DOI: https://doi.org/10.30898/1684-1719.2025.6.13 УДК: 628.953.2; 533.9.082.74

ИЗУЧЕНИЕ ФОТОЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ТЕМНОВОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ УЪ-КОМПЛЕКСА 2,4-ДИ(α-МЕТОКСИЭТИЛ)ДЕЙТЕРОПОРФИРИНА IX ДЛЯ ЦЕЛЕЙ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ФОТОНИКИ

И.П. Шилов¹, Ю.В. Алексеев², А.В. Иванов^{2,4}, В.Д. Румянцева^{1,3}

¹ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН 141190, Фрязино, пл. Введенского, 1

²«Научно-практический центр лазерной медицины им. О.К. Скобелкина» ФМБА России, 121165, Москва, ул. Студенческая, 40

> ³МИРЭА – Российский технологический университет, 119454, Москва, пр. Вернадского, 78

⁴«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 115522, Москва, Каширское ш., 24

Статья поступила в редакцию 18 марта 2025 г.

Аннотация. Проведено исследование фотоцитотоксичности и темновой токсичности Yb-комплекса 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (Yb-ДМДП) для определения дальнейших перспектив его применения в биомедицинской фотонике. МТТ-методом были определены параметры собственной цитотоксичности (темновой) и фотоцитотоксичности Yb-ДМДП. Для темновой цитотоксичности значение параметра 50% выживаемости раковых клеток (IC₅₀) составляла 10^{-5,15} моль/л для клеток Skov-3, а для фототоксичности значение IC₅₀ обладает умеренной собственной (темновой) токсичностью и незначительной

фотоцитотоксичтностью по сравнению с широко применяемым в клинической практике препаратом «Фотодитазин» Низкая фотоцитотоксичность позволит эффективно использовать Yb-ДМДП в процессах ИК-люминесцентной диагностики опухолей, а умеренная темновая цитотоксичность, по всей видимости, может дать возможность его применения в антимикробной терапии без фотовозбуждения.

Ключевые слова: фотоцитотоксичность, темновая цитотоксичность, иттербиевый комплекс порфирина, МТТ-метод, стенд для облучения клеток, фотосенсибилизаторы, фотодинамический эффект.

Финансирование: Работа выполнена в рамках госзадания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН (№ FFWZ-2025-0013) и финансовой поддержки Минобрнауки РФ (проект № FSFZ-2023-0004).

Автор для переписки: Шилов Игорь Петрович, laserlab@ms.ire.rssi.ru

Введение

Известно, что фотосенсибилизаторы (ФС), кроме фотодинамического эффекта могут обладать, так называемым, «темновым» эффектом, то есть, сохраняя повышенную тропность к пролиферирующим и раковым клеткам оказывать на них цитотоксический эффект. В ряде работ показано, что при фотоактивации ФС фотодинамический эффект (ФДЭ) реализуется не только за счет генерации синглетного кислорода, но и за счет образования биологически активных продуктов их фотолиза. Показано, что некоторые металлосодержащие ФС имеют большую фототоксичность, чем безметальные. Так же предполагается, что у патогенных микроорганизмов не должна развиваться резистентность как к темновому эффекту ФС, так и продуктам их фотолиза [1]. В связи с этим исследование различных ФС и их производных на предмет их клинического применения в разделах биомедицинской фотоники, в том числе и для антимикробной терапии имеет важное значение [2,3].

Иттербиевые комплексы порфиринов (ИКП) и в частности иттербиевый комплекс 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (Yb-ДМДП) в последнее

время применяются в ИК-люминесцентной диагностике и контроле за лечением ряда заболеваний [4,5]. Комплекс Yb-ДМДП при этом обладает повышенными фотофизическими свойствами (время жизни люминесценции в 30% растворе ДМСО до 5 мкс, квантовый выход люминесценции до 1%, коэффициент экстинкции составил ~ $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{см}^{-1}$ на длине волны 398 нм). Также ИКП в эксперименте показали их перспективность при тераностике опухолей [6,7]. На их основе разработана фармацевтическая композиция (ФК) в виде геля «Флюроскан» (аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.510608). В последнее время появилось ряд исследований, указывающих на то, что некоторые ИКП, в частности иттербий-октаэтилпорфирин (Yb-OЭП), обладают собственной темновой цитотоксичностью в отношении раковых клеток, существенно превышающий таковую в отношении здоровых [8]. Было показано, что Yb-OЭП могут приводить к апоптозу раковых клеток посредством воздействия на их митохондрии без фотовозбуждения, почти не действуя на здоровые клетки. При этом ИКП, как и другие фотосенсибилизаторы порфиринового ряда, имеют повышенную тропность именно к раковым клеткам. Этими авторами изучалось действие Yb-OЭП на раковые клетки в клеточных линиях типа «Hela». Их данные представлены на рис. 1.

