

УДК [612.118.22 + 576.314 + 57.085.2]:547.8

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРОФИЛЛА α В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК КРОВИ

¹Криштоп В.В., ¹Пахрова О.А., ^{1,2,3}Кустов А.В., ⁴Худяева И.С., ⁴Белых Д.В.,
^{2,3}Макаров В.В., ²Кручин С.О., ³Березин Д.Б.

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Иваново, e-mail: chrishtop@isma.ivanovo.ru;

²ФГБУН «Институт химии растворов им. Г.А. Крестова» Российской академии наук, Иваново;

³Научно-исследовательский институт макрогетероциклов ФГБОУ ВО «Ивановский
государственный химико-технологический университет, Иваново;

⁴ФГБУН «Институт химии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук», Сыктывкар

С использованием современного подхода к оценке биологических эффектов новых химических соединений проведено исследование цитотоксических свойств потенциальных фотосенсибилизаторов (ФС) хлоринового типа в отношении клеток крови *in vitro*. Для этого инкубировали цельную кровь белых крыс с исследуемыми веществами в концентрациях 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} и $5 \cdot 10^{-3}$ моль/кг в течение 0,5; 1; 2; 3 и 4 часов и определили поверхностную цитоархитектонику эритроцитов. Обнаружен последовательный рост темновой токсичности макрогетероциклов в отношении эритроцитов в исследуемом ряду соединений при переходе от незаряженного фотосенсибилизатора к соединениям, несущим соответственно одну, две и три полярных катионных группы. Очевидно, все рассматриваемые ФС в ходе эксперимента проникают через клеточные мембраны эритроцитов, при этом более полярные молекулы, накапливаясь в цитозоле клетки, проявляют более высокую цитотоксичность.

Ключевые слова: фотосенсибилизаторы, цитотоксичность, цитоархитектоника эритроцитов, *in vitro*

CYTOTOXIC PROPERTIES OF CHEMICALLY MODIFIED CHLOROPHYLL α DERIVATIVES AGAINST BLOOD CELLS

¹Krishtop V.V., ¹Pakhrova O.A., ^{1,2,3}Kustov A.V., ⁴Khudyaeva I.S.,
⁴Belykh D.V., ^{2,3}Makarov V.V., ²Kruchin S.O., ³Berezin D.B.

¹Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Ivanovo State Medical Academy»
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo, e-mail: chrishtop@isma.ivanovo.ru;

²G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ivanovo;

³Research Institute of Chemistry of Macrocyclic Compounds of Federal State Budgetary Institution
of Higher Professional Education «Ivanovo State University of Chemistry and Technology», Ivanovo;

⁴Institute of Chemistry of Komi scientific center of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

Using a modern approach to the evaluation of the biological effects of new chemical compounds the cytotoxic properties of potential photosensitizers (PS) of chlorin type with regard to blood cells are studied *in vitro*. For this purpose, whole blood of white rats was incubated with the test substances in concentrations of 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} and $5 \cdot 10^{-3}$ mol/kg for 0,5, 1, 2, 3 and 4 hours and the surface cytoarchitectonics of erythrocytes was determined. Consistent growth of macroheterocycles dark toxicity against red blood cells was detected in the series of compounds studied on going from an uncharged photosensitizer to compounds, bearing one, two or three polar cationic groups, respectively. Obviously, all the considered in an experiment PSs, penetrate cell membranes of erythrocytes, meantime, the more polar molecules accumulated in the cell cytosol exhibit greater cytotoxicity.

Keywords: photosensitizers, cytotoxicity, cytoarchitectonics of erythrocytes, *in vitro* study

Фотодинамическая терапия (ФДТ) и связанная с ней флуоресцентная диагностика (ФД) представляют собой принципиально новую стратегию обнаружения и лечения ряда заболеваний, основанную на накоплении в патологических клетках особых веществ – фотосенсибилизаторов (ФС), что позволяет визуализировать их в режиме реального времени и эффективно-

но разрушать путем запуска каскада фотохимических реакций с помощью видимого света [11–13, 15]. К настоящему времени в клинической практике используется множество ФС для диагностики и лечения онкологических заболеваний, бактериальных инфекций, псориаза и т.д. [11, 12]. Большинство препаратов представляют собой малотоксичные водорастворимые субстанции,

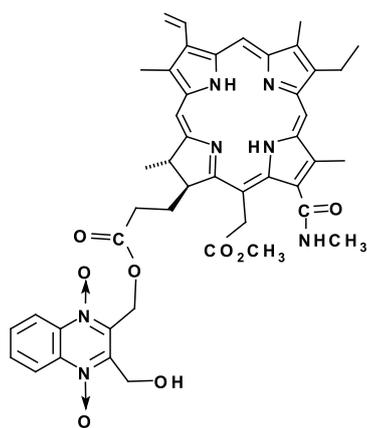
обычно вводимые в организм внутривенно капельно в дозе 0,5–2,5 мг/кг веса либо аппликационно непосредственно в очаг воспаления. Основным побочный эффект при проведении ФДТ – достаточно длительный период остаточной фототоксичности [12, 14]. Вследствие этого пациентам рекомендуется после проведения сеанса избегать воздействия прямых солнечных лучей на открытые участки кожи от нескольких дней до двух и более месяцев в зависимости от использованного ФС [11, 12].

