрушенных молекул от числа поглощенных квантов (рис. 2) позволили рассчитать величины Φ_{pb} (табл. 1), которые свидетельствуют о высокой фотостабильности ЦИХЛ. Для всех исследованных соединений, за исключением соединений (IX) и (X), Φ_{pb} близки по величине. Введение формильной R¹-группы увеличило фотостабильность соединений (IX) и (X) в восемь раз (табл. 1) по сравнению с соединением (I).

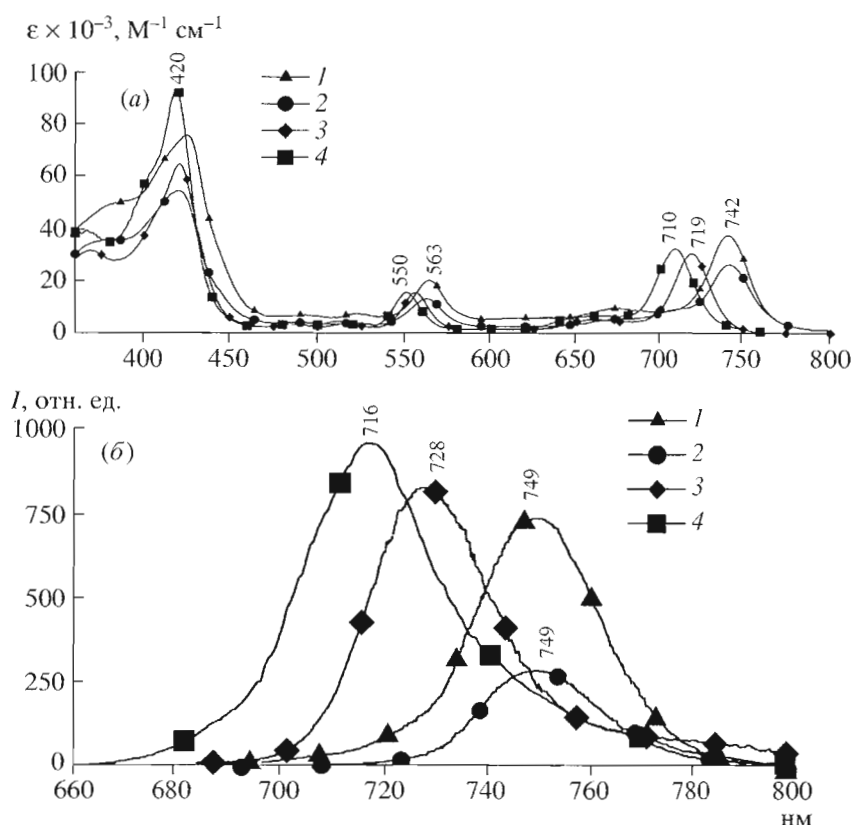


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и испускания флуоресценции (б) соединений (IX) (1), (X) (2), (XI) (3) и (XV) (4) в 1% CrEL (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.3).

Длина волны возбуждения флуоресценции – 532 нм.

При фотодеградациии соединений (VI), (VII), (X) и (XV) в спектрах поглощения появляется полоса фотопродукта с максимумом для соединения (X) 709 и для соединений (VI), (VII) и (XV) 647 нм. Отметим, что в процессе облучения этих соединений концентрация продукта фотодеградациии возрастает и достигает насыщения (рис. 3), что, по-видимому, указывает на установление равновесия между образованием фотопродукта и его дальнейшей фотодеградациией.

Отметим, что фотостабильность ЦИХЛ зависит от микроокружения. Так нами показано, что фоторазрушение соединения (I) в 1% CrEL происходит в 30 раз быстрее, чем в лецитиновых липосомах, и в 2 раза медленнее, чем в DMPC-липосомах (данные не приводятся). Зависимости количества разрушенных под действием света молекул ЦИХЛ от количества поглощенных квантов в 1% CrEL при pH 6.3 и 7.3 для всех соединений, кроме (VI), совпадали.

Высокая фотостабильность ЦИХЛ и, в особенности, соединений (IX) и (X) (табл. 1), является еще одним важным свойством для их успешного применения в качестве ФС для ФДТ рака.

Генерирование синглетного кислорода и гидроксильных радикалов. Проведенные исследова-

ния показали, что соединения (IX)–(XI) и (XV) в мономерном состоянии в липидоподобном окружении способны под действием света эффективно продуцировать синглетный кислород (табл. 1), но не гидроксильные радикалы. Лежащая в основе определения синглетного кислорода в данном исследовании реакция обесцвечивания 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилина в присутствии гистидина [15] полностью подавлялась азидом натрия, известным тушителем синглетного кислорода. Следовательно, именно синглетный кислород инициировал данную реакцию. В агрегированном состоянии в водных растворах соединения (IX)–(XI) и (XV) синглетный кислород не генерировали. Сравнение значений ϕ для ЦИХЛ (табл. 1) с учетом $\phi = 0.8$ для хлорина р6 в воде и $\phi = 0.44$ в растворе CrEL [12] показывает, что величина ϕ не зависит от положения Q-полосы поглощения производных хлорина р6 в диапазоне 665–742 нм, но значительно снижается для соединений с определенной комбинацией заместителей R^1 , R^2 и R^3 , например, для соединений (III) и (X) (табл. 1).

Генерирование супероксид-ионов. При облучении растворов ЦИХЛ в CrEL в присутствии NBT нами обнаружена линейная зависимость изменения оптического поглощения растворов при 540 нм от времени облучения (рис. 4), указываю-

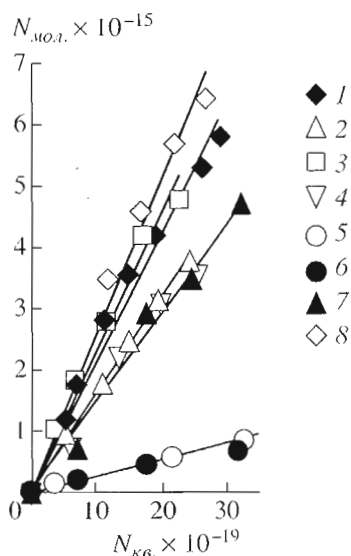


Рис. 2. Зависимость количества разрушенных под действием света молекул (I) (1), (V) (2), (VI) (3), (VII) (4), (IX) (5), (X) (6), (XI) (7) и (XV) (8) от количества поглощенных квантов в 1% CrEL (50 мМ, натрий-фосфатный буфер, pH 7.3).

щая на восстановление NBT до моноформаза [16, 17]. Эта реакция не протекает в темноте и при облучении раствора CrEL без ЦИХЛ. Фермент супероксиддисмутаза (300 ед. акт./мл) полностью ингибировала образование моноформаза. На образование моноформаза не влиял азид натрия при концентрациях 10–30 мМ, полностью подавляющих генерирование синглетного кислорода. При увеличении концентрации CrEL с 0.06 до 1% в присутствии соединения (I) скорость реакции восстановления NBT возрастала в 8 раз (не показано). При облучении растворов ЦИХЛ в лейцитиновых и DMPC-липосомах в присутствии NBT восстановления последнего не наблюдалось (не иллюстрировано).

