



ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И МЕХАНИЗМЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА 13¹-[2-(ГУАНИДИНИЛ)ЭТИЛАМИНО]ХЛОРИНА e₆

© 2021 г. А. В. Ефременко*, **, Е. Д. Дьякова*, ***, П. В. Островерхов***, Н. С. Кирин***,
А. Ф. Мионов***, М. А. Грин***, А. В. Феофанов*, **, #

*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

***МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий
им. М.В. Ломоносова, Россия, 119571 Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 08.11.2020 г.

После доработки 19.11.2020 г.

Принята к публикации 26.11.2020 г.

Установлено, что фотосенсибилизатор диметилловый эфир 13¹-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e₆ накапливается преимущественно в лизосомах, частично в эндосомах и не накапливается в митохондриях клеток аденокарциномы легкого человека A549. Первичный фотоцитотоксический эффект данного фотосенсибилизатора связан с повреждением лизосом и его высвобождением в цитоплазму. В цитоплазме формируется однородное распределение фотосенсибилизатора в комплексах с мембранными структурами, которые служат вторичными мишенями его фотоиндуцированного действия. Обнаружены зависимые от времени морфологические признаки развития параптоза, которые указывают на фотодинамическое повреждение эндоплазматического ретикулума как на вторичный механизм фотоцитотоксического действия исследуемого фотосенсибилизатора. На этой стадии происходит еще одно изменение потенциальных клеточных мишеней фотосенсибилизатора: он концентрируется в цитоплазматической и ядерной мембранах, в мембранах многочисленных вакуолей, а также в лизосомах, которые, по-видимому, продолжают образовываться в процессе развития параптоза. Таким образом, исследуемое производное хлорина e₆, как представитель гидрофобных фотосенсибилизаторов с внутриклеточным нацеливанием на лизосомы, обладает двух- или трехстадийным механизмом фотодинамического действия с последовательным изменением клеточных мишеней.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, внутриклеточная локализация, клеточные органеллы, флуорофор, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

DOI: 10.31857/S0132342321040084

ВВЕДЕНИЕ

Как показывают результаты клинических исследований, активно развивающаяся фотодинамическая терапия (ФДТ) эффективна при лечении многих типов рака и различных незлокачественных образований [1–8]. ФДТ основана на местном или системном применении фотосенси-

билизатора (ФС) – соединения, которое накапливается в опухоли и при локальном облучении светом соответствующей длины волны продуцирует активные формы кислорода, приводящие к селективному разрушению опухолевых клеток [3, 9]. Преимущественное накопление ФС в опухоли дает возможность избирательно повреждать злокачественные новообразования с минимальным воздействием на окружающие здоровые ткани, а также позволяет сочетать лечение с диагностикой на основе флуоресценции ФС [4].

В качестве ФС могут выступать различные соединения: порфирины и их аналоги, ксантеновые, тиазиновые, ксазиновые, полициклохиноновые и триарилметановые красители, а также некоторые флуоресцирующие белки [6, 10]. Про-

Сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид; ДИПЭА – диизопрропилэтиламин; ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; ФС – фотосенсибилизатор; ФДТ – фотодинамическая терапия; ЭР – эндоплазматический ретикулум; CrEL – Кремофор EL; LTG – LysoTracker Green; Rh123 – родамин 123; TOG488 – конъюгат трансферрина с красителем Oregon Green 488.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-64-55; эл. почта: avfeofanov@yandex.ru).

изводные порфиринов – наиболее многочисленная группа соединений, используемых для ФДТ. Производные природных порфиринов, хлорины и бактериохлорины, обладают интенсивным поглощением, соответственно, в дальней красной и ближней инфракрасной спектральных областях. Свет с этими длинами волн глубже проникает в биологические ткани, что обеспечивает более эффективное фотодинамическое воздействие на большие или глубоко расположенные злокачественные новообразования [11].

Совершенствование ФДТ требует разработки улучшенных по свойствам и эффективности ФС. При разработке новых ФС важное значение имеют их нацеленность на опухолевые клетки (так называемая таргетность), высокое внутриклеточное накопление и оптимальная внутриклеточная локализация [8]. Внутриклеточная локализация ФС сложным образом зависит от его структуры, гидрофобности/полярности, присутствия в составе молекулы заряженных групп и их количества, распределения и знака заряда, а также наличия заместителей, влияющих на сродство ФС к определенным клеточным органеллам. В зависимости от структуры ФС на основе порфиринов могут накапливаться в цитоплазме в липидных каплях, эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), аппарате Гольджи, лизосомах или митохондриях [12–17]. Поскольку фотоиндуцированные АФК обладают высокой реакционной способностью, а следовательно, и короткими временами жизни, то органеллы с преимущественным накоплением ФС выступают первичными мишенями фотодинамического воздействия, а их повреждение определяет механизмы развития фотоиндуцированной цитотоксичности.

Митохондрии считаются предпочтительной внутриклеточной мишенью для накопления ФС [14, 17]. ФС, нацеленные на митохондрии, могут снижать потенциал митохондриальной мембраны, ингибировать клеточное дыхание и окислительное фосфорилирование, высвобождать цитохром *c* и другие проапоптотические белки в цитоплазму, активируя апоптоз [18–20]. При накоплении ФС в лизосомах световое воздействие может разрушать лизосомы, вызывая диффузию ФС в цитоплазму [14]. В результате повреждения лизосом происходит утечка гидролитических ферментов [21–24]. В этом случае фотодинамическое воздействие приводит к клеточному апоптозу или некрозу, в зависимости от интенсивности светового воздействия и активности освобожденных из поврежденных лизосом протеолитических ферментов [19]. Установлено, что эффективность фотцитотоксического действия ФС, локализованных в лизосомах, при сходных средних концентрациях в клетках заметно ниже, чем у ФС, накапливающихся в митохондриях и других органеллах [14, 18, 21].

Таким образом, определение внутриклеточной локализации ФС важно для понимания эффективности и механизмов его действия при ФДТ.