Что касается каких-либо системных эффектов, связанных с токсическим воздействием ФС на организм в целом, многочисленные исследования указывают на крайне малую токсичность используемых препаратов [11, 13, 15]. В частности, один из наиболее часто используемых ФС хлоринового ряда «Фотолон» имеет величину летальной дозы LD_{50} порядка 200 мг/кг веса, что почти в 100 раз выше максимально используемых доз при проведении

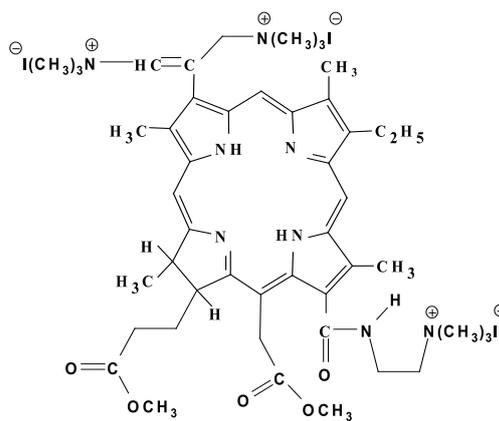
ФДТ. Тем не менее информация о взаимодействии как самих ФС, так и используемых при приготовлении их лекарственных форм различных добавок с биообъектами важна для оценки токсичности и взаимодействия с биомембранами [1].

Ранее [2, 5, 14] нами был получен и протестирован ряд растворимых в воде или водных растворах ПАВ ФС хлоринового типа (соединения I–IV), обладающих значительной фототоксичностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов при культивировании последних в жидких средах с содержанием фотосенсибилизатора $5 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ моль/кг и облучении видимым светом с плотностью энергии 40 Дж/см² и длиной волны 660 нм.

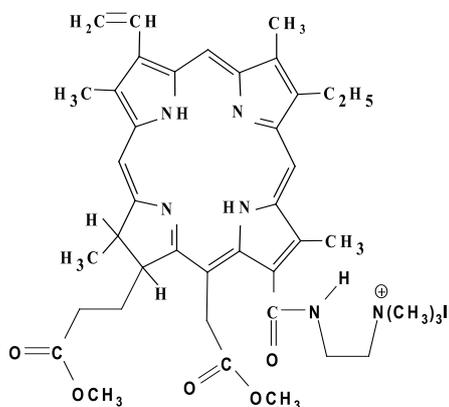
Полученные результаты позволили предложить исследованные соединения в качестве потенциальных ФС для борьбы с различными, в том числе резистентными к антибиотикам, штаммами микроорганизмов.



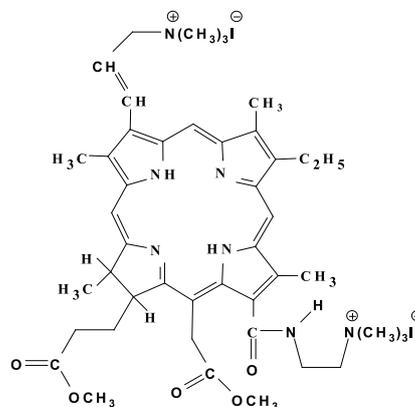
I



II



III



IV

В моделях культуры тканей или при моделировании *in vivo* разнообразие экспрессируемых участков генома клеточных диферонов, а как следствие, и тканеспецифичные особенности метаболизма, обуславливают широкий спектр цитотоксических проявлений воздействия экзогенных химических агентов. В связи с этим мембрана эритроцитов рассматривается в качестве удобной интегральной модели строения, свойств и типовых реакций плазматических мембран клеток различных тканей и органов человека. Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов является чутким маркером различных неблагоприятных воздействий на организм [6, 7, 9].

Цель исследования

Оценить вероятное защитное действие и темновую токсичность ряда заряженных и незаряженных производных хлорофилла α на клетки крови *in vitro*.

Материалы и методы исследования

В работе использовался современный подход к оценке биологических эффектов новых химических соединений путем тестирования веществ на клетках крови *in vitro*.