Совокупность полученных данных позволяет сделать следующие выводы: (1) в присутствии CrEL происходит светоиндуцированное ЦИХЛ-опосредованное образование супероксид-ионов $O_2^{\cdot-}$; (2) концентрация CrEL является фактором, лимитирующим скорость генерирования $O_2^{\cdot-}$; (3) синглетный кислород не участвует в процессах образования $O_2^{\cdot-}$. Можно предположить, что в подходящем клеточном микроокружении помимо генерирования синглетного кислорода ЦИХЛ могут образовывать $O_2^{\cdot-}$. Заместители заметно влияют на способность ЦИХЛ генерировать $O_2^{\cdot-}$ (табл. 1), однако проследить четкие закономерности между структурой заместителей и образованием $O_2^{\cdot-}$ довольно сложно. Отметим, что введение электроноакцеп-

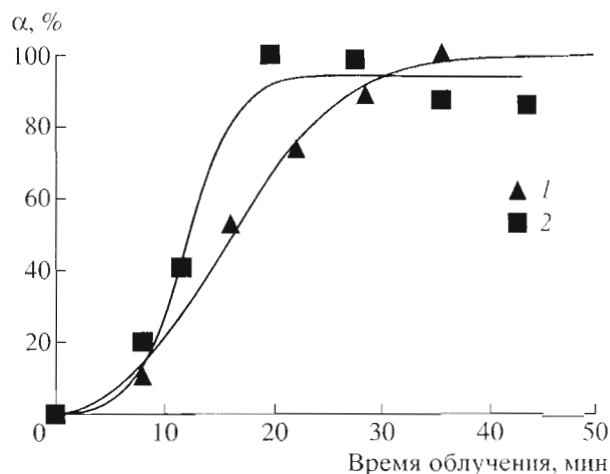


Рис. 3. Зависимость относительной концентрации продукта фотодеградации соединений (X) (1) и (XV) (2) в 1% CrEL (pH 7.3) от времени облучения растворов (514.5 нм, 0.26 Вт/см²). За 100% принята максимальная концентрация фотопродукта в растворе.

торного R¹-заместителя во всех исследованных случаях снижало эффективность образования $O_2^{\cdot-}$.

Связывание ЦИХЛ с компонентами ЭТС и плазмы крови человека. При электрофорезе цельной плазмы крови человека и ЭТС белки с молекулярной массой <100 кДа образуют мощную фронтальную полосу (рис. 5), а белки с большей молекулярной массой проявляются в виде более слабых полос различной плотности практически по всей длине пробега. Молекулярной массой <100 кДа обладают до 88% всех транспортных белков плазмы и доминирующим среди них является альбумин. Фронтальная зона содержит альбумин, α - и β -гло-

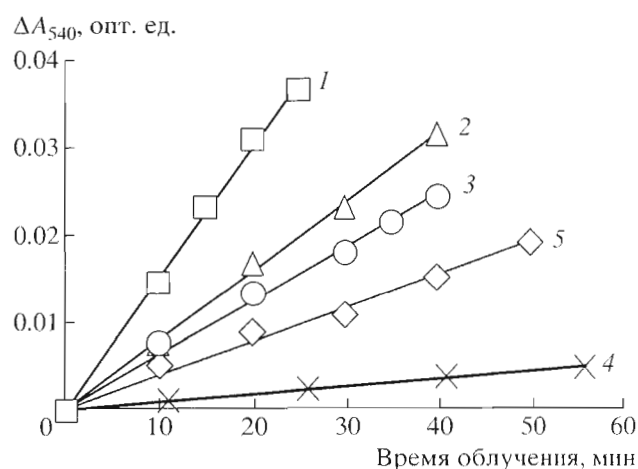


Рис. 4. Зависимость от времени изменения поглощения NBT при длине волны 540 нм в результате светоиндуцированного образования $O_2^{\cdot-}$ при облучении растворов соединений (I) (1), (IX) (2), (X) (3), (XI) (4), (XV) (5) в 1% CrEL.

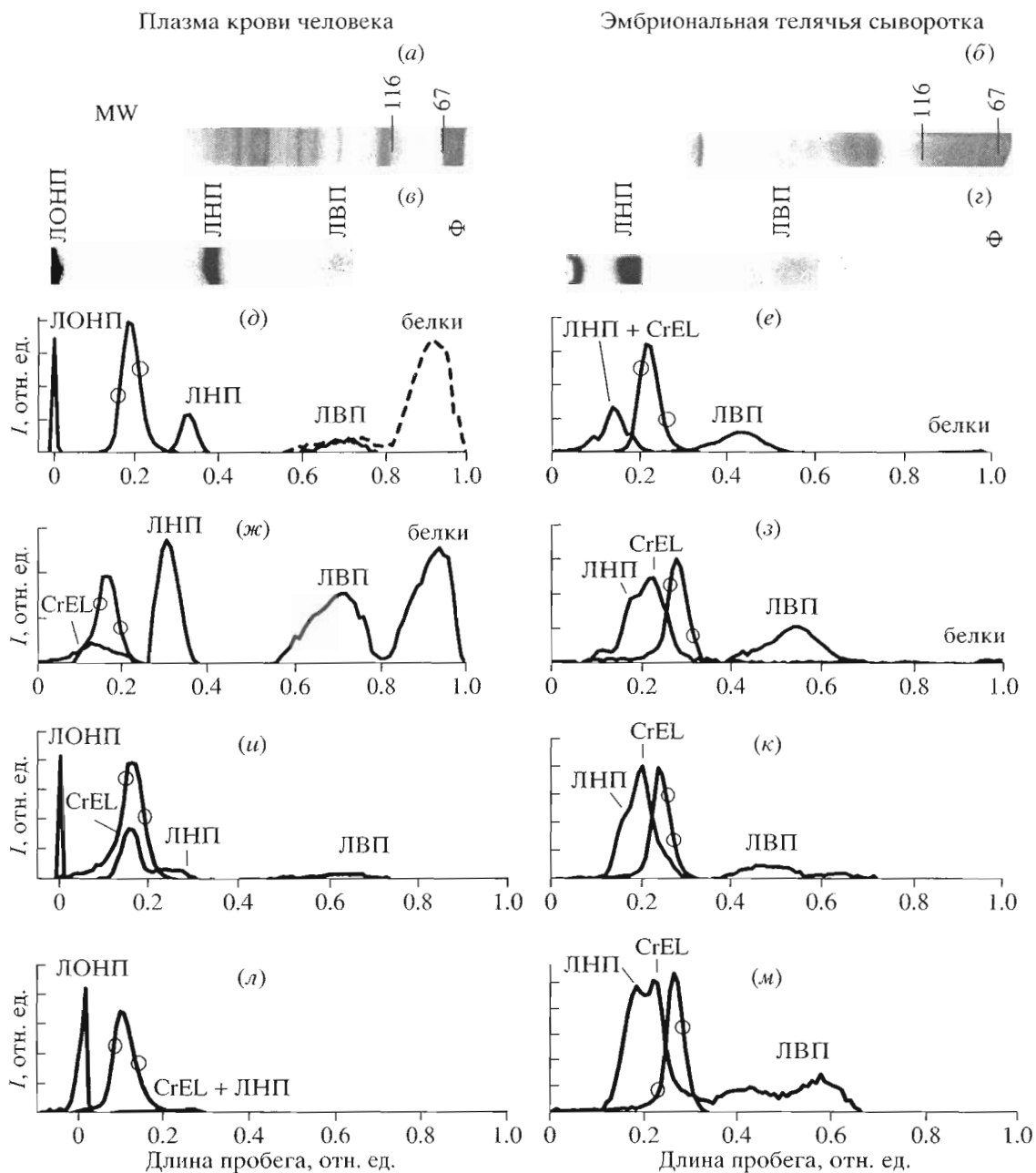


Рис. 5. Связывание ЦИХЛ с компонентами плазмы крови человека и ЭТС. Представлено: распределение белков, окрашенных Кумасси R-250, при электрофорезе 12.5% плазмы крови (а) и ЭТС (б); липопротеинов, окрашенных суданом черным В, при электрофорезе цельной плазмы крови (в) и ЭТС (г); распределение интенсивности флуоресцентного сигнала соединений (I) (д, е), (XI) (ж, з), (IV) (и, к), (V) (л, м) в геле в сопоставлении с соответствующим расположением липопротеинов и белков.