Недавно в работе Gao et al. [25] при изучении нового эффективного ФС, диметилового эфира 13¹-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e₆ (соединение (II), рис. 1), был сделан вывод о том, что введение гуанидинового заместителя улучшает “нацеливание” соединения (II) в митохондрии. В то же время исследуемое нами аналогичное производное хлорина e₆, но с 2-(гуанидинил)бутиламином заместителем в положении 13¹ характеризуется преимущественным накоплением в лизосомах (данные не представлены). Возможность внутриклеточного перенацеливания за счет небольшого изменения структуры заместителя представляет интерес для направленного дизайна ФС с заданными характеристиками, но заявленные в работе Gao et al. [25] свойства соединения (II) вызвали у нас сомнения. Мы синтезировали соединение (II) для уточнения его свойств и изучили локализацию в клетках аденокарциномы легкого человека A549, как и в работе Gao et al. [25]. Установлено, что соединение (II) не обладает митохондриальной локализацией, а накапливается преимущественно в лизосомах клеток A549. Выявлено фотоиндуцированное разрушение лизосом с сопутствующим перераспределением соединения (II) в клетках, которое выступает первичным механизмом фотцитотоксического действия соединения (II), а также источником ошибок при исследовании внутриклеточной локализации соединения (II) и подобных ему ФС. Обнаруженные морфологические признаки развития параптоза указывают на фотодинамическое повреждение ЭР как на вторичный механизм фотцитотоксического действия соединения (II), развивающийся после его высвобождения из лизосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез диметилового эфира 13¹-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина e₆ (соединение (II)). Для получения соединения (II) в качестве стартового соединения был использован аминоэтиламин метилового эфира феофорбида *a* (соединение (I)). Синтез соединения (II) осуществляли действием на исходное соединение (I) пиразол-1*H*-карбоксамидина (рис. 1). Полученное соединение (II) было выделено с помощью препаративной ТСХ, а его структура доказана методами ЯМР-спектроскопии (¹H и ¹³C) и масс-спектрометрии (MALDI).

Внутриклеточная локализация соединения (II). Исследуемое соединение (II) (рис. 1) – гидрофобное, поэтому в качестве его солюбилизатора была выбрана эмульсия полиэтоксифирированного касторового масла – Кремофора EL (CrEL), кото-

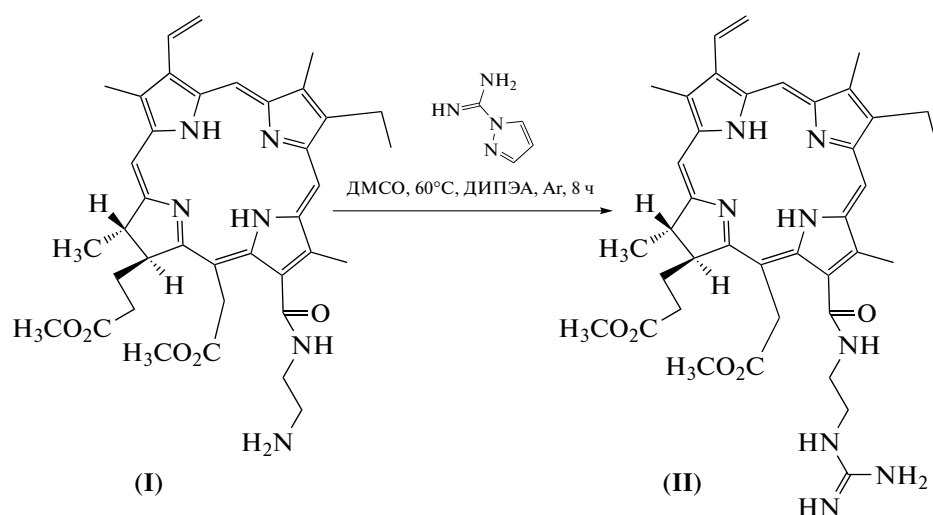


Рис. 1. Схема синтеза гуанидинового производного метилового эфира аминоэтиламида феофорбида *a* (соединение (II)).

рая стабилизирует мономерную форму тетрапиррольных соединений в водных растворах, и ее использование разрешено в клинической практике [15, 16, 24, 26, 27]. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) установлено, что соединение (II) проникает в клетки аденокарциномы легкого человека A549 и накапливается в цитоплазматической области с преимущественным гранулярным распределением (рис. 2, колонка 1). Соединение (II) не накапливается в цитоплазматической мембране клетки и не проникает в ядро (рис. 2, колонка 1).

Для идентификации клеточных структур, накапливающих соединение (II), были проведены исследования с использованием флуоресцентных зондов клеточных органелл: LysoTracker Green (LTG), родамина 123 (Rh123) и конъюгата трансферрина с красителем Oregon Green 488 (TOG488), окрашивающих, соответственно, лизосомы, митохондрии и эндосомы, содержащие рецептор трансферрина.

Исследования, выполненные методом ЛСКМ, выявили, что наблюдаемое в клетках гранулярное распределение соединения (II) отражает его преимущественное накопление в лизосомах (рис. 2, ряд А) и менее выраженное — в эндосомах (рис. 2, ряд Б). Коэффициент солокализации соединения (II) с лизосомами составляет 0.7 ± 0.2 , а с эндосомами — 0.4 ± 0.1 . В митохондриях клеток A549 соединение (II) не накапливается (рис. 2, ряд В). Коэффициент солокализации соединения (II) с митохондриями не превышает 0.012 ± 0.002 . Данная внутриклеточная локализация сохранялась в широком диапазоне концентраций соединения (II) (0.25–2 мкМ), с которыми инкубировали клетки, и ее характер не зависел от времени

инкубации клеток с соединением (II) в диапазоне 1–4 ч.

В то же время при увеличении концентрации соединения (II) до 8–10 мкМ на изображениях, полученных методом ЛСКМ, наблюдали преимущественно диффузное внутриклеточное распределение этого соединения с незначительным количеством гранул, отличных от митохондрий (рис. 3). Наблюдавшееся концентрационно-зависимое изменение внутриклеточного распределения соединения (II), по-видимому, связано с фотоиндуцированным повреждением лизосом в процессе измерения изображений клеток методом ЛСКМ при высоких внутриклеточных концентрациях фотосенсибилизатора (II). Разрушение лизосом сопровождается вытеканием соединения (II) и его равномерным распределением по цитоплазме. При этом в областях расположения митохондрий не обнаружено увеличения флуоресценции соединения (II), которое могло бы указывать на усиленное связывание соединения (II) с митохондриями (рис. 3б, 3в). В то же время митохондрии в клетках меняют свою морфологию, приобретая округлую форму вместо вытянутой (рис. 3а, колонка 2), что подтверждает развитие фотоцитотоксического эффекта и косвенно указывает на деполяризацию мембраны митохондрий.

В условиях, когда соединение (II) почти равномерно распределено по цитоплазме клетки, делать заключение о его преимущественной локализации в каких-либо клеточных органеллах не представляется корректным.