В качестве объектов исследования выступали четыре потенциальных фотосенсибилизатора: 13(1)-N-метиламид, 17(3)-[2,3-дигидроксиметил-1,4-хиноксалиниловый эфир] хлорина e_6 (I), 3(1),3(2)-бис-(N'N''N''')-триметиламинометил)-13(1)-(N'N'N''')-триметиламиноэтил)амид хлорина e_6 триодид (II), 13(1)-(N'N'N''')-триметиламиноэтил) амид хлорина e_6 йодид (III) и 3(1),3(2)-бис-(N'N'N''')-триметиламинометил)-13(1)-N-метиламид хлорина e_6 дейодид (IV). Соединения были синтезированы, очищены и спектрально идентифицированы в соответствии с методиками, представленными в работах [11, 15].

Растворы макрогетероциклов I–IV в 0,9% водном растворе NaCl, содержащем от 1 до 3 массовых процентов ТВИН 80 (Panreac, EU), готовили следующим образом: растворяли навески ФС и сольубилизатора в легколетучем органическом растворителе, затем с целью повышения растворимости ФС в воде через включение его в мицеллу ПАВ, сосаждали компоненты раствора путем полного выпаривания растворителя; полученную матрицу растворяли в изотоническом растворе NaCl.

Цельную кровь белых крыс инкубировали с исследуемыми веществами в исходной концентрации (до разбавления) 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} и $5 \cdot 10^{-3}$ моль/кг в течение 0,5, 1, 2, 3 и 4 часов, причем в каждом случае к 1 мл крови прибавляли 0,5 мл раствора фотосенсибилизатора, после чего определяли поверхностную цитоархитектонику эритроцитов.

Для исследования цитоархитектоники клеток кровь фиксировали в 1%-ном растворе глутарового альдегида («Fluka», Switzerland). Затем, после 24-часовой фиксации при температуре + 4°C готовился препарат «раздавленная капля». Подсчет клеток производился в процентах на 200 эритроцитов с использованием фазово-контрастного устройства светового микроскопа под иммерсией. Использовалась классификация, предложенная Г.И. Козинцом с соавторами [4]. Согласно этой классификации эритроциты подразделяли на десять классов:

- 1) дискоцит;
- 2) дискоцит с одним выростом;
- 3) дискоцит с гребнем;
- 4) дискоцит с множественными выростами (эхиноцит);
- 5) сфероцит с шипиками на поверхности;
- 6) куполообразный эритроцит (стоматоцит);
- 7) сфероцит с гладкой поверхностью;
- 8) эритроцит в виде «спущенного мяча»;
- 9) дегенеративные формы эритроцитов;
- 10) «тени» эритроцитов.

Первые четыре класса эритроцитов (с признаками эхиноцитарной трансформации) принято считать обратимо деформированными, так как эти клетки способны спонтанно восстанавливать форму. Остальные классы эритроцитов относятся к группе необратимо деформированных или предгемолитических форм.

Таблица 1

Концентрационно-временная динамика показателей поверхностной цитоархитектоники эритроцитов при инкубации крови с водным раствором, содержащим 0,9% NaCl + 1–3% ТВИН 80 (далее – растворитель)

Время инкубации, ч	0	0,5	1	2	3	4
Дискоциты	57	0	0	4	50	19
С одним выростом	7	0	0	0	4	0
С гребнем	0	0	0	0	0	0
Эхиноциты	27	0	10	69	24	4
Сферозхиноциты	2	100	90	26	5	0
Стоматоциты	5	0	0	1	1	32
Сфероциты	0	0	0	0	15	15
«Спущенный мяч»	1	0	0	0	0	0
Дегенеративные	1	0	0	0	1	4
«Тени»	0	0	0	0	0	26

**Результаты исследования
и их обсуждение**

В ходе проведенного исследования *in vitro* выявлено, что при инкубации крови с растворителем в отсутствие фотосенсибилизатора в первые полчаса все клетки приобретали форму сфероэритроцитов; далее, в течение 3 часов инкубации, форма клеток постепенно восстанавливалась, но через 4 часа наблюдалась стоматоцитарная трансформация с появлением сфероцитов и «теней» эритроцитов (см. табл. 1).

По всей видимости, четырех часовая инкубация приводила к старению клеток, уменьшению образования АТФ в ходе метаболизма глюкозы. Результатом этого процесса явилось ухудшение транспорта катионов, уменьшение восстановительного потенциала в клетке, снижение защиты эритроцита от окисления, мембрана теряла сиаловые кислоты, что вызывало потерю эластичности и изменение формы клетки вплоть до сферуляции [8].