Профиль собственной электрофоретической подвижности ЦИХЛ в 0.02% CrEL представлен линией, отмеченной кружками. Пунктирная линия на диаграмме (д) соответствует профилю распределения доли соединения (I), связанной с белками, а сплошная линия – доли соединения (I), связанной с липидами. ЛОНП, ЛНП и ЛВП – липопротеины очень низкой плотности, низкой плотности и высокой плотности, Ф – фронтальная зона.

булины. Как известно [18], липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП) практически не входят в гель, липопротеины низкой плотности (ЛНП) и высокой плотности (ЛВП) мигрируют на значительные расстояния, определяемые их размерами и электрофоретической подвижностью (рис. 5). В присутствии 0.02% CrEL электрофоретическая

подвижность липопротеинов и белков не меняется. Полоса ЦИХЛ, связанных с CrEL, детектируется в относительно узкой области в первой трети полосы пробега.

ЦИХЛ связываются с компонентами ЭТС или плазмы и при электрофорезе перемещаются в со-

Таблица 2. Относительное распределение ЦИХЛ ($K_{эф}$, %) между компонентами плазмы крови человека и ЭТС по результатам электрофореза в градиентном 2–16% ПААГ

ФС	Плазма крови человека					ЭТС			
	CrEL	ЛОНП	ЛНП	ЛВП	белки	CrEL	ЛНП	ЛВП	белки
(I)	0	15 ± 1	5 ± 1	20 ± 4	60 ± 4	10 ± 2	43 ± 3	44 ± 1	3 ± 1
(II)	0	24 ± 2	13 ± 1	6 ± 1	57 ± 3	16 ± 2	47 ± 5	31 ± 1	6 ± 1
(III)	40 ± 4	3 ± 1	22 ± 2	13 ± 1	22 ± 2	51 ± 5	16 ± 6	33 ± 1	0
(IV)	47 ± 7	20 ± 5	16 ± 1	17 ± 5	0	60 ± 10	14 ± 1	26 ± 4	0
(V)	12 ± 1	78 ± 8	8 ± 1	2 ± 1	0	32 ± 6	44 ± 1	24 ± 1	0
(VI)	12 ± 2	0	18 ± 3	5 ± 1	65 ± 3	0	71 ± 5	21 ± 1	8 ± 1
(VII)	0	5 ± 1	25 ± 2	0	70 ± 4	9 ± 3	67 ± 3	16 ± 2	8 ± 1
(IX)	0	6 ± 1	0	14 ± 1	80 ± 4	0	27 ± 3	63 ± 3	10 ± 2
(X)	9 ± 1	30 ± 2	7 ± 1	40 ± 4	14 ± 1	40 ± 5	13 ± 5	47 ± 6	0
(XI)	6 ± 1	0	24 ± 2	31 ± 4	39 ± 2	32 ± 5	22 ± 2	44 ± 6	2 ± 1
(XV)	0	24 ± 4	11 ± 4	2 ± 1	63 ± 4	10 ± 5	65 ± 1	25 ± 1	0

ставе комплексов (рис. 5). С использованием соединения (I) установлено, что распределение ЦИХЛ между компонентами плазмы формируется уже через 10 мин и не меняется в течение 1 ч инкубации. В зависимости от введенных заместителей, ЦИХЛ в плазме могут быть ассоциированы как с белками, так и с липопротеинами (рис. 5, табл. 2). Анализ показывает, что отрицательно заряженные карбоксилсодержащие ЦИХЛ, за исключением соединения (III), преимущественно (57–80%) связаны с транспортными белками массой <100 кДа, и в меньшей степени – с липопротеинами (табл. 2). Соединение (III) отличается повышенной способностью к ассоциации с CrEL (табл. 2). Нейтральные метиловые эфиры (IV) и (V) не связываются с белками. Соединение (V) преимущественно ассоциировано с ЛОНП, а соединение (IV) в значительной мере (47%) остается связанным с CrEL. Электроноакцепторная группа R^1 в соединениях (X) и (XI) приводит к умеренному связыванию этих нейтральных соединений с белками.

В 100% ЭТС, в отличие от плазмы крови человека, даже для отрицательно заряженных ЦИХЛ характерно лишь слабое связывание с белками массой <100 кДа (рис. 5, табл. 2). Это можно объяснить на основании проведенных нами дополнительных экспериментов в растворах, показавших, что способность к образованию комплексов отрицательно заряженных ЦИХЛ с человеческим сывороточным альбумином в 6–10 раз выше, чем с бычьим сывороточным альбумином. При инкубации с ЭТС соединения (III)–(V), (X) и (XI) в значительной степени остаются связанными с CrEL (табл. 2). В 10% ЭТС для всех ЦИХЛ преобладает CrEL-ассоциированная форма (>60%, данные не показаны).

Анализ спектров флуоресценции, записанных при измерении профилей распределения ЦИХЛ в геле, подтверждает описанный выше характер связывания с компонентами плазмы и ЭТС. Так, ЦИХЛ, связанные во фронтальной полосе белка, характеризовались спектрами флуоресценции с максимумами, сдвинутыми в красную область на 5–10 нм по сравнению со спектрами ЦИХЛ в CrEL. Согласно модельным экспериментам, в том числе и проведенным ранее [12, 14], такой сдвиг характерен для ЦИХЛ, связанных с белками. В остальной части профилей не обнаружено (даже при разложении спектров на компоненты) спектральных сигналов, соответствующих комплексам ЦИХЛ с белками.

Спектры флуоресценции в CrEL большинства отрицательно заряженных ЦИХЛ в комплексах с липидами и липопротеинами совпадают. В то же время для соединений (V), (VI), (X) и (XI) при связывании с липопротеинами максимум спектра флуоресценции сдвигается на несколько нанометров в голубую область по сравнению со спектром в CrEL. Это позволяет при анализе гелей по спектрам флуоресценции надежно идентифицировать комплексы ЦИХЛ с CrEL, липопротеинами и белками.

Отметим, что появление дополнительной ОН-группы в составе соединения (XV) не меняет характера связывания с компонентами плазмы и ЭТС по сравнению с соединением (I) (табл. 2). Парное сравнение данных для соединений (I) и (IX), (V) и (X) показывает, что введение электроноакцепторного заместителя R^1 также не вызывает принципиальных изменений в связывании ЦИХЛ в плазме и ЭТС (табл. 2).