Внутриклеточное распределение соединения (II) после фотодинамического воздействия на клетки. Для проверки гипотезы о светоиндуцированном перераспределении соединения (II) из лизосом в

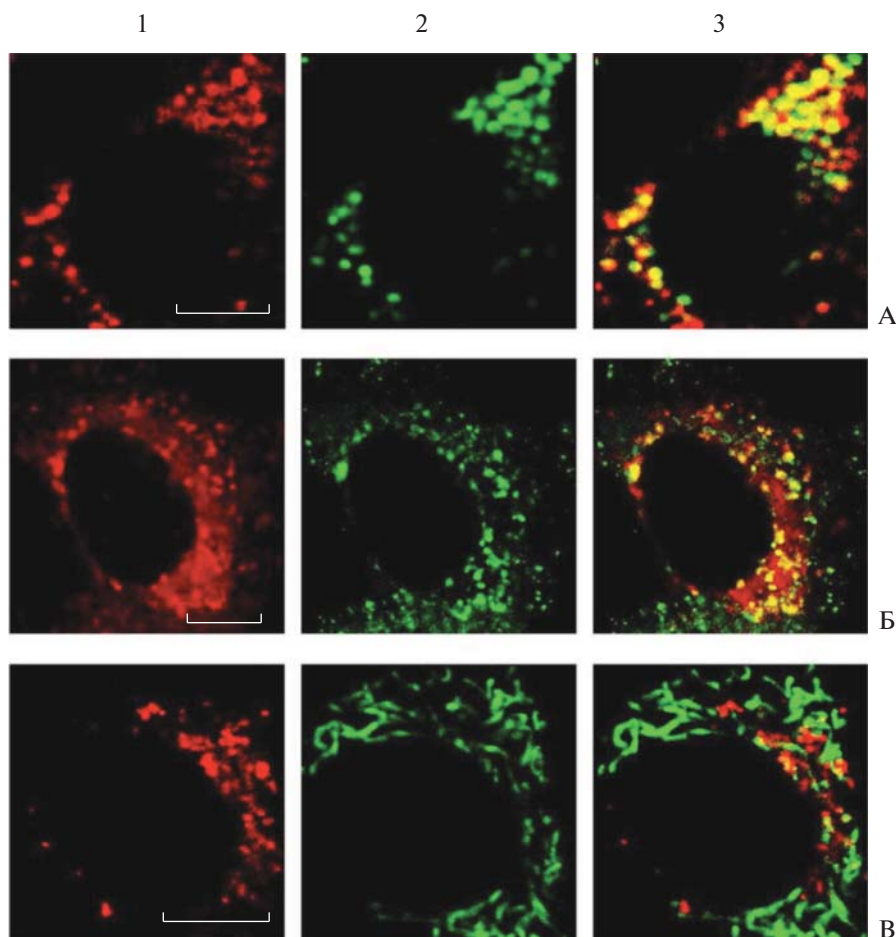


Рис. 2. Определение клеточных органелл, в которых происходит преимущественное накопление соединения (II), методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 инкубировали с 0.5 мкМ соединения (II) в течение 2 ч. Колонка 1 – внутриклеточное распределение соединения (II). Колонка 2 – внутриклеточное распределение селективных зондов клеточных органелл: LGG, окрашивающих лизосомы (панель 2А); TOG488, окрашивающих эндосомы (панель 2Б); Rh123, окрашивающих митохондрии (панель 2В). Колонка 3 – наложение изображений 1 и 2, желтый цвет указывает на солокализацию соединения (II) с селективным зондом. Масштабный отрезок – 5 мкм.

цитоплазму было исследовано внутриклеточное распределение соединения (II) после облучения светом клеток A549, прединкубированных с этим соединением в низкой концентрации (0.3 мкМ). Установлено, что световое облучение клеток, содержащих соединение (II), приводит к значительному уменьшению количества лизосом, в которых исходно накапливается соединение (II) (рис. 4), а цитоплазматическое распределение соединения (II) становится практически однородным (рис. 4, панель 1Б), как и в случае, представленном на рис. 3. Это указывает на фотоиндуцированное повреждение лизосом, содержащих соединение (II), и высвобождение соединения в цитоплазму. Отметим, что распределение флуоресцентного зонда лизосом LGG также становится диффузным, свидетельствуя об отсутствии интактных везикул с пониженным внутренним рН.

Учитывая гидрофобный характер соединения (II) и его агрегацию в полярном окружении с полным тушением флуоресценции, наблюдаемое диффузное распределение должно формироваться в результате связывания соединения (II) с мембранными структурами клетки, среди которых могут быть мембраны ЭР, аппарата Гольджи и митохондрий.

Полученный результат свидетельствует о том, что диффузное распределение соединения (II) в цитоплазме клеток следует рассматривать как результат фотодинамического воздействия на клетки, в которых исходно соединение (II) было локализовано преимущественно в лизосомах. Подчеркнем, что фотоиндуцированное диффузное распределение соединения (II) в клетках может возникать и в процессе сканирования клеток лазером при исследованиях методом ЛСКМ (рис. 3).