В ходе исследования установлено, что образец соединения I в концентрации 10^{-4} моль/кг в первые три часа инкубации оказывал защитное цитопротективное действие, что подтверждается увеличением содержания в крови дискоцитов за счет снижения клеток эхиноцитарного ряда (см. табл. 2). Однако к 4 часу инкубации этот эффект исчезает, снижается количество

дискоцитов и увеличивается процент необратимомодифицированных форм. Вероятно, это связано с повреждающим действием «старения» на эритроциты. В больших концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} моль/кг) ФС I оказывал защитное действие на эритроциты в течение первого часа инкубации, снижая эхиноцитарную трансформацию, вызываемую растворителем. Начиная со 2 часа инкубации наблюдался рост стоматоцитов, а к окончанию наблюдения в крови появлялись сфероциты и «тени» эритроцитов, что говорит о появлении гемолитической направленности изменения цитоархитектоники эритроцитов. Самая высокая концентрация ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/кг) приводила к резкому снижению числа дискоцитов в крови через полчаса инкубации в основном за счет необратимой трансформации, в дальнейшем число эхиноцитов снижалось, а процент стоматоцитов и особенно сфероцитов повышался. К 4 часу инкубации практически все клетки были необратимомодифицированными. Таким образом, образец ФС I в самой низкой концентрации обладает защитным цитопротекторным эффектом в отношении эритроцитов. Более высокие концентрации вызывают отсроченную стоматоцитарную трансформацию клеток, которая в максимальной концентрации вещества приводит к практически полной необратимой трансформации клеток.

Таблица 2

Концентрационно-временная динамика показателей поверхностной цитоархитектоники эритроцитов при инкубации крови в присутствии соединения I

Время инкубации, ч	0	0,5	1	2	3	4
1	2	3	4	5	6	7
10^{-4}						
Дискоциты	57	68	85	92	92	79
С одним выростом	7	7	3	3	3	2
С гребнем	0	2	1	1	0	0
Эхиноциты	27	18	7	2	2	0
Сфероэхиноциты	2	0	0	0	0	0
Стоматоциты	5	3	3	1	3	13
Сфероциты	0	0	0	0	0	0
«Спущенный мяч»	1	0	0	0	0	3
Дегенеративные	0	2	1	1	0	3
«Тени»	0	0	0	0	0	0
$5 \cdot 10^{-4}$						
Дискоциты	57	15	42	64	49	20
С одним выростом	7	3	4	3	2	0
С гребнем	0	0	0	1	1	0
Эхиноциты	27	66	48	8	10	9
Сфероэхиноциты	2	12	2	0	0	0

Окончание табл. 2						
1	2	3	4	5	6	7
Стоматоциты	5	2	1	23	35	59
Сфероциты	0	0	0	0	0	7
«Спущенный мяч»	1	0	0	0	1	3
Дегенеративные	0	2	3	1	2	2
«Тени»	0	0	0	0	0	0
10^{-3}						
Дискоциты	57	16	24	44	31	12
С одним выростом	7	6	1	3	3	0
С гребнем	0	0	0	1	2	0
Эхиноциты	27	57	43	14	21	4
Сферозхиноциты	2	18	31	0	7	0
Стоматоциты	5	1	1	35	28	62
Сфероциты	0	0	0	0	3	10
«Спущенный мяч»	1	0	0	1	2	2
Дегенеративные	0	2	0	2	0	4
«Тени»	0	0	0	0	3	6
$5 \cdot 10^{-3}$						
Дискоциты	57	23	23	7	8	6
С одним выростом	7	3	1	0	1	0
С гребнем	0	0	1	1	1	1
Эхиноциты	27	27	15	8	11	2
Сферозхиноциты	2	15	8	4	7	2
Стоматоциты	5	11	15	5	17	33
Сфероциты	0	19	36	72	52	42
«Спущенный мяч»	1	1	0	1	1	2
Дегенеративные	0	1	1	2	0	4
«Тени»	0	0	0	0	2	8

Примечание. Реальная концентрация фотосенсибилизатора, а также компонентов растворителя в растворе крови понижалась за счет разбавления системы «растворитель – кровь» в соотношении 1÷2.