Итак, в 100% ЭТС исследованные ЦИХЛ начинают эффективно взаимодействовать с липо-

Таблица 3. Клеточные свойства ЦИХЛ*

ЦИХЛ [источник]	ИК ₉₀ , нМ			Локализация в клетке**	K	T _{up} , мин	T _{ef} , мин
	2 ч		4 ч				
	-	+					
(I) [3]	220 ± 30	180 ± 20	220 ± 30	АГ, ЭР	5.5 ± 0.4	30 ± 5	60 ± 10
(II) [11]	300 ± 40	260 ± 30	300 ± 40	АГ, ЭР	5.2 ± 0.4	5 ± 2	57 ± 8
(III) [11]	520 ± 40	500 ± 50	520 ± 40	АГ, ЭР	2.5 ± 0.2	7 ± 2	61 ± 11
(IV) [11]	70 ± 10	70 ± 10	65 ± 8	АГ, ЭР	10 ± 1	87 ± 11	330 ± 70
(V) [11]	150 ± 10	140 ± 10	150 ± 10	ЛК	6 ± 1	41 ± 7	217 ± 24
(VI) [10]	230 ± 20	230 ± 20	220 ± 25	ЛК, АГ, ЭР	11 ± 1	30 ± 6	17 ± 4
(VII) [10]	240 ± 20	240 ± 20	200 ± 30	АГ, ЭР	8 ± 1	24 ± 12	50 ± 10
(IX)	330 ± 30	180 ± 50	420 ± 20	АГ, ЭР	5.0 ± 0.4	10 ± 5	7 ± 1
(X)	195 ± 10	180 ± 10	170 ± 30	ЛК	5.4 ± 0.4	60 ± 5	30 ± 10
(XI)	110 ± 20	110 ± 20	120 ± 21	ЛК	10 ± 0.5	90 ± 10	40 ± 8
(XII)	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	нп	-	-	-
(XIII)	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	нп	-	-	-
(XIV)	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	нп	-	-	-
(XV)	220 ± 30	180 ± 20	220 ± 30	АГ, ЭР	3.8 ± 0.4	30 ± 5	60 ± 10

* ИК₉₀ – концентрация, соответствующая 90% уровню фототоксичности; (-) – ЦИХЛ удален из среды перед облучением; (+) – ЦИХЛ присутствует в среде во время облучения; K – максимальное значение коэффициента накопления (максимальное отношение внутриклеточной концентрации к концентрации в среде); T_{up} – время полунакопления (50% от уровня K) соединения в клетках; T_{ef} – время полувыведения соединения из клеток; прочерк – данные не получены.

** АГ – аппарат Гольджи; ЛК – липидные капли; ЭР – эндоплазматический ретикулум; нп – в клетки не проникает.

протеинами, а в плазме крови человека отрицательно заряженные ЦИХЛ (I), (II), (VI), (VII), (IX) и (XV) интенсивно связываются с белками (рис. 5, табл. 2). Это согласуется с молекулярными исследованиями в растворах белков, показавшими, что отрицательно заряженные ЦИХЛ, в отличие от нейтральных, легко образуют комплексы с человеческим сывороточным альбумином и α-глобулинами [12, 14]. Интересно, что в составе ЭТС почти нет белков, образующих комплексы с ЦИХЛ (рис. 5, табл. 2). В отличие от ЭТС в плазме крови присутствуют липопротеины очень низкой плотности, которые эффективно связывают нейтральные ЦИХЛ (рис. 5, табл. 2). В итоге, практически все ЦИХЛ переходят из CrEL-ассоциированного состояния в состав комплексов с компонентами плазмы. В настоящее время нами проводятся исследования по изучению распределения ЦИХЛ в структурах тканей животных, что позволит прояснить взаимосвязи между распределением ЦИХЛ в плазме и особенностями накопления ЦИХЛ в опухолях и окружающих тканях.

Фототоксичность и темновая токсичность ЦИХЛ в отношении клеток A549. Облучение красным светом клеток A549 аденокарциномы легкого человека после инкубации их с соединениями (IX)–(XI) и (XV) вызывает концентрационнозависимую гибель клеток. Соединения (XII)–(XIV) ни

при каких режимах инкубации фототоксического эффекта не оказывают. Фототоксичность уменьшается в ряду соединений (XI) > (X) > (XV) > (IX) (табл. 3). Без светового воздействия соединения (IX)–(XV) не оказывают цитотоксического действия на клетки. Для всех активных ЦИХЛ, кроме соединения (IX), фототоксичность практически не снижалась при удалении ФС из внешней среды перед облучением. Следовательно, воздействие обусловлено ФС, накапливающимся внутри клеток, а АФК, образующиеся во внешней среде, оказывают незначительный повреждающий эффект. Удаление соединения (IX) из среды вызвало снижение фототоксичности в 1.8 раз. Увеличение времени инкубации клеток с соединениями (X), (XI) и (XV) от 2 до 4 ч не приводило к заметному возрастанию фототоксичности (табл. 3). А увеличение времени инкубации клеток с соединением (IX) от 2 до 4 ч приводило к снижению фототоксичности на 30%.

Исследование соединений (IX)–(XIV) показало, что, оптимизировав структуру заместителей в циклах D и E и вводя электроноакцепторные заместители вместо 3-винильной группы, возможно создание ЦИХЛ, поглощающих в области 740 нм и обладающих очень высокой фотодинамической активностью *in vitro*. Примером таких ЦИХЛ являются соединения (IX) и (X) (табл. 1, 3). Фото-

токсичность соединений (IX) и (X) в клетках A549 значительно выше, чем фототоксичность хлорина р6 (ИК₉₀ 4.8 мкМ [19]) и применяемого в клинике препарата Фотогем (ИК₉₀ 24 мкМ, [19]). Соединение (XI) также является высокоактивным ФС, но группа $-\text{CH}=\text{NOH}$ в 3-м положении цикла обеспечивает не очень большой длинноволновый сдвиг поглощения по сравнению с ЦИХЛ, содержащими 3-формильную группу (табл. 1). Введение электроноакцепторной группы резко ухудшило фототоксичность соединений (XII)–(XIV), хотя исходные производные с 3-винильной группой были очень активными ФС (табл. 1, 3). В этих соединениях комбинации заместителей R¹, R² и R³ оказались неудачными, усилили тенденцию к самоассоциации молекул, что привело к снижению растворимости и способности к проникновению в раковые клетки.

Особенности внутриклеточного накопления и локализации ЦИХЛ. Исследования методом конфокальной микроскопии и реконструкции спектральных изображений (КОМИРСИ) показали, что соединения (IX)–(XI) и (XV) эффективно проникают в клетки A549 и накапливаются в цитоплазме в мономерной флуоресцирующей форме (рис. 6). В ядрах живых клеток эти соединения не обнаружены. Исследования, проведенные для соединений (XII)–(XIV) в широком диапазоне концентраций и времен инкубации, не выявили проникновения данных соединений внутрь клеток.

Для соединений (X) и (XI) в клетках обнаружено интенсивное накопление в гранулах диаметром 0.5–0.8 мкм и более слабое диффузное распределение с концентрированием в околоядерной области. Такое же распределение характерно для соединения (V) [14], а в случае соединения (VI) гранулярное распределение наблюдалось наряду с интенсивным околоядерным накоплением в аппарате Гольджи [13]. С помощью нильского красного эти гранулы идентифицированы как липидные капли [13, 14], клеточные органеллы, отвечающие за хранение и метаболизм нейтральных липидов и стеринных эфиров [20]. Липидные капли являются светоконтрастными структурами и визуально распознаются на изображениях клеток в проходящем белом свете как темные зерна в цитоплазме (рис. 6в, д). Именно в этих структурах происходит накопление соединений (X) и (XI) (рис. 6в–е). С использованием акридина оранжевого, выявляющего лизосомы, и трансферрина, меченного тexasским красным, выявляющего эндосомы, показано, что среди везикул, содержащих соединения (X) и (XI), нет ни лизосом, ни эндосом (данные не показаны). Из сравнения соединений (X), (XI) и (V) следует, что введение электроноакцепторного заместителя в кольцо А ЦИХЛ не влияет на изменение внутриклеточной локализации нейтрального ЦИХЛ с гидрофобным заместителем в имидном цикле.