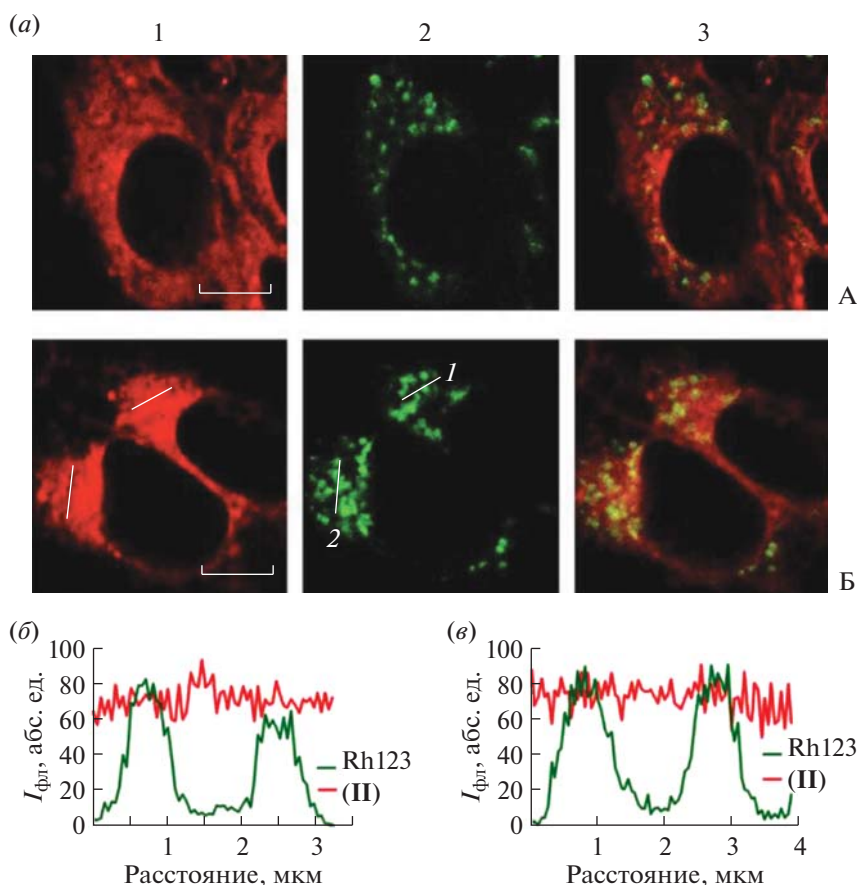


Рис. 3. (а) – Изображения клеток аденокарциномы легкого человека А549, полученные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Клетки А549 инкубировали с 8 мкМ (ряд А) или 10 мкМ (ряд Б) соединения (II) в течение 2 ч. За 10 мин до окончания инкубации к клеткам добавляли Rh123 в концентрации 50 мкг/л. Показано внутриклеточное распределение соединения (II) (колонка 1) и Rh123, флуоресцентного маркера митохондрий (колонка 2). Колонка 3 – наложение изображений из колонок 1 и 2. Масштабный отрезок – 5 мкм. Диффузное распределение соединения (II) при высокой концентрации вызвано светоиндуцированным разрушением лизосом и высвобождением из них соединения (II) в процессе измерения изображений; (б, е) – профили распределения интенсивностей флуоресценции соединения (II) и Rh123 вдоль отмеченных на панели 2Б линий 1 (б) и 2 (е).

Однако оно не отражает исходной картины накопления соединения (II) в клетках и не указывает на первичные клеточные мишени, которые определяют механизм, лежащий в основе фототоксичности соединения (II).

Спустя несколько десятков минут после облучения клеток с соединением (II) в цитоплазме клеток было обнаружено образование многочисленных крупных вакуолей и перераспределение соединения (II). В этих условиях наблюдалось концентрирование соединения (II) в цитоплазматической и ядерной мембранах, в мембранах, ограничивающих образовавшиеся вакуоли, а также в лизосомах, которые, по-видимому, вновь начинали формироваться в поврежденных фотодинамическим воздействием, но еще живых клетках (рис. 4, ряд В).

Формирование большого числа крупных вакуолей в цитоплазме без образования пузырей на

плазматической мембране, сжатия клеток и фрагментации ядра – характеристичный признак развития запрограммированной гибели клеток по механизму параптоза [28–30]. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что при ФДТ параптоз активируется в результате интенсивного фотодинамического повреждения ЭР, что в свою очередь подразумевает связывание ФС с мембранами ЭР [29, 30]. Можно заключить, что вторичная мишень соединения (II), определяющая дальнейшее развитие фототоксического эффекта – мембраны ЭР, доступ к которым соединение (II) получает после фотоиндуцированного высвобождения из лизосом.

Соединение (II) нацелено в митохондрии или в лизосомы? Полученные нами данные о преимущественно лизосомальном накоплении соединения (II) в клетках А549 и отсутствии накопления в митохондриях противоречат выводам работы

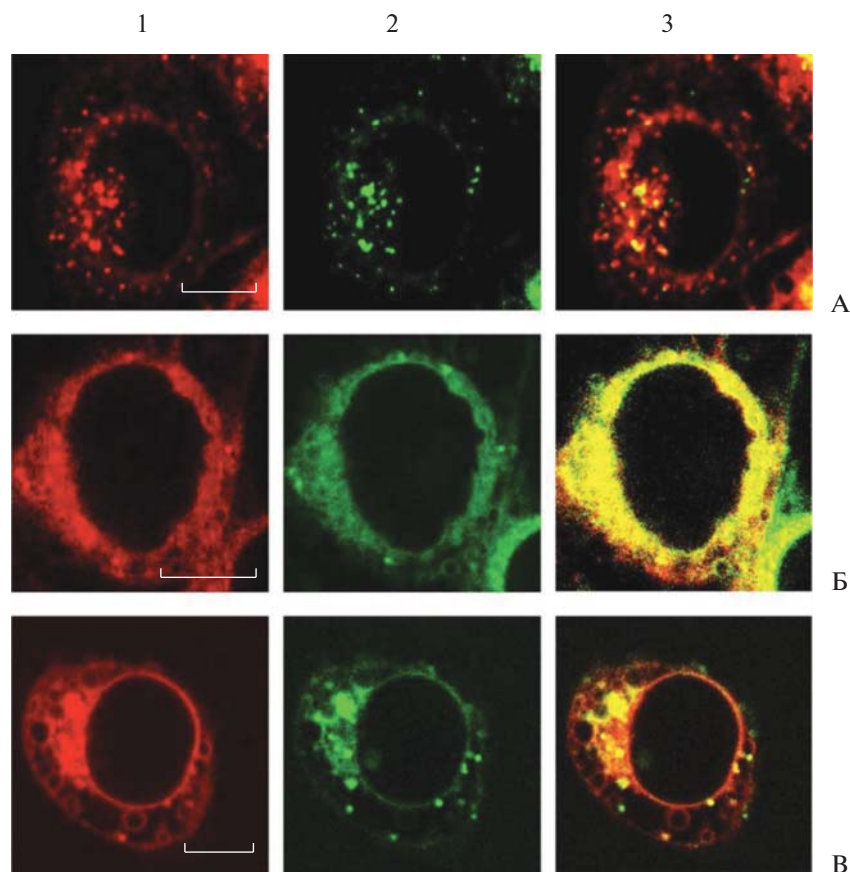


Рис. 4. Изображения клеток аденокарциномы легкого человека A549, полученные методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Клетки A549 инкубировали с 0.3 мкМ соединения (II) в течение 2 ч (ряд А), после чего облучали галогенной лампой (световая доза 20 Дж/см²) (ряды Б, В). За 40 мин до окончания инкубации клеток с соединением (II) (ряды А, Б) или после облучения клеток (ряд В) к клеткам добавляли LTG в концентрации 50 нМ. Показано внутриклеточное распределение соединения (II) (колонка 1) и LTG, флуоресцентного маркера лизосом (колонка 2), без облучения (ряд А), сразу после облучения (ряд Б) и через 40 мин после облучения (ряд В). Колонка 3 – наложение изображений из колонок 1 и 2. Масштабный отрезок – 5 мкм.