Таблица 3

Концентрационно-временная динамика показателей поверхностной цитоархитектоники эритроцитов при инкубации крови в присутствии соединения II

Время инкубации, ч	0	0,5	1	2	3	4
1	2	3	4	5	6	7
10^{-4}						
Дискоциты	66	3	18	51	36	13
С одним выростом	8	0	2	3	5	0
С гребнем	1	0	0	0	1	2
Эхиноциты	21	18	44	30	27	6
Сферозхиноциты	0	79	36	10	7	0
Стоматоциты	2	0	0	5	14	31
Сфероциты	0	0	0	0	5	14
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	2	0	0	1	2	5
«Тени»	0	0	0	0	3	29
$5 \cdot 10^{-4}$						
Дискоциты	66	8	27	15	8	3
С одним выростом	8	2	0	0	1	0
С гребнем	1	0	1	0	1	0

Окончание табл. 3						
1	2	3	4	5	6	7
Эхиноциты	21	47	11	5	7	3
Сферозэхиноциты	0	41	11	1	1	0
Стоматоциты	2	1	16	10	17	22
Сфероциты	0	0	31	63	61	51
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	2	1	2	2	2	4
«Тени»	0	0	1	4	2	17
10^{-3}						
Дискоциты	66	65	73	50	16	6
С одним выростом	8	6	2	4	1	0
С гребнем	1	0	0	1	0	0
Эхиноциты	21	27	20	24	2	2
Сферозэхиноциты	0	0	2	1	0	0
Стоматоциты	2	2	1	16	38	19
Сфероциты	0	0	0	0	35	33
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	2	0	2	4	3	6
«Тени»	0	0	0	0	5	34
$5 \cdot 10^{-3}$						
Дискоциты	66	68	61	37	6	0
С одним выростом	8	0	1	0	0	0
С гребнем	1	1	0	1	0	0
Эхиноциты	21	4	1	0	3	0
Сферозэхиноциты	0	0	0	0	0	0
Стоматоциты	2	26	31	20	28	12
Сфероциты	0	0	4	11	0	10
«Спущенный мяч»	0	0	1	0	3	0
Дегенеративные	2	1	1	1	0	0
«Тени»	0	0	0	30	60	78

Таблица 4

Концентрационно-временная динамика показателей поверхностной цитоархитектоники эритроцитов при инкубации крови в присутствии соединения III

Время инкубации, ч	0	0,5	1	2	3	4
1	2	3	4	5	6	7
10^{-4}						
Дискоциты	68	7	21	42	26	14
С одним выростом	5	1	7	5	1	0
С гребнем	1	0	0	3	3	0
Эхиноциты	23	32	36	11	6	3
Сферозэхиноциты	0	59	22	10	8	0
Стоматоциты	2	1	0	21	31	45
Сфероциты	0	0	14	8	9	26
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	1	0	0	0	2	4
«Тени»	0	0	0	2	12	8
$5 \cdot 10^{-4}$						
Дискоциты	68	2	0	3	8	29
С одним выростом	5	0	0	0	1	0
С гребнем	1	0	0	0	2	1

Окончание табл. 4						
1	2	3	4	5	6	7
Эхиноциты	23	5	11	14	20	9
Сферозхиноциты	0	92	87	83	62	5
Стоматоциты	2	0	0	0	2	12
Сфероциты	0	0	0	0	0	36
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	1	1	2	0	2	1
«Тени»	0	0	0	0	3	7
10^{-3}						
Дискоциты	68	0	0	0	2	9
С одним выростом	5	0	0	0	0	0
С гребнем	1	0	0	1	1	0
Эхиноциты	23	0	8	10	7	4
Сферозхиноциты	0	81	49	58	5	0
стоматоциты	2	0	0	7	46	12
Сфероциты	0	19	41	21	13	31
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	2	4
Дегенеративные	1	0	0	0	0	3
«Тени»	0	0	2	3	24	37
$5 \cdot 10^{-3}$						
Дискоциты	68	0	0	0	0	2
С одним выростом	5	0	2	2	0	0
С гребнем	1	0	0	2	0	1
Эхиноциты	23	0	27	10	7	2
Сферозхиноциты	0	23	35	12	26	8
Стоматоциты	2	0	3	31	28	21
Сфероциты	0	77	33	42	19	25
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	7	0
Дегенеративные	1	0	0	0	3	6
«Тени»	0	0	0	3	10	35

Соединение II уже в низких концентрациях (10^{-4} и $5 \cdot 10^{-4}$ моль/кг) вызывало существенные изменения поверхностной цитоархитектоники эритроцитов (см. табл. 3). Через 0,5 часа инкубации процент дискоцитов в крови падал практически до нуля за счет эхиноцитарной трансформации. Далее (через 1–2 часа) число дискоцитов повышалось, эхиноцитарная трансформация сменялась стоматоцитарной за счет противоположных эффектов фотосенсибилизатора и растворителя.