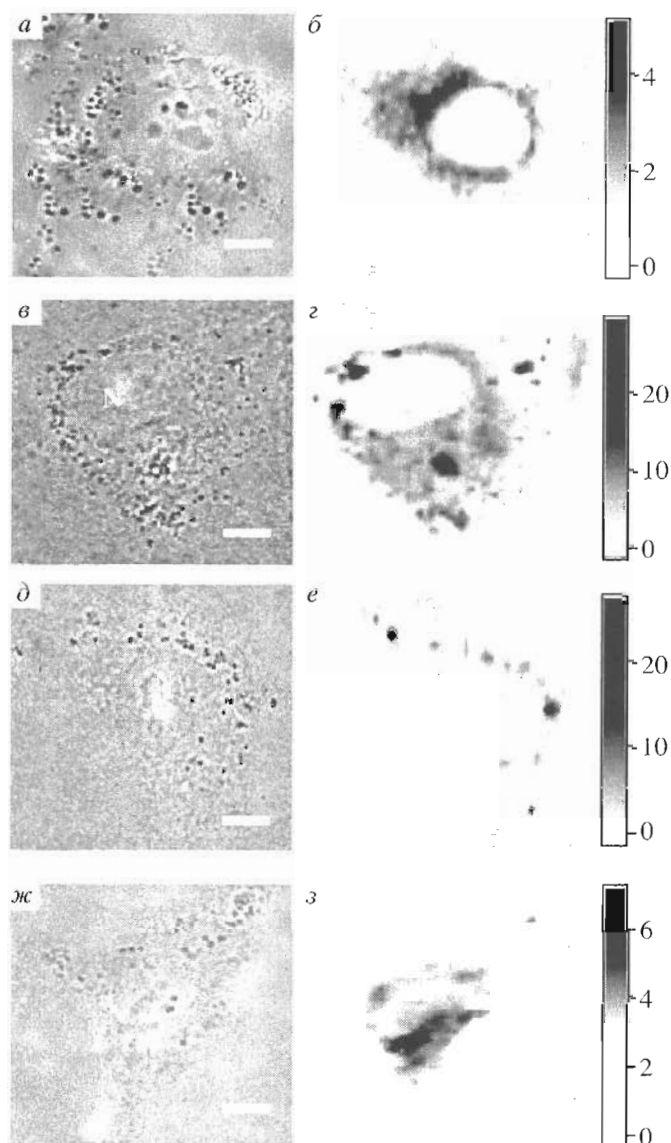


Рис. 6. Внутриклеточное распределение соединений (IX) (а, б), (X) (в, г), (XI) (д, е) и (XV) (ж, з). Клетки инкубировали с ЦИХЛ (1 мкМ) в течение 3 ч. (а, в, д, ж) – микрофотографии клеток. Метка соответствует 10 мкм. N – ядро. (б, г, е, з) – внутриклеточные распределения ЦИХЛ. Шкалы интенсивности отражают концентрацию в мкМ.

Соединения (IX) и (XV) диффузно распределяются в клетке с преимущественной локализацией вблизи ядра. Такое внутриклеточное распределение типично для соединений (II)–(IV), (VII) и наиболее близкого по структуре соединения (I) [12–14]. Как и в случае соединений (I)–(IV), (VII) [12–14], околоядерная локализация соединений (IX) и (XV) связана с накоплением соединений в аппарате Гольджи (данные не показаны). Таким образом, из сравнения соединений (IX), (XV) и (I) следует, что ни электроноакцепторный заместитель в кольце А, ни гидроксильная группа в кольце D не изменяют внутриклеточной локализации отрица-

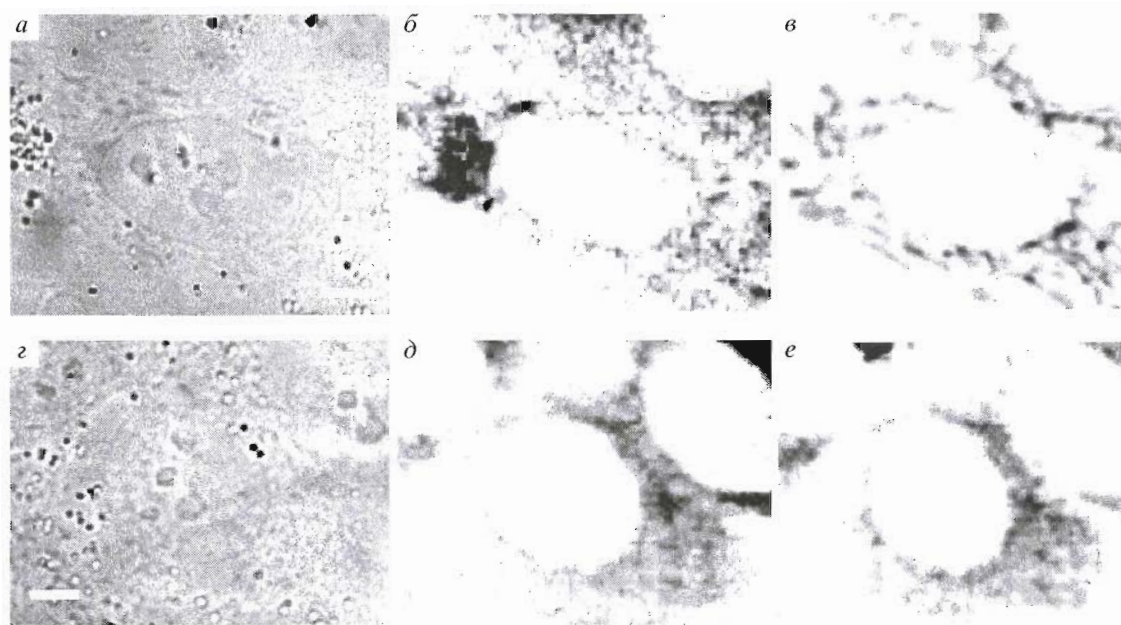


Рис. 7. Анализ внутриклеточной локализации соединения (I) в живых клетках A549 с использованием родамина 6Ж, избирательно накапливающегося в активных митохондриях (в) или окрашивающего эндоплазматический ретикулум (е), когда активность митохондрий подавлена. (а, з) – микрофотографии клетки (метка – 5 мкм). N – ядро. Распределение в клетках соединения (I) (б, д) и родамина 6Ж (в, е). Черный цвет на спектральных изображениях (б, д, в, е) соответствует наибольшей интенсивности сигнала.

тельно заряженного ЦИХЛ с *N*-гидроксипропильным заместителем в имидном цикле.

До настоящего времени клеточные структуры, которые определяют диффузное распределение ЦИХЛ, не были идентифицированы. Из литературы известно [21], что в ряде случаев накопление биологических молекул в аппарате Гольджи сопровождается их локализацией в эндоплазматическом ретикулуме. Мы использовали родамин 6Ж для выявления ЭР при пониженной активности митохондрий и на примере соединения (I) обнаружили высокую степень солокализации диффузно распределенного соединения (I) и сети ЭР, окрашенной родамином 6Ж (рис. 7). Средние по выборке клеток коэффициенты S_{lab} и S_{PS} [13, 14], характеризующие степень солокализации, равны 0.7 ± 0.1 (рис. 7), что подтверждает связывание соединения (I) с эндоплазматическим ретикулумом. Контрольный эксперимент, в котором активные митохондрии были селективно окрашены родамином 6Ж, выявил неспецифическое перекрывание диффузного сигнала ЦИХЛ и областей локализации нитевидных митохондрий (рис. 7), что подтверждается низкими коэффициентами S_{lab} и S_{PS} , равными 0.35 ± 0.04 и 0.24 ± 0.04 соответственно. Эти эксперименты свидетельствуют, что диффузное распределение ЦИХЛ в цитоплазме клеток определяется связыванием с ЭР, а специфического накопления ЦИХЛ в митохондриях не происходит.