Gao et al. [25] о нацеливании соединения (II) в митохондрии за счет введения гуанидинового заместителя. Причина этого противоречия, по-видимому, – ошибка авторов работы Gao et al. [25], допущенная при анализе внутриклеточной локализации соединения (II). Внутриклеточное распределение соединения (II) на изображениях, представленных в статье Gao et al. [25], имеет диффузный характер, очень схожий с тем, что наблюдается после облучения клеток (рис. 4, панель 1В), а также при очень высоких концентрациях соединения (II), когда происходит его фотоиндуцированное перераспределение в процессе сканирования лазерным лучом под микроскопом (рис. 3). При этом выводы о солокализации соединения (II) с клеточными органеллами сделаны в статье Gao et al. [25] на основе нетипичных диффузных внутриклеточных распределений флуоресцентных зондов клеточных органелл MitoTracker Green и LysoTracker Blue. Очевидно, что некорректно делать выводы о солокализации с клеточ-

ными органеллами в отсутствие характерной картины их окрашивания: гранулярной для лизосом, нитевидной или гранулярной, соответственно, для активных или деполаризованных митохондрий.

Существует мнение, что введение положительно заряженного заместителя в гидрофобный ФС способствует его накоплению в митохондриях [18]. Однако результаты, представленные в настоящей работе, и данные опубликованных исследований свидетельствуют о том, что такого рода модификация ФС во многих случаях не приводит к нацеливанию катионных ФС на митохондрии, и они накапливаются в лизосомах и других органеллах клетки, отличных от митохондрий [16, 21, 31–33].

Механизмы фотодинамического действия соединения (II). Хотя одинаковая концентрация ФС при накоплении в лизосомах дает заметно меньшую фоточитотоксичность, чем при накоплении

ФС в ЭР, липидных каплях, аппарате Гольджи или в митохондриях [11, 17, 21], соединение (II), согласно работе Gao et al. [25], обладает высокой фотоиндуцированной цитотоксичностью, вызывающая *in vitro* 50%-ную гибель клеток A549 при концентрации 0.545 мкМ (световая доза 2 Дж/см²). Соединение (II) вызывает эффективное торможение роста перевиваемой опухоли A549 у мышей при дозе 0.15 мг/кг и полное прекращение ее роста при 0.4 мг/кг (световая доза 120 Дж/см²) [25].

Наши исследования показали, что при первом накоплении соединения (II) в лизосомах и эндосомах механизм фотоиндуцированной цитотоксичности — как минимум двухстадийный. На первой стадии облучение клеток светом вызывает фотодинамическое повреждение лизосом с выходом соединения (II) из лизосом в цитоплазму. Вместе с соединением (II) из поврежденных лизосом, очевидно, высвобождаются гидролитические ферменты, которые могут способствовать развитию апоптоза, расщепляя в цитоплазме белок Bid до проапоптозного продукта tBid [34, 35]. Признаки развития апоптоза после ФДТ с соединением (II) были обнаружены в срезах опухоли [25]. Разрушение лизосом, как полагают, затрудняет развитие аутофагии, которая может помогать клеткам бороться с повреждениями, вызванными ФДТ [30, 36].

На второй стадии соединения (II), получившее после выхода из лизосом доступ к новым мишеням в цитоплазме, вызывает каскад фотоиндуцированных повреждений, которые по морфологическим признакам приводят к развитию параптоза. Как отмечалось выше, мишенями гидрофобного соединения (II) в цитоплазме могут быть различные мембранные структуры, включая ЭР. Именно фотоиндуцированное повреждение ЭР, как полагают, запускает параптоз при ФДТ, способствуя гибели опухолевых клеток даже с заблокированным развитием апоптоза [30].

Изменения, обнаруженные нами во внутриклеточной локализации соединения (II) при развитии параптоза, выявили дополнительные потенциальные мишени его действия — плазматическую и ядерную мембраны, а также мембраны вакуолей. Эти мишени могут быть задействованы на третьей стадии фотоиндуцированного воздействия в случае быстрого развития параптоза в процессе облучения или при повторном сеансе облучения, проводимом с задержкой, для полноценного развития параптоза и соответствующих изменений в локализации соединения (II).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез метилового эфира аминокотиламида феофорбида *a*. Соединение (I) получали по методике Gao et al. [25], действуя на исходный метиловый

эфир феофорбида *a* избытком 1,2-диаминоэтана при добавлении основания диизопропилэтиламина (ДИПЭА).

Синтез диметилового эфира 13¹-[2-(гуанидинил)этиламино]хлорина *e*₆. К 70 мг аминокотиламида метилового эфира феофорбида *a*, растворенного в 3 мл диметилсульфоксида (ДМСО), добавляли 130 мг пиразол-1*H*-карбоксамидина и 15 мкл ДИПЭА для придания основности среде. Реакцию проводили в течение 8 ч при интенсивном перемешивании при 60°C в инертной среде аргона с обратным холодильником. Ход реакции контролировали спектрофотометрически и хроматографически. Из реакционной смеси целевой продукт выделяли при помощи жидкостной экстракции в системе дистиллированная вода/хлороформ. Экстракт сушили над безводным сульфатом натрия, а затем растворитель удаляли при пониженном давлении на ротационном испарителе. Целевой продукт очищали от родственных примесей методом колонной хроматографии, используя в качестве элюента смесь хлороформа и метилового спирта. Соединение было получено в количестве 54 мг. Выход составил 77%. Хроматографию в тонком слое осуществляли на пластинках Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия) 20 × 20 мм с толщиной слоя сорбента 1 мм.

Масс-спектры получены на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex (Bruker, Германия) методом матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации (MALDI) с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзола. ЯМР регистрировали в дейтерохлороформе на спектрометре DPX-300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц.

