



Оригинальное исследование  
УДК 615.31  
<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-4-12>

## ФОТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ ХЛОРИНА Е6

Ольга Вячеславовна Шевченко<sup>1✉</sup>, Наталья Геннадьевна Плехова<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

<sup>1✉</sup>[tarakovaolga@gmail.com](mailto:tarakovaolga@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-3113-3995>

<sup>2</sup>[pl\\_nat@hotmail.com](mailto:pl_nat@hotmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-8701-7213>

**Аннотация.** Проведено исследование фотодинамического потенциала соединения, содержащего природный фотосенсибилизатор (ФС) порфиринового ряда Хлорин Е6 и редкоземельный металл европий (полиэтиленмин/Хлорин Е6/диэтиленетриаминпентауксусная кислота/фолиевая кислота/европий, PEI/e6/DTPA/FA/Eu). Спектрофотометрическим способом подтвержден состав молекулярного конъюгата, содержащего ФС. Показано, что при воздействии полупроводниковым лазером красного света ( $\lambda=645$  нм) в течение 20 мин. молекулярный конъюгат в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) способен продуцировать активные формы кислорода (АФК). После 1 сут. контакта с 1,56 мкг/мл молекулярного конъюгата и культурой асцитной аденокарциномы Эрлиха количество некротизированных клеток составляло  $78,0\pm 3,9$  %, что указывало на его цитотоксическое действие. Наибольший фототоксический эффект PEI/e6/DTPA/FA/Eu проявлялся через 4 сут. После контакта клеток с 12,5 мкг/мл PEI/e6/DTPA/FA/Eu и облучения процент нежизнеспособных составил  $81,5\pm 4,1$  %, тогда как, для свободного Хлорина Е6  $47,4\pm 2,4$  %. Полученные результаты являются перспективной основой для дальнейших исследований потенциального фотосенсибилизатора.

**Ключевые слова:** фотосенсибилизатор, Хлорин Е6, европий, молекулярный конъюгат, фототоксичность, клетки аденокарциномы Эрлиха, красный свет, фотодинамическая терапия

**Для цитирования:** Шевченко О.В. Фототоксическое действие молекулярного конъюгата на основе Хлорина Е6 / О.В. Шевченко, Н.Г. Плехова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2023. – № 4. – С. 69-73.  
<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-4-12>.

## PHOTOTOXIC EFFECT OF A NEW MOLECULAR CONJUGATE BASED ON CHLORIN E6

Olga V. Shevchenko<sup>1✉</sup>, Natalia G. Plekhova<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

<sup>1✉</sup>[tarakovaolga@gmail.com](mailto:tarakovaolga@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-3113-3995>

<sup>2</sup>[pl\\_nat@hotmail.com](mailto:pl_nat@hotmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-8701-7213>

**Abstract.** The photodynamic potential of a compound containing a natural photosensitizer (PS) of the porphyrin series Chlorin e6 and rare earth metal europium (polyethyleneimine/Chlorin e6/diethylenetriaminepentaacetic acid/folic acid/europium, PEI/e6/DTPA/FA/Eu) was studied. Spectrophotometric method confirmed the composition of the molecular conjugate containing PS. It has been shown that due to the expose of a semiconductor laser of red light ( $\lambda=645$  nm) for 20 min the molecular conjugate in phosphate-buffered saline (PBS) is capable to produce reactive oxygen species (ROS). After 1 day of contact with 1,56  $\mu\text{g/ml}$  of the molecular conjugate and the culture of Ehrlich's ascitic adenocarcinoma the number of necrotic cells was  $78,0\pm 3,9$  %, indicating its cytotoxic effect. The higher phototoxic effect of PEI/e6/DTPA/FA/Eu was manifested after 4 days. After contact of cells with 12,5  $\mu\text{g/ml}$  PEI/e6/DTPA/FA/Eu and irradiation the percentage of non-viable cells was  $81,5\pm 4,1$  %, while for free Chlorin e6 it was  $47,4\pm 2,4$  %. The results obtained are a promising basis for further studies of a potential photosensitizer.

**Keywords:** photosensitizer, Chlorin e6, europium, molecular conjugate, phototoxicity, Ehrlich adenocarcinoma cells, red light, photodynamic therapy



**For citation:** Shevchenko O.V. Phototoxic effect of a new molecular conjugate based on Chlorin E6 / O.V. Shevchenko, N.G. Plekhova // Far Eastern medical journal. – 2023. – № 4. – P. 69-73. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2023-4-12>.