Детальный спектральный анализ показал, что внутриклеточные спектры флуоресценции соединений (IX) и (XV), а также спектры соединений (X) и (XI) вне липидных капель полностью совпадают с соответствующими спектрами в водной эмульсии 1–5% CrEL и в лецитиновых липосомах. Это позволяет заключить, что диффузно распределенные соединения (IX)–(XI) и (XV) находятся в клетках преимущественно в мембраносвязанном состоянии. В липидных каплях спектры флуоресценции соединений (X) и (XI) несколько сдвинуты в коротковолновую область по отношению к соответствующим спектрам в эмульсии CrEL. Так, вне липидных капель спектры флуоресценции соединений (X) и (XI) имеют максимумы 749 и 726 нм, а в липидных каплях – 745 и 722 нм соответственно. Спектры соединений (X) и (XI) в липидных каплях совпадают со спектрами этих соединений, связанных с липопротеинами. Таким образом, отличия внутриклеточных спектров, скорее всего, вызваны различным микроокружением хромофора. Параметры микроокружения соединений (X) и (XI) в липидных каплях больше соответствуют микроокружению в частицах липопротеинов, чем в лецитиновых липосомах.

Описанное выше внутриклеточное распределение соединений (IX)–(XI) и (XV) (рис. 6, 7) формируется за 10–15 мин и при увеличении времени инкубации меняется только количественно. Для отрицательно заряженных соединений (IX) и (XV) характерна очень высокая скорость накопления.

ления в клетках, оцениваемая по времени полунакопления T_{up} (табл. 3), с выходом цитоплазматической концентрации на плато уже через 1 ч инкубации. Скорость клеточного накопления нейтральных соединений (X) и (XI) в несколько раз меньше, чем у отрицательно заряженных соединений, и цитоплазматическая концентрация достигает насыщения через 2–3 ч инкубации (рис. 8, табл. 3).

Среди соединений (IX)–(XI) и (XV) у соединения (XI) оказался самый высокий коэффициент накопления в клетках (табл. 3). Детальный анализ показал, что концентрация соединения (XI) в липидных каплях достигает насыщения через 1 ч инкубации клеток, и дальнейшее внутриклеточное накопление происходит за счет роста концентрации диффузно распределенного соединения. Среди указанных соединений быстрее всех из клеток A549 выводится соединение (IX), а медленнее всех – соединение (XV), и отличия в кинетике выведения значительные (рис. 8, табл. 3). Отметим, что из липидных капель соединение (XI) выводится намного быстрее, чем из других цитоплазматических структур.

При увеличении концентрации соединений (IX) и (X) во внешней среде от 0.5 до 10 мкМ цитоплазматическая концентрация возрастает практически линейно. Для соединений (XI) и (XV) значительное отклонение от линейной зависимости за счет насыщения накопления наблюдалось уже при концентрации соединений во внешней среде, равной 5 мкМ (данные не показаны). Отметим, что при больших концентрациях в среде концентрация соединения (XI) в липидных каплях не меняется, а растет только концентрация диффузно распределенного соединения.

Попытка усилить полярность соединения (I) за счет введения 18-гидроксигруппы (соединение (XV)) вызвала снижение растворимости в CгEL и накопления в клетках при сохранении величины ϕ , клеточной локализации и фототоксичности (табл. 1, 3). Из этого следует, что по сравнению с соединением (I) меньшая внутриклеточная концентрация соединения (XV) оказывает большее фотодинамическое воздействие на клетку.

Соединения (IX), (XV) и (X), (XI) различаются по внутриклеточной локализации (табл. 3). В то же время локализация не зависит от введенных в эти соединения электроноакцепторных заместителей в 3-м положении или 18-гидроксигруппы, а определяется, в первую очередь, полярностью (зарядом) *N*-циклоимидного заместителя и заряженным остатком пропионовой кислоты. Отрицательно заряженные ЦИХЛ преимущественно накапливаются в аппарате Гольджи и, как показано в данной работе, в ЭР. Митохондрии обнаруживаются в области накопления отрицательно заряженных ЦИХЛ, но интенсивного связывания последних в этих органоидах не зарегистрировано. Нейтральные ЦИХЛ с гидрофобными заместителями пре-

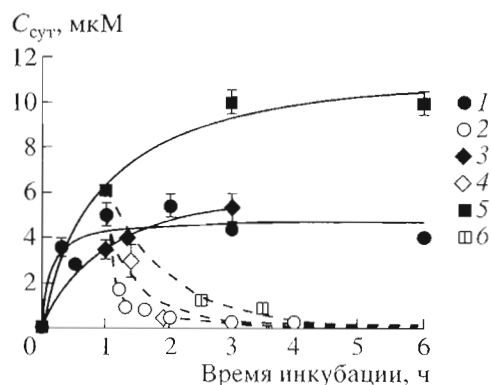


Рис. 8. Кинетика накопления (сплошные линии) соединений (IX) (1), (X) (3) и (XI) (5) и удерживания (пунктирные линии) соединений (IX) (2), (X) (4) и (XI) (6) в цитоплазме клеток A549. $C_{сут}$ – средняя цитоплазматическая концентрация ЦИХЛ.

имущественно концентрируются в липидных каплях (табл. 3). Ни для одного из изученных ЦИХЛ не наблюдалось накопления в лизосомах, эндосомах и на плазматической мембране клеток. Оба типа внутриклеточной локализации обеспечивают высокую фототоксичность (табл. 3).

Механизмы внутриклеточной сортировки очень чувствительны к структуре конкретных заместителей в ЦИХЛ. Так, соединения (IV) и (V) – нейтральные молекулы, немного отличающиеся по структуре *N*-циклоимидного заместителя, но соединение (IV) преимущественно накапливается в аппарате Гольджи, а соединение (V) – в липидных каплях [14]. Для отрицательно заряженного соединения (VI) обнаружено интенсивное накопление в липидных каплях, которое сопровождается накоплением в аппарате Гольджи и ЭР. При этом замена *N*-карбоксиметильного заместителя R^3 в соединении (VI) на *N*-карбоксиэтильный в соединении (VII) полностью устраняет накопление в липидных каплях [13]. Исследование соединений (VI) и (XI) показало, что при увеличении концентрации ЦИХЛ во внешней среде, может происходить насыщение связывания в одних органоидах (липидные капли) и усиление накопления в других (аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум).

Анализ связывания ЦИХЛ с компонентами ЭТС показал, что при инкубации клеток в присутствии 10% ЭТС соединения находятся преимущественно в CгEL-ассоциированном состоянии. По-видимому, первичное взаимодействие ЦИХЛ с клетками происходит в составе эмульсии CгEL. Таким образом, именно физико-химические свойства самих ЦИХЛ, а не их комплексов с компонентами ЭТС определяют внутриклеточную локализацию. На это указывают и наши данные о том, что клеточная локализация и уровень накопления не изменяются при инкубации клеток с ЦИХЛ в среде без ЭТС [12, 14].