Спустя 3–4 часа в инкубируемой крови преобладали стоматоциты, сфероциты и появлялись гемолизированные эритроциты. Более высокие концентрации образца II (10^{-3} и $5 \cdot 10^{-3}$ моль/кг) не вызывали снижение числа эритроцитов и изменение поверхностной цитоархитектоники в течение 1–2 часов инкубации, вероятно, в результате антагонистического действия стоматоцитарной направленности ФС II и эхиноци-

тарным эффектом действия растворителя, а затем концентрация дискоцитов резко падала. К четвертому часу эксперимента в крови практически не было нормальных клеток, присутствовали в основном предгемолитические формы, а в образце с наибольшей концентрацией – «тени» эритроцитов. Таким образом, фотосенсибилизатор II не оказывал защитного действия относительно эффекта растворителя, его повреждающее действие на эритроциты связано с выраженной стоматоцитарной трансформацией, которая при низких концентрациях ФС II противодействовала эхиноцитарному эффекту растворителя и временно замедляла трансформацию клеток. Более высокие концентрации этого вещества вызывали сильный цитотоксический эффект гемолитической направленности.

При исследовании *in vitro* цитотоксического влияния фотосенсибилизатора III обнаружено, что в минимальной концен-

трации его действие аналогично образцу II (см. табл. 3, 4). Однако при более высоком содержании это вещество вызывает снижение числа дискоцитов вплоть до их полного отсутствия в образцах. При этом трансформация клеток крови в пробе с концентрацией вещества $5 \cdot 10^{-4}$ моль/кг в течение 3 часов инкубации шла по эхиноцитарному пути и лишь на четвертый час наблюдалось увеличение стоматоцитов и сфероцитов (эффект старения). В образцах с концентрацией вещества 10^{-3} и $5 \cdot 10^{-3}$ моль/кг стоматоцитарная трансформация появлялась позже (с двух часов инкубации) и менее выраженная, чем в образце II. При этом предгемолитические клетки (сфероциты) появлялись уже через полчаса, однако степень гемолизированных эритроцитов («тени») к окончанию наблюдения была значительно ниже, чем в пробе с образцом II. Таким образом, ФС III не обладает защитным цитопротективным действием, его токсическое влияние связано с эхиноцитарной трансформацией, усугубляющей действие растворителя, которое приводит к ранним гемолитическим изменениям, однако они развиваются медленнее, чем в образце с ФС II.

Инкубация крови с образцом IV в наименьшей концентрации вызывала в первый

час изменение формы эритроцитов, сходные с таковыми у образцов II и III; в дальнейшем, как и в случае с соединением III, трансформация в основном сопровождалась появлением стоматоцитов и сфероцитов (см. табл. 3–5). Следующие концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} моль/кг) приводили к аналогичным изменениям цитоархитектоники эритроцитов с небольшим перераспределением форм клеток в сторону сферозхиноцитарной трансформации и увеличением сфероцитоза, при этом клеток стоматоцитарного ряда наблюдалось незначительное количество. Максимальная концентрация исследуемого вещества ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/кг) вызывала наибольший цитотоксический эффект: уже через 1 час инкубации почти половина клеток гемолизировалась, а спустя 2 часа все эритроциты разрушились. Таким образом, ФС IV так же, как и образец соединения III, не оказывал цитопротекторного действия на клетки крови и вызывал эхиноцитарную трансформацию клеток с последующей сферуляцией. Однако в рабочих концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} моль/кг цитотоксический эффект был несколько меньше, чем при инкубации с ФС III, а в максимальной концентрации, напротив, его гемолитическая активность была наибольшей.

Таблица 5

Концентрационно-временная динамика показателей поверхностной цитоархитектоники эритроцитов при инкубации крови в присутствии соединения IV

Время инкубации, ч	0	0,5	1	2	3	4
1	2	3	4	5	6	7
10^{-4}						
Дискоциты	71	9	25	8	7	3
С одним выростом	9	1	4	0	2	0
С гребнем	2	0	2	1	1	1
Эхиноциты	13	47	30	8	18	14
Сферозхиноциты	0	35	15	12	25	14
Стоматоциты	4	3	3	8	8	12
Сфероциты	0	3	19	55	33	53
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	1	2	2	3	3	1
«Тени»	0	0	0	5	3	2
$5 \cdot 10^{-4}$						
Дискоциты	71	4	9	7	3	6
С одним выростом	9	2	1	1	0	1
С гребнем	2	0	0	1	0	1
Эхиноциты	13	39	13	12	14	8
Сферозхиноциты	0	52	44	20	30	2
Стоматоциты	4	1	8	1	7	8
Сфероциты	0	0	24	56	40	72