Цитируемые авторы проводили эксперимент следующим образом: клетки были обработаны ИКП в течение 7 часов. Митохондрии окрашены специфической краской типа Mitotracker и исследованы с помощью флуоресцентного микроскопа.

Рис. 1 а – наблюдается вздутие митохондрий;

Рис. 1 б – митохондрии дополнительно окрашены катионной краской типа JC-1 для исследования митохондриального мембранного потенциала. Краска селективно аккумулируется в электрически поляризованной внутренней мембране митохондрии. Обработка ИКП приводит к исчезновению оранжевого цвета, что указывает на потерю митохондриального мембранного потенциала и митохондриальную дисфункцию. При этом отмечается, что 50% выживаемость

раковых клеток (IC₅₀) для Yb-OЭП составляла от 0.34х10⁻⁶ моль/л до 4.5х10⁻⁶ моль/л в зависимости от типа раковых клеток.



Рис. 1. Действие иттербиевого комплекса октаэтилпорфирина на митохондрии в клеточных линиях типа «Hela».

Эти результаты были получены колориметрическим тестом для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест). Исследовались раковые клетки, включая карциному шейки матки (Hela), карциному молочной железы (МСF-7). Примечательно, что он показал 27 и 200-кратное превышение цитотоксичности по сравнению с используемым в клинике препаратом «Цисплатин» в отношении клеток Hela и MCF-7, соответственно. Также ранее другие авторы проводили исследования по изучению воздействия продуктов фотолиза 2,4-ди(1-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX, образующихся при предварительной фотоактивации этого химического соединения на ряд микроорганизмов, где наблюдалось подавление их роста при определенных концентрациях фотосенсибилизатора [9]. Также была показана эффективность

<u>ЖУРНАЛ РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ, eISSN 1684-1719, №6, 2025</u>

2,4-ди(1-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX in vitro при добавлении его культурам ряда патогенных микроорганизмов при моделировании К фотодинамического эффекта с излучением в полосе Соре, приводящая подавлению их биопленкообразования и последующей гибели [10]. К Поэтому представляет интерес изучение применения Уb-ДМДП не только для дифференциальной диагностики и контроля за лечением, но и для подавления патогенной флоры при различных патологических процессах в коже и слизистых оболочках, а также его воздействия на пролиферирующие клетки. Так как Уb-ДМДП входит в состав геля «Флюроскан», разрешенного для наружного применения, то, соответственно, данные, полученные в результате проведенных нами экспериментов, могут быть использованы в клинической практике.

Для этого нами были исследованы фотоцитотоксичность и темновая цитотоксичность Yb-ДМДП на ряде биологических объектов.

1. Материалы и методы.

Синтез Yb-ДМДП проводился по схеме, описанной в [4]. Тестирование фото – и цитотоксичности исследуемого комплекса порфиринов проводили на культивируемых адгезионных клеточных линиях: Skov-3 (карцинома яичника человека), обладающих сходным пролиферативным потенциалом и морфологическим типом. Эксперименты проводили по методу МТТ [8] и повторяли трижды. Цитотоксичность оценивалась в процентах выживших по сравнению с контролем клеток. Тестовым критерием является концентрация препарата, вызывающая 50%-ную гибель клеток IC₅₀.

Эксперименты по изучению фотоцитотоксичности и темновой цитотоксичности Yb-ДМДП проводились на стенде (разработки НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). Стенд предназначен для автоматизированного облучения клеточных культур определенной дозой лазерного излучения (ЛИ). Блок-схема стенда представлена на рис. 2. Доза ЛИ зависит от времени экспозиции образца. В данном случае время экспозиции – это время нахождения образца (тетраплета) над диафрагмой предметного столика. Оно задается

<u>ЖУРНАЛ РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ, eISSN 1684-1719, №6, 2025</u>

исследователем на дисплее компьютера, который управляет процессом перемещения матричной платформы (планшета с культурами клеток) относительно диафрагмы предметного столика.

Методика использования МТТ-метода проводится следующим образом:

 Культуры клеток рассеваются в 96-луночные планшеты (плоскодонные для адгезионных культур или круглодонные – для суспензионных) из расчета 200 µl клеточной суспензии в среде на лунку (20 мл на планшет).

2) Через 24 часа после рассева вносятся определенные дозы исследуемых веществ: цитостатиков, антибиотиков или других токсичных агентов. Концентрации дают в арифметической прогрессии и рассчитывают исходя из того, чтобы IC₅₀ попадала в середину панели. Для построения графика определения IC₅₀ вносят 6-8 концентраций. Дозы вносятся в 2-4 повторах, для контроля оставляют 2-4 лунки без агента.