Перспективы применения метода фотодинамической терапии (ФДТ) связаны с неинвазивностью и селективностью в отношении опухолевых клеток. Известные в настоящее время ФС обладают рядом свойств, таких как многоступенчатый дорогостоящий синтез, поэтапная очистка, малая растворимость вещества в биологических жидкостях, нестабильность на свету, которые в целом могут оказывать влияние на финансовые затраты применяемого метода терапии [1]. Одним из направлений исследований в области ФДТ является разработка ФС нового

поколения методами модификации физико-химических свойств природных компонентов [2, 3]. Возможным вариантом проведения целенаправленного синтеза является включение тяжелых металлов в структуру ФС для улучшения фотостабильности, фотофизических и фотохимических свойств [4]. Целью настоящего исследования является оценка фототоксического эффекта молекулярного конъюгата на основе фотосенсибилизатора Хлорина Е6 на клетки асцитной аденокарциномы Эрлиха.

### Материалы и методы

Определение оптической плотности растворов фотосенсибилизаторов Хлорина Е6 и молекулярного конъюгата полиэтиленмин/Хлорин Е6/диэтилентриаминпентауксусная кислота/фолиевая кислота/европий (PEI/e6/DTPA/FA/Eu) и построение спектра их поглощения в фосфатно-солевом буфере (рН=7,4) проводили на спектрофлуориметре Synergy H1 (BioTek, США) в диапазоне длин волн 300-700 нм с интервалом 1 нм при температуре 21 °С. Оптимальное время облучения ФС красным светом полупроводникового лазера (ООО «Свет и жизнь», Россия) с  $\lambda=645$  нм подбирали в диапазоне от 5 до 30 мин с интервалом в 5 мин в условиях отсутствия прямого солнечного света в концентрациях от 10 до 50 мкг/мл в ФСБ.

Биологические эффекты молекулярного конъюгата в концентрациях 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 мкг/мл оценивали при воздействии на культуру клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха (ААЭ), которую получали путем внутрибрюшинной инокуляции половозрелым самцам мышей ICR линии CD-1, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» (Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова). Манипуляции с животными проводились в соответствии с положениями Хельсинкской декларации, требований Европейской конвенции по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, дизайн исследования одобрен междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 17.01.2022 г.).

Суспензию клеток разносили в 96-луночные планшеты по 200 мкл в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (Dulbecco's modified Eagles medium, DMEM, Lonza, Verviers, Бельгия), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies Inc., США) и 0,05 % гентамицина (Sigma Aldrich, США). Подготовленную культуру помещали в инкубировали при 5 %  $\text{CO}_2$ , 37 °С в течение суток, производили замену среды и вносили Хлорин Е6 и PEI/E6/DTPA/FA/Eu в концентрациях 1,56; 3,125; 6,25 и 12,5 мкг/мл и через сутки

тестировали на жизнеспособность с помощью метода, позволяющего оценивать способность восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) в формазан. В каждую лунку планшета с клетками и препаратами вносили по 10 мкл МТТ (Merk, США) и инкубировали 4 часа. Далее добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, Химреактив, Россия) для разрушения образовавшегося формазана. Оптическую плотность субстратов определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм, используя абсорбцию при  $\lambda=800$  нм в качестве референса. Поскольку используемые методики основываются на оптических методах, в качестве исследуемых концентраций выбирали диапазон от 0,78 мкг/мл до 50 мкг/мл в целях соблюдения основного закона светопоглощения (закон Бугера-Ламберта-Бера), так как изучаемые ФС представляют собой растворы темно-зеленого цвета.

Фототоксический эффект молекулярного конъюгата PEI/e6/DTPA/FA/Eu в отношении клеток оценивали методом проточной цитометрии после окрашивания 1 мкг/мл 7-Аминоактиномицином Д (7-AAD, Abcam, США). Клетки с Хлорином Е6 и PEI/e6/DTPA/FA/Eu облучали полупроводниковым лазером красного света с  $\lambda=645$  нм в течение 20 мин. и инкубировали в течение 1 и 4 сут. с последующим окрашиванием [5]. Количество флуоресцирующих клеток с включением зонда 7-AAD оценивали на проточном лазерном цитофлуориметре MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) при возбуждении  $\lambda=520$  нм и 570 нм. Обработку данных проводили, используя программу MACSQuantify™ Software v/2/5 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия).