ЯМР-спектроскопия соединения (I). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д., *J*, Гц): 9.67 (H, с, 10-H), 9.62 (H, с, 5-H), 8.82 (1H, с, 20-H), 8.04 (H, дд, *J* 17.8, 11.5, 3¹-H), 6.93 (H, т, *J* 5.2, 13²-NH), 6.30 (H, дд, *J* 17.8, 1.4, E-3²-H), 6.08 (H, дд, *J* 11.5, 1.4, Z-3²-H), 5.53 (H, д, *J* 18.9, 15-CH₂^a), 5.26 (H, д, *J* 18.9, 15-CH₂^b), 4.48 (H, м, 18-H), 4.36 (H, м, 17-H), 3.82 (2H, м, 8¹-CH₂), 3.77 (3H, с, 15²-COOCH₃), 3.63 (3H, с, 12¹-CH₃), 3.49 (3H, с, 17³-COOCH₃), 3.47 (3H, с, 2¹-CH₃), 3.48 (2H, м, 13³-CH₂), 3.29 (3H, с, 7¹-CH₃), 2.71 (2H, м, 13⁴-CH₂), 2.55 (H, м, 17²-CH₂^a), 2.24 (H, м, 17¹-CH₂^a), 2.19 (H, м, 17²-CH₂^b), 1.8 (H, м, 17¹-CH₂^b), 1.72 (3H, д, *J* 7.1, 18¹-CH₃), 1.69 (3H, т, *J* 7.6, 8²-CH₃), -1.63 (H, шир.с, I-NH), -1.86 (H, шир.с, III-NH).

¹³C-ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 174 (C, с, 15²-C), 173.7 (C, с, 17³-C), 169 (C, с, 13¹-C), 168.8 (C, с, 19-C), 166.7 (C, с, 16-C), 154 (C, с, 6-C), 149 (C, с, 9-C), 144.8 (C, с, 8-C), 138.8 (C, с, 2-C), 136 (C, с, 7-C), 135.2 (C, с, 4-C), 134.8 (C, с, 12-C), 134.6 (C, с, 14-C), 134.4 (C, с, 3-C), 130.1 (C, с, 11-C),

129.9 (С, с, 1-С), 129.2 (С, с, 3¹-С), 128.3 (С, с, 13-С), 121.5 (С, с, 3²-С), 102.3 (С, с, 15-С), 101.3 (С, с, 10-С), 98.8 (С, с, 5-С), 93.7 (С, с, 20-С), 53.2 (С, с, 17-С), 52.2 (С, с, 17⁴-С), 49.3 (С, с, 18-С), 39.7 (С, с, 13⁴-С), 37.7 (С, с, 15¹-С), 31.7 (С, с, 17²-С), 31.3 (С, с, 17¹-С), 29.7 (С, с, 13³-С), 23.1 (С, с, 18¹-С), 19.7 (С, с, 8¹-С), 17.9 (С, с, 8²-С), 12.4 (С, с, 2¹-С), 11.9 (С, с, 12¹-С), 11.3 (С, с, 7¹-С)

ЯМР-спектроскопия соединения (II). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J, Гц): 9.68 (H, с, 10-H), 9.63 (H, с, 5-H), 9.41 (3H, шир.с, 13⁷-NH₂, 13⁸-NH), 8.81 (H, с, 20-H), 8.07 (H, дд, J 17.8, 11.5, 3¹-H), 7.40 (H, м, 13⁵-NH), 6.98 (H, т, J 5.2, 13²-NH), 6.33 (H, дд, J 17.8, 1.4, E-3²-H), 6.11 (H, дд, J 11.5, 1.4, Z-3²-H), 5.55 (H, д, J 18.9, 15-CH₂^a), 5.25 (H, д, J 18.9, 15-CH₂^b), 4.47 (H, м, 18-H), 4.35 (H, м, 17-H), 3.80 (2H, м, 8¹-CH₂), 3.79 (3H, с, 15²-COOCH₃), 3.61 (3H, с, 12¹-CH₃), 3.54 (3H, с, 17³-COOCH₃), 3.49 (3H, с, 2¹-CH₃), 3.48 (2H, м, 13³-CH₂), 3.30 (3H, с, 7¹-CH₃), 2.78 (2H, м, 13⁴-CH₂), 2.53 (H, м, 17²-CH₂^a), 2.23 (H, м, 17¹-CH₂^a), 2.17 (H, м, 17²-CH₂^b), 1.81 (H, м, 17¹-CH₂^b), 1.70 (3H, д, J 7.1, 18-CH₃), 1.62 (3H, т, J 7.6, 8²-CH₃), -1.63 (H, шир.с, I-NH), -1.85 (H, шир.с, III-NH).

¹³C-ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, м.д.): 173.8 (С, с, 15²-С), 173.6 (С, с, 17³-С), 168.9 (С, с, 13¹-С), 168.3 (С, с, 19-С), 167.1 (С, с, 16-С), 156.8 (С, с, 13⁶-С), 153.7 (С, с, 6-С), 148.9 (С, с, 9-С), 144.6 (С, с, 8-С), 138.7 (С, с, 2-С), 135.9 (С, с, 7-С), 135.1 (С, с, 4-С), 134.3 (С, с, 12-С), 134.2 (С, с, 3-С), 129.9 (С, с, 11-С), 129.7 (С, с, 1-С), 128.5 (С, с, 31-С), 127.5 (С, с, 13-С), 121.2 (С, с, 32-С), 102.1 (С, с, 15-С), 101.4 (С, с, 10-С), 98.6 (С, с, 5-С), 93.8 (С, с, 20-С), 53.1 (С, с, 17-С), 51.9 (С, с, 17⁴-С), 49.3 (С, с, 18-С), 38.9 (С, с, 13⁴-С), 37.4 (С, с, 15¹-С), 32.1 (С, с, 17²-С), 31.3 (С, с, 17¹-С), 29.6 (С, с, 13³-С), 23.8 (С, с, 18¹-С), 19.4 (С, с, 8¹-С), 17.8 (С, с, 8²-С), 11.9 (С, с, 2¹-С), 11.3 (С, с, 12¹-С), 10.9 (С, с, 7¹-С).

Масс-спектрометрия соединения (II). MALDI, *m/z*: 709.0 (M⁺).

Реагенты. В экспериментах использовали фосфатно-солевой буфер (рН 7.4), глутамин и среду DMEM/F12 (ПанЭко, Россия); эмбриональную телячью сыворотку NuClone defined (GE Healthcare Life Sciences, США); CrEL и Rh123 (Sigma, США); LTG и TOG488 (Invitrogen, США).