Через 48 часов вносят реагент для регистрации дегидрогеназной активности ферментов выживших клеток по образованию сине-фиолетовых кристаллов фармазана – 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ реагент) из расчета концентрации 0.5 мг/мл (или 10 µl из stock раствора 5 мг/мл на лунку).

3) Отбирают культуральную среду, не повреждая монослой клеток. Для суспензионных культур предварительно центрифугируют планшеты 10 мин. на 800-1000 об/мин на центрифуге с адаптором для плашек. Лизируют клетки в 60 µl диметилсульфоксида (ДМСО) на лунку и снимают показатели оптической плотности на плашечном ридере (фотометре) фирмы Multiscan.

4) Производят расчет процента гибели клеток по формуле:

$$X = (OD_{sample}/OD_{control}) \cdot 100\%$$
,

где OD – оптическая плотность, и выполняют построение графика зависимости процента гибели клеток (ось Y) от концентрации цитостатика-цитотоксика (ось X).

Для воздействия на клетки могут также использоваться различные фотосенсибилизаторы и источники излучения с длиной волны в полосе их

поглощения. Контроль параметров облучения производится измерителем мощности.

Нами для тестирования темнового и фотоцитотоксического эффектов были выбраны культуры адгезионных клеток, обладающие сходным пролиферативным потенциалом и морфологическим типом. Исследуемым веществом являлся Yb-ДМДП. Исследования проводились по вышеописанной методике. С целью оптимального выбора источника излучения также проведены исследования спектров поглощения Yb-ДМДП. Подобран соответствующий аппарат для облучения клеток.



Рис. 2. Блок-схема стенда для изучения цитотоксичности и фотоцитотоксичности.



Рис. 3. Общий вид стенда для изучения цитотоксичности и фотоцитотоксичности.

Конструкция стенда обеспечивает передвижение матричной платформы (плашки) с точностью ±0.5 мм при шаге 15 мм. Время фиксации плашки на одном месте выдерживается с точностью 0.5 с.

2. Результаты и обсуждение.

Результаты исследования спектров поглощения Yb-ДМДП представлены на рис. 4. Как видно из представленных спектров, максимальное значение поглощения находится в диапазоне длин волн 390-420 нм. В связи с чем в качестве источника излучения для стенда был выбран аппарат на сверхярких светодиодах типа AФC-400 (ООО Полироник), работающий на длине волны 400 нм с полушириной полосы излучения 20 нм при оптической мощности до 200 мВт.



Рис. 4. Электронный спектр поглощения Уb-ДМДП.

Измерение спектров поглощения синтезированных комплексов проводили на спектрофотометре LS-5B, Perkin Elmer.

Были выбраны следующие параметры облучения: 0.7-1Дж/см² на лунку. В этих условиях время облучения одного образца составляло 5-7 минут, а всего 96-луночного планшета – 60-85 минут.

МТТ-методом были определены параметры собственной цитотоксичности (темновой) и фотоцитотоксичности Yb-ДМДП. Для темновой цитотоксичности IC₅₀ составляла $10^{-5,15}$ моль/л для клеток Skov-3, а для фототоксичности значение IC₅₀ составляла $10^{-5,53}$ моль/л. Результаты представлены на рис. 5.



Рис. 5. Определение доз темновой токсичности (1) и фотоцитотоксичности (2) Уb-ДМДП на клетках Skov-3 (ось ординат – выживаемость, %; ось абсцисс – логарифм концентрации С).

Обнаружение фотоцитотоксичности Yb-ДМДП предполагает проведение сравнительного исследования его фотоактивности с одним из разрешенных к клиническому применению фотосенсибилизаторов. В качестве такого препарата был выбран широко используемый в клинической практике отечественный препарат хлоринового ряда «Фотодитазин» – диглюкозаминовая соль хлорина E6. На рис. 6 и 7 представлены показатели его темновой цитотоксичности и фотоцитотоксичности.



Рис. 6. Темновая цитотоксичность «Фотодитазина».



Рис. 7. Фотоцитотоксичность «Фотодитазина».

Из представленных данных следует, что соединение Yb-ДМДП обладает умеренной собственной (темновой) токсичностью и незначительной фотоцитотоксичтностью по сравнению с Фотодитазином (на порядок меньшей).

<u>ЖУРНАЛ РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ, eISSN 1684-1719, №6, 2025</u>

Низкая фотоцитотоксичность позволит эффективно использовать Уb-ДМДП процессах ИК-люминесцентной диагностики опухолей, а умеренная В темновая цитотоксичность по всей видимости может дать возможность его применения и в антимикробной терапии без фотовозбуждения. Установлено также, что разработанный иттербиевый комплекс ДМДП, по сравнению Yb-OЭП обладает значительно меньшей собственной токсичностью, с цитотоксичностью «Цисплатина». Токсикологические сравнимой с но исследования, проведенные нами ранее на опытных животных (лабораторные мыши), показали, что Yb-ДМДП проявляет токсические свойства, близкие в клинической практике применяемым фотодинамической терапии К фотосенсибилизаторам.