Таким образом, правильный выбор заместителей обеспечивает дополнительный bathochромный сдвиг поглощения молекулы на 10–30 нм при сохранении высоких фотодинамических характеристик. Проведенные исследования выявили способы создания высокоактивных ЦИХЛ с поглощением в ближней ИК-области, управления их внутриклеточной локализацией и избирательно-го нацеливания этих ФС на определенные внутриклеточные мишени. Показано, что с помощью подходящих заместителей можно обеспечить распределенное фотодинамическое воздействие сразу на несколько клеточных структур-мишеней (соединение (VI) и (XI)). Таким образом, полученные результаты показывают, что, изменяя структуру ЦИХЛ, помимо внутриклеточной локализации можно влиять на уровень накопления в клетках, скорость клеточного накопления и выведения из клеток при сохранении их высокой фотодинамической активности. Это обеспечивает возможность выбора ФС со свойствами, оптимальными для ФДТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ЦИХЛ (I)–(XV) были синтезированы как описано ранее [9, 10]. Концентрированные растворы ЦИХЛ (0.5–2 мМ) готовили в 5–10% CrEL. Концентрации растворов определяли на основе молекулярных коэффициентов поглощения соединений (табл. 1), измеренных в 1% растворе CrEL (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.3).

В исследованиях использованы: акридин оранжевый и родамин 6Ж (ICN, США); Тритон X-100, L-гистидин, метиленовый синий, 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин, супероксид дисмутаза, NBT, лецитин из сои, DMPC и CrEL (Sigma, США); *N*-((4-(4,4-дифлуоро-5-(2-тионил)-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-3-ил)феноксил)ацетил)сфингозин и трансферрин, меченный тхасским красным (Molecular Probes Inc., США); бенгалский розовый, нильский красный, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-бифенилтетразольбромид и судан черный В (Диам, Россия).

Однослойные лецитиновые и DMPC-липосомы (диаметр 100 нм, концентрация 2 мг/мл) готовили из многослойных липосом методом экструзии через фильтр с диаметром пор 100 нм.

Измерение генерирования АФК. Определение квантовых выходов генерирования синглетного кислорода (ϕ) соединений (IX)–(XI) и (XV) проводилось спектрофотометрически по обесцвечиванию 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилина в присутствии гистидина в процессе облучения раствора, содержащего исследуемый ФС [15]. Реакция фотоиндуцированного обесцвечивания 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилина в присутствии ФС, но без гистидина использована для выявления способности изучаемых соединений образовывать гидроксильные радикалы $\cdot\text{OH}$. Методики проведения этих эксперимен-

тов и составы растворов описаны ранее [12–14]. Для подавления генерирования синглетного кислорода в раствор добавляли азид натрия в конечной концентрации 10 мМ.

Способность ЦИХЛ к фотоиндуцированному образованию $\text{O}_2^{\cdot-}$ исследовали с помощью NBT: $\text{O}_2^{\cdot-}$ восстанавливает NBT до моноформаза, поглощающего свет в области 540 нм [16, 17]. Насыщенный воздухом раствор (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.3), содержащий NBT (85 мкМ), ЦИХЛ (6–10 мкМ) и CrEL (0.001% или 1%) или липосомы (1 мМ), облучали He-Ne-лазером (532 нм, 1.2 мВт/см², 2 ч) и каждые 10–20 мин регистрировали спектр поглощения раствора.

Фотостабильность ЦИХЛ (I), (V)–(XI) и (XV) (10 мкМ) изучали в насыщенном воздухом 1% растворе CrEL при равномерном облучении раствором Ag⁺-лазером (514.5 нм, 0.26 Вт/см²). Фотодеградацию ЦИХЛ регистрировали по уменьшению поглощения в максимуме Q-полосы. Квантовый выход фотодеградации (ϕ_{pb}) определяли по тангенсу угла наклона графика зависимости количества фотодеградированных молекул (N_{mol}) от числа поглощенных квантов (N_{kg}).

$$N_{mol} = C_0 V N_A (1 - D/D_0), \quad (1)$$

$$N_{kg} = I \lambda t (1 - 10^{-D_\lambda}) / (hc), \quad (2)$$

где C_0 – молярная концентрация ЦИХЛ в растворе до облучения, V – объем облучаемого раствора, N_A – число Авогадро, D_0 и D – оптическое поглощение в максимуме Q-полосы ЦИХЛ до и после облучения, I – мощность света на образце, λ – длина волны облучающего света, D_λ – оптическая плотность раствора на длине волны λ в направлении распространения света, t – время облучения, c – скорость света, h – постоянная Планка

Чтобы установить роль синглетного кислорода в фотодеградации ЦИХЛ, в отдельном эксперименте в облучаемые растворы добавляли азид натрия в конечной концентрации 10 мМ в растворе.

Связывание ЦИХЛ (I)–(XI) и (XV) с компонентами плазмы крови человека и ЭТС исследовали методом градиентного электрофореза в полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях (400 В, 50 мА, 3.5 ч). Полиакриламидный гель готовили в 0.1 М Трис-глициновом буфере (pH 8.9) с градиентом 2–16% (толщина слоя 2 мм). Перед нанесением на гель ЦИХЛ (2 мкМ, 0.02% CrEL) инкубировали с плазмой крови человека или ЭТС при 37°C в течение 10 мин или 1 ч. Собственную электрофоретическую подвижность тестируемых веществ оценивали с использованием растворов ЦИХЛ (2 мкМ, 0.02% CrEL) в 0.1 М Трис-глициновом буфере (pH 8.9). Положение полос липопротеинов в геле выявляли с помощью судана черного В: перед нанесением на гель образцы

плазмы человека и ЭТС смешивали с насыщенным раствором судана черного В в 70% этаноле в объеменом соотношении 10 : 1 и инкубировали 1 ч при 37°C; возможное изменение электрофоретической подвижности липопротеинов в присутствии CrEL контролировали, добавив в инкубационную смесь 0.02% CrEL. Положения белковых полос на электрофореграммах плазмы крови и ЭТС выявляли, окрашивая гель 0.25% раствором Ку-масси R-250.

Эксперименты на культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549 проводили по описанным ранее методикам [12, 13]. При исследовании кинетики накопления клетки инкубировали с 3 мкМ соединений (IX), (X) или (XI). Удержание соединений оценивали, поместив клетки после инкубации с соединениями (IX), (X) или (XI) (1 ч) в свежую среду, не содержащую ЦИХЛ.

Условия экспериментов по изучению внутриклеточной локализации ЦИХЛ с применением зондов *N*-((4-(4,4-дифлуоро-5-(2-тионил)-4-бора-3,4а-диаза-*s*-индацен-3-ил)фенокси)ацетил)сфингозина, нильского красного и акридина оранжевого описаны ранее [11, 12]. В зависимости от условий инкубации родамин 6Ж был использован либо для избирательного окрашивания митохондрий, либо для окрашивания ЭР. Последнее стало возможным, так как выяснилось, что длительная инкубация клеток с большой концентрацией ЦИХЛ снижала потенциал митохондрий и тем самым блокировала преимущественное накопление родамина 6Ж в митохондриях, выявляя менее интенсивное окрашивание ЭР. При использовании родамина 6Ж в качестве зонда для ЭР клетки инкубировали 3 ч с 6 мкМ ЦИХЛ, а затем 10 мин с родамином 6Ж (12.5 нг/мл, 37°C). Для избирательного окрашивания митохондрий клетки инкубировали 1 ч с 3 мкМ ЦИХЛ и 15 мин с родамином 6Ж (6 нг/мл, 37°C).

Методики и условия облучения клеток через 2 или 4 ч инкубации с ЦИХЛ, определение темновой токсичности и фототоксичности с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-бифенилтетразолийбромида (МТТ-тест) и расчет концентрации, обеспечивающей гибель 90% клеток (ИК₉₀), описаны ранее [12–14].