Окончание табл. 5						
1	2	3	4	5	6	7
«Спущенный мяч»	0	1	0	0	0	0
Дегенеративные	1	1	1	0	2	0
«Тени»	0	0	0	2	4	2
10^{-3}						
Дискоциты	71	15	15	2	10	2
С одним выростом	9	0	1	1	1	1
С гребнем	2	0	0	2	1	1
Эхиноциты	13	29	22	10	21	3
Сферозхиноциты	0	50	19	24	18	4
Стоматоциты	4	4	2	8	9	16
Сфероциты	0	0	40	49	36	70
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	1	2	1	0	1	1
«Тени»	0	0	0	4	3	2
$5 \cdot 10^{-3}$						
Дискоциты	71	54	15	0	0	0
С одним выростом	9	3	1	0	0	0
С гребнем	2	3	4	0	0	0
Эхиноциты	13	14	9	0	0	0
Сферозхиноциты	0	0	0	0	0	0
Стоматоциты	4	21	17	0	0	0
Сфероциты	0	3	9	0	0	0
«Спущенный мяч»	0	0	0	0	0	0
Дегенеративные	1	2	3	0	0	0
«Тени»	0	0	41	100	100	100

Характер липофильных свойств рассматриваемых соединений, безусловно, является одной из ведущих причин особенностей их трансформирующих воздействий на клеточную оболочку. Как прямое повреждение, так и перераспределение фосфолипидов мембраны по принципу «флип-флопа» определяет не только выбор пути, но и скорость деструкции элементов цитомембраны, что наблюдалось в нашем эксперименте. Кроме того, исследуемые соединения (кроме первого) имеют положительные заряды, способные взаимодействовать с отрицательно заряженными фрагментами белков и сиаловых кислот мембран. Рассматриваемые агенты, соединяясь с мембранными структурами, могут вызывать перегруппировку или агрегацию мембранных белков, изменяя фосфорилирование протеидов и ионное равновесие (накопление Ca^{2+} в цитоплазме благодаря угнетению Ca^{2+} -АТФ-азы) Ионы Ca^{2+} вызывают снижение стабильности мембран эритроцитов, меняя характер межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета, что сопровождается разрушением асим-

метрии фосфатидилсерина в мембранах эритроцитов. Повышение входа Ca^{2+} в эритроциты, как известно, сопровождается Гардош-эффектом, т.е. компенсированным выходом K^{+} и сморщиванием клеток [10].

Результаты исследования темновой токсичности синтезированных хлоридов e_6 I–IV позволяют сделать следующие заключения:

1. Соединение II обладает самым высоким цитотоксическим эффектом в рабочих концентрациях, по механизму действия вызывает стоматоцитарную трансформацию эритроцитов, противоположную эффектам растворителя без ФС. Спустя два часа происходит суммация токсических эффектов, что выражается в глубоком массивном разрушении клеток к концу последнего часа инкубации. Рост цитотоксической активности данного соединения при повышении его концентрации происходит менее интенсивно, чем у соединения IV.

2. Соединение IV в максимальной концентрации обладает самым выраженным мембраноповреждающим действием, однако в рабочих концентрациях ($5 \cdot 10^{-4}$ и 10^{-3} моль/кг) приводит к росту обратимых

форм трансформации мембран эритроцитов, что закономерно сопровождается торможением процесса разрушения клеток.

3. Соединение III проявляет цитотоксический эффект очень рано, начиная с 30 минут эксперимента, однако в последующем разрушение клеток значительно тормозится.

4. Изменения, вызванные присутствием соединения I, характеризуются двухфазностью: после 2-часовой инкубации цитотоксические эффекты были аналогичны действию соединения III, но менее выражены; до 2 часов инкубации это соединение проявляло, по-видимому, цитопротекторный эффект по отношению к перестройкам, вызванным действием сольубилизирующей добавки ТВИН 80, содержащейся в растворе. Вышеописанные изменения были характерны для низких концентраций соединения I.

5. По цитотоксическому эффекту исследованные фотосенсибилизаторы можно расположить следующим образом: максимальным цитотоксическим эффектом обладают соединения II и IV. Минимальный токсический эффект имеют ФС I и III, кроме того, первое соединение обладает кратковременным цитопротекторным действием. Последовательный рост темновой токсичности макрогетероциклов в отношении клеток крови в ряду соединений $I < III < IV < II$, то есть при переходе от незаряженного ФС к соединениям, несущим соответственно одну, две и три полярных катионных группы. Можно предположить, что все рассматриваемые фотосенсибилизаторы в ходе эксперимента проникают через клеточные мембраны эритроцитов с различной скоростью, при этом более полярные молекулы, накапливаясь в цитозоле клетки, проявляют более высокую цитотоксичность.

