

УДК 577.3

## ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И НАКОПЛЕНИЕ ЭТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА $E_6$

Зорина Т.Е., Янковский И.В., Зорин В.П.

*Белорусский государственный университет, г. Минск*

Структурные характеристики фотосенсибилизаторов (ФС) имеют большое значение в контроле процессов их накопления и распределения в различных клеточных системах. Наличие катионных или анионных групп, симметрия расположения боковых заместителей в порфириновой молекуле существенным образом сказываются на фармакокинетических характеристиках пигментов. Снижение полярности молекул сенсибилизатора при замещении полярных боковых групп может приводить к значительному увеличению доли пигмента, связывающегося с клеточными элементами крови (по отношению к белкам крови). Количественный показатель степени полярности ФС коэффициент распределения октанол – вода (Р), можно использовать для прогноза высокого сродства и высокой скорости диффузии пигментов в мембранных структурах [1].

В данной работе изучено распределение и проведена оценка уровня накопления в клетках ФС с различными структурными характеристиками: хлорина  $e_6$  (Хл  $e_6$ ), диметилового эфира хлорина  $e_6$  (ДМЭ), триметилового эфира хлорина  $e_6$  (ТМЭ). Величина коэффициента Р для исследованных пигментов меняется в значительных пределах: Хл  $e_6$  – 1,0; ДМЭ – 23; ТМЭ – 54. Работа проведена на лейкоцитах крови, культуральных клетках K562 и Raji.

Локализацию и накопление ФС в клетках изучали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии на флуоресцентном микроскопе Leica TCS SPE (Германия).

Из анализа полученных изображений следует, что Хл  $e_6$  и его производные имеют различные кинетики накопления в клетках. Процесс связывания Хл  $e_6$  проходит в 2 стадии. Первая фаза – быстрая, длящаяся несколько секунд, вторая фаза кинетики накопления протекает на протяжении нескольких часов. Исследования процессов накопления ФС, выполненные ранее, позволяют сделать вывод, что быстрое накопление отражает связывание пигментов с плазматической мембраной клетки. Вторая фаза отражает процессы трансмембранного переноса и локализации ФС во внутриклеточных компартментах [1]. Ин-

тегральная интенсивность флуоресценции Хл  $e_6$ , ДМЭ, ТМЭ, в культуральных клетках K562 при инкубировании в одинаковых условиях через 2 часа составляла  $64,6 \pm 5,3$ ;  $530,3 \pm 23,2$ ;  $140,2 \pm 8,1$  отн.ед., соответственно. Такое соотношение уровней накопления исследованных ФС коррелирует с данными, полученными с использованием метода проточной цитометрии как на культуральных клетках, так и на лейкоцитах крови. Этерифицированные прозводные накапливаются в клетках в значительно больших количествах, чем Хл  $e_6$ , что определяется структурными особенностями пигментов. Так, умеренно неполярный ДМЭ, имеющий относительно высокую диффузионную подвижность, с максимальной скоростью проникает через плазматическую мембрану, накапливается в клетках в концентрации, в несколько раз превышающей концентрацию полярного Хл  $e_6$ , для которого характерны более низкие значения константы скорости трансмембранного перемещения. Необходимо отметить, что существуют различия в уровне накопления ФС, обусловленные размерами клеток и их структурно – морфологическими особенностями.

Результаты флуоресцентно – микроскопического анализа показали также наличие существенных различий в характере внутриклеточной локализации Хл  $e_6$  и его этерифицированных прозводных. В первые минуты инкубирования наблюдается флуоресцентное свечение Хл  $e_6$  только в составе плазматической мембраны, лишь через 10-20 минут окрашивания в цитоплазме регистрируется свечение Хл  $e_6$ , превышающее по интенсивности аутофлуоресценцию клеток. В случае ДМЭ и ТМЭ интенсивность флуоресценции цитоплазмы заметно выше уже в первые минуты инкубирования. Кроме того, существенно отличается характер внутриклеточного распределения: в случае ТМЭ выделяются отдельные области, имеющие интенсивность флуоресценции на порядок выше, чем в среднем по цитоплазме. Для ДМЭ наблюдается высокая скорость накопления, яркая флуоресценция и относительно равномерное распределение ФС в цитоплазме клетки. Для всех исследуемых хлоринов флуоресценция в области ядра клетки отсутствует.

Для идентификации сайтов внутриклеточной локализации хлоринов применяли флуоресцентные колокализаторы. Нами использовались флуоресцентные зонды, обладающие высокой избирательностью накопления в органеллах: митохондриальный зонд Mito Tracker Green CMX ( $\lambda_{ex}=490$  нм;  $\lambda_{em}=516$  нм) и лизосомальный зонд Mito Tracker Green DND ( $\lambda_{ex}=504$  нм;  $\lambda_{em}=511$  нм). Флуоресценция колокализатора исследовалась в канале, регистрирующем излучение в диапазоне 505-550 нм. В другом канале (620-700 нм) регистрировалась флуоресценция ФС. Наложение изображений двух каналов позволяет проанализировать характер распределения зонда и исследуемого ФС в клетке.

Сравнение флуоресценции CMX и Хл  $e_6$  показало, что корреляция между локализацией пигмента и митохондриального зонда практически отсутствует. В случае ДМЭ наблюдается слабая корреляция между флуоресценцией ФС и CMX, что позволяет сделать заключение о частичной локализации ДМЭ в митохондриях. Распределение флуоресценции ТМЭ по телу клетки гетерогенно,

при этом места локализации пигмента совпадают с областями флуоресценции зонда CMX, что свидетельствует о локализации значительной части ТМЭ в составе митохондрий. Исследования с лизосомальным зондом показали отсутствие корреляции между локализацией DND и флуоресценцией исследуемых хлоринов. Таким образом, отличия физико-химических свойств пигментов существенно влияют на способность ФС локализоваться в определенных структурных элементах клетки.

Полученные результаты показывают, что этерификация карбоксильных групп Хл е<sub>6</sub> влияет на кинетику и характер распределения, а также существенно изменяет их способность накапливаться в клетках, что может быть использовано для повышения эффективности фототерапии рака.

*Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б11Ф-004.*

#### **Литература:**

1. Зорин, В.П., Хлудесв, И.И., Зорина, Т.Е. Распределение порфириновых сенситизаторов между белковыми и клеточными элементами крови // Биофизика. – 2000. – Т. 45, вып.2. – С. 313-319.

#### **INTRACELLULAR LOCALIZATION AND ACCUMULATION OF CLORINE E<sub>6</sub> DERIVATIVES**

Zorina T.E., Yankovsky I.V., Zorin V.P.

*The influence of the chemical structure of chlorine photosensitizers on their localization and accumulation has been examined.*