Микроспектральные измерения. Исследование клеточного накопления, выведения и локализации ЦИХЛ проводили методом КОМИРСИ [7, 12–14]. В экспериментах по исследованию внутриклеточной локализации ЦИХЛ использовали конфокальный сканирующий микроспектрометр V-45 (Dilor, Франция). Для исследования клеточного накопления (выведения) соединений (IX)–(XI) и (XV), а также при измерении профилей распределения соединений (I)–(XI) и (XV) в электрофорезных гелях использовали экспериментальную установку для микроспектрального конфокального

анализа на основе спектрографа OMARS-89 (Dilor, Франция), микроскопа Olympus BH-2 (Япония) и предметного столика с электронной системой микропозиционирования (Marzhauser-Wetzlar, Германия) [13]. Условия микроспектральных измерений на клетках, разрешение приборов, процедуры измерения спектральных изображений и их обработки, а также методики расчета внутриклеточной концентрации и анализа кинетических кривых накопления и выведения описаны ранее [12–14]. Для соединения (X), содержащего минорную флуоресцирующую примесь, анализировалась только основная длинноволновая составляющая спектра флуоресценции.

Эксперименты по идентификации внутриклеточной локализации ФС с помощью метода КОМИРСИ проводили как описано ранее [12–14]. Степень совпадения внутриклеточной локализации исследуемого ФС и флуоресцентных зондов клеточных органелл оценивали с помощью коэффициентов S_{lab} и S_{PS} [13, 14]. Коэффициент S_{lab} характеризует отношение площади элементов изображения, в которых обнаружено совпадение сигналов, к общей площади изучаемых органелл на изображении. S_{PS} характеризует отношение площади изображения, где сигналы совпадают, к общей площади, соответствующей на изображении распределению изучаемого соединения. S_{lab} и S_{PS} меняются от 0 (отсутствие солокализации) до 1 (полная солокализация).

Измерение распределения ЦИХЛ в электрофореграммах выполняли с помощью установки для микроспектрального конфокального анализа. Флуоресценцию возбуждали He-Ne-лазером (Spectra Physics, США) с длиной волны 632.8 нм и мощностью на образце 85 мВт через 10-кратный объектив (Olympus, Япония). Профили сканировали от стартовой линии электрофореза вдоль направления движения образцов в геле с шагом 0.4 мм и усредняли по пяти измерениям в пределах центральной области каждой зоны с нанесенным образцом. Коэффициенты $K_{эф}$, характеризующие процентное распределение конкретного ЦИХЛ между компонентами плазмы крови и сыворотки, рассчитывали по формуле:

$$K_{эф} = I/I_{\Sigma} \times 100\%, \quad (3)$$

где I – интенсивность флуоресценции ЦИХЛ, интегральная по исследуемому участку профиля, I_{Σ} – интенсивность, интегральная по всему профилю. Результаты измерений воспроизводились в нескольких независимых экспериментах.

Проведенные исследования поддержаны грантами РФФИ № 01-04-49298, 02-04-22001 НЦНИ_а, грантом “Поддержка научных школ РФ” НШ-2013.2003.3, а также грантами PICS Национального центра научных исследований Франции, ИНТАС № 01-0461 и НАТО № LST.CLG.9777077.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1998. V. 90. P. 889–905.
2. Moghissi K., Dixon K. // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2003. V. 2. P. 319–326.
3. Гельфонд М.Л., Барчук А.С., Васильев Д.В., Стуков А.Н. // *Росс. биотерапевтический журн.* 2003. Т. 2. С. 67–71.
4. Ochsner M. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1997. V. 39. P. 1–18.
5. Sternberg E.D., Dolphin D. // *Tetrahedron.* 1998. V. 54. P. 4151–4202.
6. Kimel S., Tromberg B.J., Roberts W.G., Berns M.W. // *Photochem. Photobiol.* 1989. V. 50. P. 175–183.
7. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Kazachkina N., Pecherskih E., Yakubovskaya R., Lukyanets E., Derkacheva V., Egret-Charlier M., Vigny P. // *Photochem. Photobiol.* 2002. V. 75. P. 527–533.
8. Ambros M., Beeby A., MacRobert A.J., Simpson M.S.C., Svensen R.K., Phillips D. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1991. V. 9. P. 87–95.
9. Mironov A.F., Lebedeva V.S., Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Fomina G.I. // *Proc. SPIE.* 1999. V. 3563. P. 59–67.
10. Mironov A.F., Lebedeva V.S. // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 905–907.
11. Zheng G., Potter W.R., Camacho S.H., Missert J.R., Wang G., Bellnier D.A., Henderson B.W., Rodgers M.A.J., Dougherty T.J., Pandey R.K. // *J. Med. Chem.* 2001. V. 44. P. 1540–1559.
12. Feofanov A.V., Grichine A.I., Karmakova T.A., Pljutinskaja A.D., Lebedeva V.S., Filyasova A.I., Yakubovskaya R.I., Mironov A.F., Egret-Charlier M., Vigny P. // *Photochem. Photobiol.* 2002. V. 75. P. 633–643.
13. Феофанов А.В., Назарова А.И., Кармакова Т.А., Плютинская А.Д., Гришин А.И., Якубовская Р.И., Лебедева В.С., Рузиев Р.Д., Миронов А.Ф., Моризо Ж.-К., Вини П. // *Биоорг. химия.* 2004. Т. 30. С. 417–428.
14. Feofanov A., Sharonov G., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Ruziyev R., Yakubovskaya R., Mironov A., Refregier M., Maurizot J.-C., Vigny P. // *Photochem. Photobiol.* 2004. V. 79. P. 172–188.
15. Blum A., Grossweiner L.I. // *Photochem. Photobiol.* 1985. V. 41. P. 27–32.
16. Petyaev I.M., James V.H. // *Biochimica et Biophysica Acta.* 1997. V. 1345. P. 293–305.
17. Weng M., Zhang M.-H., Shen T. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1997. V. 2. P. 2393–2397.
18. Camus M.-C., Chapman M.J., Forgez P., Luplaud P.M. // *J. Lipid Res.* 1983. V. 24. P. 1210–1228.
19. 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.
20. Zweytick D., Athenstaedt K., Daum G. // *Biophys. Acta.* 2000. V. 1469. P. 101–120.
21. Sandvig K., Deurs B. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 5943–5950.

Effect of Substituents on Photochemical and Biological Properties of 13,15-N-Cycloimide Derivatives of Chlorin p6

A. I. Nazarova*, A. V. Feofanov**, T. A. Karmakova**, G. V. Sharonov*,
A. D. Plyutinskaya**, R. I. Yakubovskaya**, V. S. Lebedeva***,
A. F. Mironov***, J.-C. Maurizot****, and P. Vigny****

*Phone: (095) 336-64-55; fax: (095) 336-17-66; 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, 117571 Russia

****Centre de Biophysique Moleculaire, CNRS, Orleans, France

The effect of electron-accepting substituents in position 3 of the chlorine p6 macrocycle in neutral and carboxyl-containing negatively charged cycloimide derivatives of chlorin p6 (CIC) on the photochemical and biological properties of these photosensitizers was studied. A relationship between the structure and properties of CICs was analyzed on the basis of information on their photoinduced cytotoxicity, efficiency of the generation of reactive oxygen species, photostability, intracellular localization, quantitative parameters of accumulation in cells, and cellular pharmacokinetics. It was shown that these compounds can be used for the development of photosensitizers with intense light absorption at 740 nm, controlled intracellular localization, and a high photodynamic activity toward tumor cells. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

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