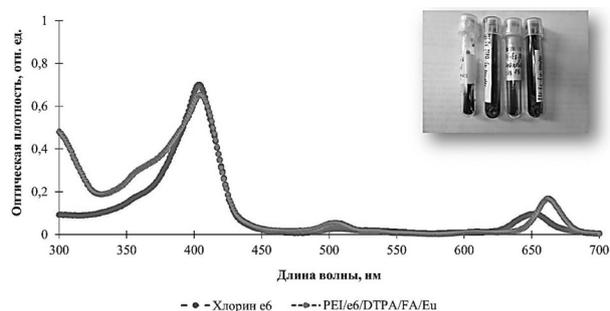
Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программ Microsoft Excel 2010, STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США). Проверка на нормальное распределение количественных показателей выборок проводилась с использованием критериев Шапиро-Уилка и Крамера-Мизеса-Смирнова ( $\omega^2$ ). Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .



### Результаты и обсуждение

Хлорин Е6 представляет собой светочувствительное соединение порфиринового ряда, выделяемое из сине-зеленых водорослей [6, 7]. На основе Хлорина Е6 получен ряд фотосенсибилизаторов второго поколения, широко применяемых для проведения ФДТ [8-10]. Особенностью этого ФС является высокий коэффициент поглощения красного света в области 405 и 660 нм, излучаемых медицинскими лазерами [8].

Синтезированный нами ранее [11] молекулярный конъюгат имеет максимумы поглощения в области 403 и 662 нм, характерные для входящего в состав Хлорина Е6 (рис. 1).



**Рис. 1.** Спектр поглощения Хлорина Е6 и молекулярного конъюгата PEI/E6/DTPA/FA/Eu в концентрации 50 мкг/мл

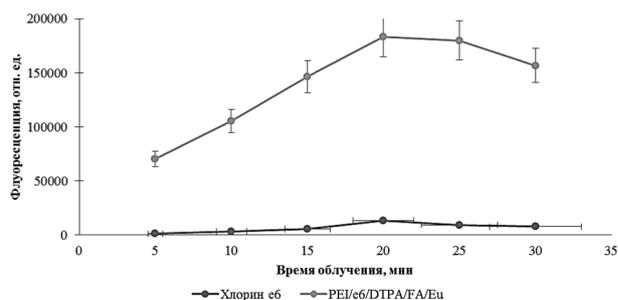
*Примечание.* В правом верхнем углу расположено изображение синтезированного молекулярного конъюгата.

Одним из недостатков метода ФДТ является неконтролируемое уменьшение количества ФС («фотовыгорание») за счет его деградации при дневном свете и в процессе облучения. Молекулы ФС в таком случае повреждаются и теряют способность флуоресцировать, что приводит к уменьшению или полному отсутствию сигнала и их способности излучать энергию. Известно, что изменение величины флуоресценции пропорционально степени окисления молекул зонда активными формами кислорода, что позволяет определить оптимальное время облучения и оценить степень «фотовыгорания» ФС [12].

В рамках настоящего исследования с применением флуорогенного зонда 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетата, который под действием АФК окисляется до 2',7'-дихлорфлуоресцеина показано, что наиболее оптимальным временем воздействия красного света с  $\lambda=645$  нм на синтезируемое соединение является 20 мин (рис. 2).

Процесс облучения светочувствительных соединений неизбежно сопряжен с изменением оптической плотности ФС после воздействия источника излучения. По окончании 30 мин. воздействия на вещества, растворенные в ФСБ, содержание Хлорина

Е6 уменьшилось от  $183,81 \pm 18,83$  мкг/мл до  $136,27 \pm 13,63$  мкг/мл, в то время как молекулярного конъюгата от  $200,73 \pm 20,07$  мкг/мл до  $154,91 \pm 15,49$  мкг/мл. Стоит отметить, что наибольшая интенсивность выгорания отмечалась для ФС в концентрации 7 мкг/мл, причем после 30 мин. воздействия красным светом концентрация Хлорина Е6 составляет  $3,89 \pm 0,19$  мкг/мл и  $6,11 \pm 0,31$  мкг/мл для PEI/e6/DTPA/FA/Eu.



**Рис. 2.** Флуоресценция свободного и конъюгированного 15 мкг/мл Хлорина Е6 в присутствии 4 мкг/мл зонда при облучении красным светом лазера  $\lambda=645$  нм

Результаты исследования жизнеспособности опухолевых клеток показали, что при концентрации 0,78 мкг/мл PEI/e6/DTPA/FA/Eu через сутки инкубации, количество жизнеспособных составило  $80,0 \pm 4,0$  %, тогда как, при 1,56; 3,125; 6,25 и 12,5 мкг/мл этот процент варьировал от  $78,0 \pm 3,9$  % до  $55 \pm 2,8$  %. При более высоких концентрациях показатель возрастал и составил 78-80 %. Для контрольных интактных клеток без воздействия ФС отмечена 100 % выживаемость клеток.