Стоковый раствор соединения (II) с концентрацией 1 мМ готовили втиранием сухой навески в CrEL с дальнейшим доведением фосфатным буфером (рН 7.4) до конечного объема. Концентрация CrEL в стоковом растворе составила 5%.

Эксперименты на культуре клеток A549. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 (получены из коллекции клеток Института вирусологии

им. Д.И. Ивановского) выращивали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ глутамин. Пересевы клеток проводили 2 раза в неделю. Клетки на логарифмической фазе роста отсеивали на покровные стекла в 24-луночные планшеты в концентрации 5×10^5 клеток на лунку и выращивали сутки при 37°C, 5% CO₂.

В экспериментах по изучению внутриклеточной локализации соединения (II) клетки инкубировали с исследуемым соединением (0.25–10 мкМ) в течение 1–4 ч с внесением в среду в конце инкубации одного из флуоресцентных зондов: LTG (50 нМ, 40 мин), TOG488 (50 мкг/мл, 30 мин) или Rh123 (50 мкг/л, 10 мин).

При исследовании внутриклеточного распределения соединения (II) после фотодинамического воздействия клетки A549 инкубировали с 0.3 мкМ соединения (II) в течение 2 ч. Далее клетки облучали 15 мин с помощью галогеновой лампы (500 Вт) через водный фильтр толщиной 5 см и широкополосный фильтр КС-13 с пропусканием 660–1000 нм. Плотность мощности света составляла 10–12 мВт/см² (световая доза 20 Дж/см²). Флуоресцентный маркер лизосом LTG добавляли к клеткам в концентрации 50 нМ либо за 40 мин до облучения клеток, либо сразу после облучения. Внутриклеточное распределение соединения (II) анализировали методом ЛСКМ сразу после облучения клеток и через 40 мин.

Внутриклеточное распределение соединения (II) и его солокализацию с клеточными органеллами изучали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica-SP2 (Leica, Германия). Конфокальные флуоресцентные изображения были получены с использованием водно-иммерсионного объектива 63×/1.2 HCX PL APO с латеральным и аксиальным разрешением 0.25 и 0.7 мкм соответственно. Флуоресценцию соединения (II) возбуждали лазером с длиной волны 633 нм и регистрировали в диапазоне 650–800 нм. Флуоресценцию красителей LTG, TOG488 и Rh123 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и регистрировали в диапазоне 500–600 нм. В контрольных экспериментах подтверждено, что при используемых параметрах измерений сигнал флуоресценции красителей LTG, TOG488 и Rh123 в спектральной области 650–800 нм (диапазон измерения флуоресценции соединения (II)) не регистрируется. Для оценки солокализации соединения (II) с органеллами полученные изображения распределения соединения (II) и флуоресцентного зонда органелл совмещали в программе ImageJ (National Institute of Health, США), а также рассчитывали коэффициенты солокализации, используя встроенную функцию этой программы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что высокая фотоиндуцированная цитотоксичность соединения (II) для раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [25] определяется воздействием на несколько внутриклеточных мишеней, доступ к которым меняется в процессе облучения клеток светом. Преимущественное накопление соединения (II) в лизосомах и частично в эндосомах создает основу для повреждения этих везикул на начальном этапе фотодинамического воздействия, которое сопровождается неизбирательным внутриклеточным перераспределением соединения (II) в различные мембранные структуры. Эти структуры становятся следующими мишенями для фотосенсибилизатора (II), а их повреждение (в первую очередь, по-видимому, повреждение мембран ЭР) по выявленным признакам вызывает развитие параптоза. При этом наблюдается усиленное накопление соединения (II) в мембранах образующихся вакуолей, в ядерной и цитоплазматической мембранах и в лизосомах, которые в свою очередь становятся предпочтительными мишенями усиленного фотодинамического воздействия.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00854).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания проведенных кем-либо из авторов данной статьи экспериментов с привлечением людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allison R.R. // *Future Oncol.* 2014. V. 10. P. 123–124. <https://doi.org/10.2217/fon.13.176>
2. Rkein A.M., Ozog D.M. // *Dermatol. Clin.* 2014. V. 32. P. 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.009>
3. Abrahamse H., Hamblin M.R. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. P. 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
4. Romyantseva V.D., Shchelkunova A.E., Gorshkova A.S., Alekseev Yu.V., Shilov I.P., Ivano A.V., Davydov E.V., Mironov A.F. // *Fine Chem. Technol.* 2017. V. 12. P. 72–80. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2017-12-2-72-80>
5. Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.-H., Childs C.J.H., Sibata C.H. // *Photodiagn. Photodyn.*

- nam. Ther. 2004. V. 1. P. 27–42. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9)
6. Chilakamarthi U., Giribabu L. // *Chem. Rec.* 2017. V. 17. P. 775–802. <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>
7. Truchuelo M.T., Perez B., Fernandez-Guarino M., Moreno C., Jaén-Olasolo P. // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2014. V. 28. P. 86–93. <https://doi.org/10.1111/jdv.12064>
8. Gao M., Yu F., Lv C., Choo J., Chen L. // *Chem. Soc. Rev.* 2017. V. 46. P. 2237–2271. <https://doi.org/10.1039/c6cs00908e>
9. Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tyagunova E.E. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 657–674. <https://doi.org/10.1134/S1068162020050222>
10. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbaska J. // *Biomed. Pharmacother.* 2018. V. 106. P. 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
11. Nyman E.S., Hynninen P.H. // *Photochem. Photobiol.* 2004. V. 73. P. 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002>
12. Feofanov A., Sharonov G., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Ruzjyev R., Yakubovskaya R., Mironov A., Refregier M., Maurizot J.-C., Vigny P. // *Photochem. Photobiol.* 2004. V. 79. P. 172–188. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2004\)079<0172:csoppo>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2004)079<0172:csoppo>2.0.co;2)
13. Назарова А.И., Феофанов А.В., Кармакова Т.А., Шаронов Г.В., Плутинская А.Д., Якубовская Р.И., Лебедева В.С., Миронов А.Ф., Моризо Ж.-К., Вину П. // *Биоорг. химия.* 2005. Т. 31. С. 535–548. [Nazarova A.I., Feofanov A.V., Karmakova T.A., Sharonov G.V., Plyutinskaya A.D., Yakubovskaya R.I., Lebedeva V.S., Mironov A.F., Maurizot J.C., Vigny P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2005. V. 31. P. 482–494.] <https://doi.org/10.1007/s11171-005-0066-9>
14. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. // *Photodiagn. Photodynam. Ther.* 2004. V. 1. P. 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
15. 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. 75. P. 633–643. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)075<0633:nipboa>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)075<0633:nipboa>2.0.co;2)
16. Sharonov G.V., Karmakova T.A., Kassies R., Pljutinskaya A.D., Grin M.A., Refregiers M., Yakubovskaya R.I., Mironov A.F., Maurizot J.-C., Vigny P., Otto C., Feofanov A.V. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. P. 407–419. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.028>
17. Chiaviello A., Postiglione I., Palumbo G. // *Cancers.* 2011. V. 3. P. 1014–1041. <https://doi.org/10.3390/cancers3011014>
18. Dabrowski J.M., Arnaut L.G. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015. V. 14. P. 1765–1780. <https://doi.org/10.1039/c5pp00132c>
19. Узденский А.Б. // *Биофизика.* 2016. Т. 61. № 3. С. 547–557.
20. Kessel D. // *J. Porphyr. Phthalocyan.* 2004. V. 8. P. 1009–1014. <https://doi.org/10.1142/S1088424604000374>
21. Nazarova A., Ignatova A., Feofanov A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Mass O., Grin M., Yakubovskaya R., Mironov A., Maurizot J.-C. // *Photochem. Photobiol.*