Заключение

На основе полученных данных можно сделать выводы о том, что данное химическое соединение, входящее в препарат «Флюроскан», производимый в виде геля для наружного применения, имеет большие перспективы в ряде направлений биомедицинской фотоники. Помимо дифференциальной фотодиагностики и контроля за лечением патологических процессов в коже и слизистых оболочках, гель «Флюроскан», по-видимому, может быть применен и для антимикробной терапии и при некоторых заболеваниях, сопровождающихся избыточной пролиферацией клеток. Для этого необходимо проведение дополнительных исследований по определению чувствительности к ИКП различных патогенных микроорганизмов. После этого, также необходимо проведение клинических исследований с целью определения оптимальных способов применения геля «Флюроскан» при различных дерматологических и гинекологических заболеваниях.

Финансирование: Работа выполнена в рамках госзадания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН (№ FFWZ-2025-0013) и финансовой поддержки Минобрнауки РФ (проект № FSFZ-2023-0004).

Литература

- Алексеев Ю. В., Ширяев В. С., Шевченко И. В., Шветский Ф. М. Обоснование и перспективы применения продуктов фотолиза фотосенсибилизаторов хлоринового ряда для антимикробной терапии в клинической практике // Медицинская физика. – 2024. – №. 3. – С. 92-101. https://doi.org/10.52775/1810-200X-2024-103-3-92-101
- da Fonseca A. S., de Paoli F., Mencalha A. L. Photodynamic therapy for treatment of infected burns // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2022. – V. 38. – P. 102831. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102831
- Suvorov N. V., Shchelkova V. V., Rysanova E. V. et al. New cationic chlorin as potential agent for antimicrobial photodynamic therapy // Biomedical Photonics. 2024. V. 13. №. 3. P. 14-19. https://doi.org/10.24931/2413-9432-2024-13-3-14-19
- Ivanov A. V., Rumyantseva V. D., Shchamkhalov K. S., Shilov I. P. Luminescence diagnostics of malignant tumors in the IR spectral range using Yb-porphyrin metallocomplexes // Laser Phys. – 2010. – V. 20. – №. 12. – P. 2056-2065. https://doi.org/10.1134/S1054660X10220032
- 5. Алексеев Ю. В., Рябов М. В., Дуванский В. А. и др. Клинические аспекты применения иттербиевых комплексов порфиринов для визуализации новообразований В дерматологии // Клиническая дерматология И 2022. T. 21. <u>№</u>. 3. C. 326-332. венерология. https://doi.org/10.17116/klinderma202221031326
- Шилов И. П., Румянцева В. Д., Алексеев Ю. В., Иванов А. В. Иттербиевые комплексы порфиринов в люминесцентной диагностике и тераностике рака // Известия РАН. Серия физическая. – 2020. – Т. 84. – №. 11. – С. 1643-1647. https://doi.org/10.31857/S0367676520110253

- Шилов И. П., Румянцева В. Д., Горшкова А. С., Иванов А. В. О возможности использования иттербиевого комплекса 2,4-ди(аметоксиэтил)дейтеропорфирина IX для тераностики новообразований поверхностной локализации // Журнал радиоэлектроники. – 2024. – №. 4. https://doi.org/10.30898/1684-1719.2024.4.3
- Kwong W. L., Sun R. W. Y., Lok C. N. et al. An ytterbium (III) porphyrin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in cancer cells: cytotoxicity and transcriptomics studies // Chemical Science. – 2013. – V. 4. – №. 2. – P. 747-754. https://doi.org/10.1039/C2SC21541A
- Алексеев Ю. В., Давыдов Е. В., Пономарев Г. В. и др. Перспективы применения продуктов фотолиза 2,4-ди(1-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (димегина) в клинической практике // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15. – №. 1. – С. 6.
- Бондаренко В. М., Алексеев Ю. В., Миславский О. В., Пономарев Г. В. Перспективы применения динатриевой соли 2,4-ди(1метоксиэтил)дейтеропорфирина IX («димегина») для фотодинамической терапии неонкологических заболеваний // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60. – №. 3. – С. 338-347. http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20146003338

Для цитирования:

Шилов И.П., Алексеев Ю.В., Иванов А.В., Румянцева В.Д. Изучение фотоцитотоксичности и темновой цитотоксичности Уb-комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX для целей биомедицинской фотоники. // Журнал радиоэлектроники. – 2025. – № 6. https://doi.org/10.30898/1684-1719.2025.6.13