Исследование цитотоксического эффекта ФС с применением интеркалирующего красителя 7-AAD позволяет идентифицировать клетки с неповрежденными плазматическими мембранами, поскольку не проникает в них. Установлено, что количество нежизнеспособных клеток Эрлиха через 1 сут. после контакта с конъюгатом в минимальной концентрации 1,56 мкг/мл и облучения составило  $3,54 \pm 0,18$  % со свободным Хлорином Е6  $22,52 \pm 1,13$  %. При максимальной концентрации 12,5 мкг/мл ФС через 4 сут. составило  $81,49 \pm 4,07$  % и  $47,37 \pm 2,37$  % соответственно, что указывало на более мощный цитотоксический потенциал PEI/e6/DTPA/FA/Eu по сравнению с Хлорином Е6.

Таким образом, проведено исследование фотодинамических свойств нового молекулярного конъюгата PEI/e6/DTPA/FA/Eu и его эффективности в качестве потенциального ФС, эффективного в отношении гибели опухолевых клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха.

### Выводы

1. Синтезированный молекулярный конъюгат состава PEI/e6/DTPA/FA/Eu имеет в спектре поглощения максимумы в областях 403 и 662 нм, что

качественно и количественно подтверждает включение фотосенсибилизатора Хлорина Е6 в структуру вещества.



2. Оптимальным временем воздействия красного света с  $\lambda=645$  нм на растворы молекулярного конъюгата и Хлорина Е6 является 20 мин. интервал.

3. Установлено, что молекулярный конъюгат PEI/е6/DTPA/FA/Eu в совокупности с 20 мин. облучением

красным светом с  $\lambda=645$  нм облучением обладает более мощным цитотоксическим потенциалом в отношении опухолевых клеток Эрлиха, чем свободный Хлорин Е6.

#### Список источников

1. Клименко И.В., Лобанов А.В. Биосовместимые супрамолекулярные системы на основе Хлорина Е6 // Актуальные аспекты химической технологии биологически актив-А43. – 2020. – С. 179.
2. Миронычева А.М., Кириллин М.Ю., Хиллов А.В., Малыгина А.Ш., Куракина Д.А., Гутаковская В.Н., Гамаюнов С.В. Комбинированное применение двухволнового флуоресцентного мониторинга и бесконтактной термометрии при фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи // Современные технологии в медицине. – 2020. – Т. 12, № 3. – С. 47-54.
3. Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Турубанова В.Д., Альзеибак Р., Балалаева И.В., Ведунова М.В. Сравнительный анализ действия фотосенсибилизаторов фотосенс, фотодитазин и гипериперин на клетки глиомы и первичные нейрональные культуры in vitro // Современные технологии в медицине. – 2019. – Т. 11, № 4. – С. 52-63.
4. Amirshaghghi A., Yan L., Miller J., Daniel Y., Stein J.M., Busch T.M., Tsourkas A. Chlorin e6-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) nanoclusters as a theranostic agent for dual-mode imaging and photodynamic therapy // Scientific reports. – 2019. – Т. 9, № 1. – P. 2613. doi.org/10.1038/s41598-019-39036-1.
5. Dymek M., Sikora E. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems – The current state // Advances in Colloid and Interface Science. – 2022. – P. 102757, doi.org/10.1016/j.cis.2022.102757.
6. Haussmann K., Streitz M., Takvorian A., Grund J., Skenderi Z., Tietze-Bürger C., Bullinger L. Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products // Scientific Reports. – 2022. – Т. 12, № 1. – P. 17995, doi.org/10.1038/s41598-022-22339-1.
7. Kawasaki R., Ohdake R., Yamana K., Eto T., Sugikawa K., Ikeda A. Photodynamic therapy using self-assembled nanogels comprising chlorin e6-bearing pullulan // Journal of Materials Chemistry B. – 2021. – Т. 9, № 32. – P. 6357-6363, doi.org/10.1039/D1TB00377A.
8. Kubrak T.P., Kołodziej P., Sawicki J., Mazur A., Kozirowska K., Aebisher, D. Some natural photosensitizers and their medicinal properties for use in photodynamic therapy // Molecules. – 2022. – Т. 27, № 4. – P. 1192. doi.org/10.3390/molecules27041192.
9. Nguyen, V. N., Yan, Y., Zhao, J., & Yoon, J. Heavy-atom-free photosensitizers: from molecular design to applications in the photodynamic therapy of cancer // Accounts of chemical research. – 2020. – Т. 54, № 1. – P. 207-220, doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00606.
10. Shevchenko O.V., et al. Europium-Containing Conjugate for Photodynamic Therapy of Malignant Neoplasms // Russian Journal of Inorganic Chemistry. – 2022. – Т. 67, № 9. – P. 1361-1367, doi.org/10.1134/S003602362209011X.
11. Shi J., Zeng Q., Wang P., Chang Q., Huang J., Wu M., Wang H. A novel chlorin e6 derivative-mediated photodynamic therapy STBF-PDT reverses photoaging via the TGF- $\beta$  pathway // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2023. – Т. 41. – P. 103321, doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103321.
12. Sztandera K., Gorzkiewicz M., Klajnert-Maculewicz B. Nanocarriers in photodynamic therapy – in vitro and in vivo studies // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2020. – Т. 12, № 3. – P. e1509, doi.org/10.1007/s11051-023-05701-w.