- Sci. 2007. V. 6. P. 1184–1196.
<https://doi.org/10.1039/b706921a>
22. Moan J., Berg K., Kvam E., Western A., Malik Z., Ruck A., Schneckenburger H. // Ciba Found Symp. 1989. V. 146. P. 95–111.
<https://doi.org/10.1002/9780470513842.ch7>
 23. Гельфонд М.Л. // Практическая онкология. 2007. Т. 8. № 4. С. 204–210.
 24. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Grin M.A., Sivaev I.B., Mironov A.F., Bregadze V.I., Feofanov A.V. // Photochem. Photobiol. Sci. 2014. V. 13. P. 92–102.
<https://doi.org/10.1039/c3pp50226k>
 25. Gao Y.-H., Lovreković V., Kussayeva A., Chen D.-Y., Margetić D., Chen Z.-L. // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 177. P. 144–152.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.050>
 26. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Borsheva A.A., Grin M.A., Bregadze V.I., Sivaev I.B., Mironov A.F., Feofanov A.V. // Photochem. Photobiol. Sci. 2012. V. 11. P. 645–652.
<https://doi.org/10.1039/c2pp05237g>
 27. Grin M.A., Reshetnikov R.I., Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsigankov A.A., Efremenko A.V., Ermakova D.E., Feofanov A.V., Mironov A.F. // J. Porphy. Phthalocyan. 2014. V. 18. P. 129–138.
<https://doi.org/10.1142/S1088424613501265>
 28. Fontana F., Raimondi M., Marzagalli M., Di Domizio A., Limonta P. // Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer. 2020. V. 1873. P. 188338.
<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188338>
 29. Kessel D. // Photochem. Photobiol. 2019. V. 95. P. 119–125.
<https://doi.org/10.1111/php.12952>
 30. Kessel D. // Apoptosis. 2020. V. 25. P. 611–615.
<https://doi.org/10.1007/s10495-020-01634-0>
 31. Brilkina A.A., Dubasova L.V., Sergeeva E.A., Pospelov A.J., Shilyagina N.Y., Shakhova N.M., Balalaeva I.V. // J. Photochem. Photobiol. B. 2019. V. 191. P. 128–134.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.020>
 32. Kessel D., Luguya R., Vicente M.G.H. // Photochem. Photobiol. 2003. V. 78. P. 431–435.
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)078<0431:lapeot>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)078<0431:lapeot>2.0.co;2)
 33. Carneiro J., Gonçalves A., Zhou Z., Griffin K.E., Kaufman N.E.M., Vicente M.G.H. // Lasers Surg. Med. 2018. V. 50. P. 566–575.
<https://doi.org/10.1002/lsm.22824>
 34. Stoka V., Turk B., Schendel S.L., Kim T.H., Cirman T., Snipas S.J., Ellerby L.M., Bredesen D., Frezze H., Abrahamson M., Bromme D., Krajewski S., Reed J.C., Yin X.M., Turk V., Salvesen G.S. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 3149–3157.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008944200>
 35. Reiners J.J., Jr., Caruso J.A., Mathieu P., Chelladurai B., Yin X.M., Kessel D. // Cell. Death Differ. 2002. V. 9. P. 934–944.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401048>
 36. Kessel D., Vicente M.G., Reiners J.J., Jr. // Lasers Surg. Med. 2006. V. 38. P. 482–488.
<https://doi.org/10.1002/lsm.20334>

Intracellular Localization and Mechanisms of Photodynamic Action of Dimethyl Ether of 13¹-[2-(Guanidiny)Ethylamino]Chlorin e₆

A. V. Efremenko*, **, E. D. Dyakova*, ***, P. V. Ostroverkhov***, N. S. Kirin***, A. F. Mironov***, M. A. Grin***, and A. V. Feofanov*, **, #

#Phone: +7 (495) 336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

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

**Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gori 1/20, Moscow, 119234 Russia

***Institute of Fine Chemical Technology, Moscow Technological University (MIREA), prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

It was found that the photosensitizer dimethyl ether of 13¹-[2-(guanidiny)ethylamino]chlorin e₆ accumulates mainly in lysosomes, partially in endosomes, and does not accumulate in the mitochondria of human lung adenocarcinoma A549 cells. The primary photocytotoxic effect of the photosensitizer is associated with damage of lysosomes and its release in cytoplasm. In cytoplasm, a uniform distribution of the photosensitizer is formed in complexes with membrane structures that are secondary targets of its photoinduced action. Time-dependent morphological signs of paraptosis development were found, which indicate to photodynamic damage of endoplasmic reticulum as a secondary mechanism of photocytotoxic action of the photosensitizer. At this stage, there is another change in the potential cellular targets of the photosensitizer: it is concentrated in the cytoplasmic and nuclear membranes, in the membranes of numerous vacuoles, as well as in lysosomes, which, apparently, continue to form during the development of paraptosis. Thus, the studied derivative of chlorin e₆, as a representative of hydrophobic photosensitizers with intracellular targeting of lysosomes, has a two- or three-stage mechanism of photodynamic action with a sequential change in the cellular targets.

Keywords: photosensitizer, photodynamic therapy, intracellular localization, cell organelles, fluorophore, laser scanning confocal microscopy