Токсикологический эффект фотосенсибилизаторов на клетки крови *in vitro* носит локальный характер, поэтому в дальнейшем требуется оценка их цитотоксичности в остром эксперименте на животных. Рекомендуется применение ФС в тех концентрациях, при которых они оказывают защитное цитопротекторное действие в отношении клеток или обладают наименьшей мембраноповреждающей активностью.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (соглашение № 15-13-00096).

Список литературы

1. Бельх Д.В. Фотоповреждение эритроцитарной мембраны, сенсибилизируемое производными хлорофилла а: некоторые закономерности «структура-активность» [Текст] / Д.В. Бельх, О.Г. Шевченко, И.С. Тарабукина // Макрогетероциклы. – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 79–87.
2. Бельх Д.В., Худяева И.С., Старцева О.М. и др. Новые сенсибилизаторы для фотодинамической антибактериальной терапии: синтез и исследование антимикробной активности. // Фундаментальные химические исследования XXI-го века: тезисы докл. научной конференции грантодержателей РФ. – Москва, 2016. – С. 322–323.
3. Гущина О.И. Синтез катионных производных хлорина e_6 [Текст] / О.И. Гущина, Е.А. Ларкина, А.Ф. Миронов // Макрогетероциклы. – 2014. – V. 7, № 4. – С. 414–416.
4. Козинец Г.И. Исследование системы крови в клинической практике [Текст] / Г.И. Козинец, В.А. Макаров. – Москва: Триада-Х, 1997. – 480 с.
5. Кустов А.В., Бельх Д.В., Худяева И.С. и др. Новые фотосенсибилизаторы для фотодинамической антибактериальной терапии: физико-химические и микробиологические исследования. // Физическая химия краун-соединений, порфиринов и фталоцианинов: тезисы докл. VI Международной конф. – Туапсе, 2016. – С. 17.
6. Маркова А.А. Механизм пониженной гемолитической активности бесфосфорных алкильных катионных глицеролипидов: исследование на модельных мембранах [Текст] / А.А. Маркова, С.А. Окороченков, Н.В. Плявник, А.А. Штиль // Клин. онкогематол. – 2014. – Т. 7, № 3. – С. 278–281.
7. Мясоедова Е.Е. Нарушения реологии и структурно-функциональное состояние артериальной стенки при ревматоидном артрите [Текст] / Е.Е. Мясоедова, С.Е. Мясоедова, О.А. Пахрова, И.К. Томилова и др. // Вестник Ивановской медицинской академии том. – 2008. – Т. 13, № 1–2. – С. 50–54.
8. Опакова Т.Н. Влияние инфузионных растворов на реологические показатели крови при старении *in vitro* [Текст] / Т.Н. Опакова, О.А. Пахрова, С.Б. Назаров // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2010. – № 3. – С. 24–29.
9. Пахрова О.А. Исследование свойств синтетических кобальтовых комплексов порфирина и фталоцианина при острой нитритной интоксикации и эндотоксическом шоке в эксперименте [Текст] / О.А. Пахрова, И.К. Томилова, Е.Л. Алексахина, С.Б. Назаров и др. // Гигиена и санитария. – 2008. – № 4. – С. 72–74.
10. Трубочева О.А. Влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов [Текст] / О.А. Трубочева, Е.В. Шахристова, А.И. Галич, И.В. Петрова // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2011. – № 5. – С. 69–72.
11. Трухачева Т.В. Фотолон – новое средство для фотодинамической терапии [Текст] / Т.В. Трухачева, С.В. Шляхтин, Г.А. Исаков, Ю.П. Истомина. – Минск: РУП «Белмедпрепарат». – 2009. – 64 с.
12. Фотодинамическая терапия в дерматологии [Текст]: методические рекомендации / В.Н. Волгин, Т.В. Соколова, М.С. Колбина и др. – Москва: ГВКГ им. Н.Н. Бурденко, 2011. – 67 с.
13. Agostinis P. Photodynamic therapy of cancer: an update / P. Agostinis, K. Berg, et al. // CA Cancer J Clin. – 2011. – V. 61. – P. 250–281.
14. Berezin D.B., Kustov A.V., Venediktov E.A., Makarov V.V., Kruchin S.O., Belykh D.V. Photosensitizers for antibacterial PDT: synthesis, singlet oxygen generation, hydrophilicity control and toxicity assays. // Porphyrins and phthalocyanines ICPP-9: abstracts of international conference, Nankin. – 2016. – P. 26.
15. Brandis A.S. Chlorophyll sensitizers in photodynamic therapy / A.S. Brandis, Y. Salomon, A. Schetz / In: Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and application. Ed. By B. Grimm, R.J. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer. Springer: Berlin, 2006. – P. 461–483.