#### References

1. Klimenko I.V., Lobanov A.V. Biocompatible supramolecular systems based on Chlorin E6 // Current aspects of chemical technology biologically active-A43. – 2020. – P. 179.
2. Mironycheva A.M., Kirillin M.Yu., Khilov A.V., Malygina A.Sh., Kurakina D.A., Gutakovskaya V.N., Gamayunov S.V. Combined use of dual-wave fluorescent monitoring and non-contact thermometry in photodynamic therapy of basal cell skin cancer // Modern Technologies in Medicine. – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. 47-54.
3. Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Turubanov V.D., Alzeibak R., Balalaeva I.V., Vedunova M.V. Comparative analysis of the effects of photosensitizers photosens, photoditazine and hypericin on glioma cells and primary neuronal cultures in vitro // Modern Technologies in Medicine. – 2019. – Vol. 11, № 4. – P. 52-63.
4. Amirshaghghi A., Yan L., Miller J., Daniel Y., Stein J.M., Busch T.M., Tsourkas A. Chlorin e6-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) nanoclusters as a theranostic agent for dual-mode imaging and photodynamic therapy // Scientific reports. – 2019. – Т. 9, № 1. – P. 2613. doi.org/10.1038/s41598-019-39036-1.
5. Dymek M., Sikora E. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems – The current state // Advances in Colloid and Interface Science. – 2022. – P. 102757, doi.org/10.1016/j.cis.2022.102757.



6. Haussmann K., Streitz M., Takvorian A., Grund J., Skenderi Z., Tietze-Bürger C., Bullinger L. Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products // *Scientific Reports*. – 2022. – Т. 12, № 1. – P. 17995, doi.org/10.1038/s41598-022-22339-1.
7. Kawasaki R., Ohdake R., Yamana K., Eto T., Sugikawa K., Ikeda A. Photodynamic therapy using self-assembled nanogels comprising chlorin e6-bearing pullulan // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2021. – Т. 9, № 32. – P. 6357-6363, doi.org/10.1039/D1TB00377A.
8. Kubrak T.P., Kotodziej P., Sawicki J., Mazur A., Koziorowska K., Aebisher D. Some natural photosensitizers and their medicinal properties for use in photodynamic therapy // *Molecules*. – 2022. – Т. 27, № 4. – P. 1192. doi.org/10.3390/molecules27041192.
9. Nguyen V. N., Yan Y., Zhao J. & Yoon J. Heavy-atom-free photosensitizers: from molecular design to applications in the photodynamic therapy of cancer // *Accounts of chemical research*. – 2020. – Т. 54. – № 1. – P. 207-220, doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00606.
10. Shevchenko O.V., et al. Europium-Containing Conjugate for Photodynamic Therapy of Malignant Neoplasms // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. – 2022. – Т. 67, № 9. – P. 1361-1367, doi.org/10.1134/S003602362209011X.
11. Shi J., Zeng Q., Wang P., Chang Q., Huang J., Wu M., Wang H. A novel chlorin e6 derivative-mediated photodynamic therapy STBF-PDT reverses photoaging via the TGF- $\beta$  pathway // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2023. – Т. 41. – P. 103321, doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103321.
12. Sztandera K., Gorzkiewicz M., Klajnert-Maculewicz B. Nanocarriers in photodynamic therapy – in vitro and in vivo studies // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2020. – Т. 12, № 3. – P. e1509, doi.org/10.1007/s11051-023-05701-w.

**Вклад авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Contribution of the authors:** the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.

**Статья принята к публикации** 11.10.2023.

**The article was accepted for publication** 11.10.2023.

