

Темновая цитотоксичность впервые синтезированных комплексов на основе Хлорина е6 с редкоземельными элементами на культуре клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха

О.В. Шевченко^{1,2} ✉, Е.В. Елисеева¹, К.А. Юрьева¹, М.В. Белобелецкая², М.А. Медков²

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

² Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Аннотация. Остро стоит вопрос о безопасности и селективности действия новых классов соединений, свойства которых не были описаны ранее. Цель настоящей статьи заключается в представлении результатов по изучению темновой токсичности и накоплению впервые синтезированных субстанций Хлорин е6-европий и Хлорин е6-самарий в отношении культуры клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха. Оценка этих параметров необходима с точки зрения понимания уровня токсичности и потенциальных побочных эффектов, поскольку применяемые в клинической практике вещества являются инициаторами фотореакций у пациентов. Методом калориметрического МТТ-теста для оценки метаболической активности клеток показано, что после 2 сут. контакта субстанций Хлорин е6-европий и Хлорин е6-самарий в концентрациях 25–0,19 мкг/мл количество жизнеспособных клеток составило более 80 %. С применением проточной цитофлуориметрии определено максимальное накопление веществ в клетках уже через 1 сут. со-инкубации. Полученные показатели позволили определить диапазон вносимых концентраций, при которых отмечено отсутствие прямого цитотоксического действия вещества на культуру клеток. Эти данные будут являться основой для дальнейшей оценки эффективности соединений и механизма их действия.

Ключевые слова: темновая цитотоксичность, аденокарцинома Эрлиха, Хлорин е6, европий, самарий, МТТ-тест, проточная цитофлуориметрия

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» (ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России) и государственного задания ФГБУН Института химии ДВО РАН, тема «Направленный синтез и исследование строения и свойств новых веществ, материалов и покрытий (включая наноразмерные) для морских технологий и техники и различного функционального назначения» (FWFN(0205)-2022-0003).

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2025-22-3-143-149>

Dark cytotoxicity of new synthesized complexes based on Chlorin e6 with rare earth elements on Ehrlich ascitic adenocarcinoma cell culture

O.V. Shevchenko^{1,2} ✉, E.V. Eliseeva¹, K.A. Yurieva¹, M.V. Belobeletskaya², M.A. Medkov²

¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

² Institute of Chemistry of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract. Today, the issue of the safety and selectivity of new classes of compounds is acute. These compounds have properties that have not been described before. The purpose of this study is to present results of the investigation of the toxicity and accumulation of two newly synthesized compounds, e6-europium chloride and e6-samarium chloride, in relation to an Ehrlich ascetic adenocarcinoma cell culture. An assessment of these parameters is crucial for understanding the level of toxicity and potential side effects. It is known that substances used in clinical practice can initiate photoreactions in patients, so it is important to study their properties. Using the MTT test, we assessed the metabolic activity of cells after contact with the compounds for 2 days. The concentrations of e6-europium Chloride and e6-samarium chloride were 25 and 0.19 micrograms per milliliter, respectively. The number of viable cells after exposure was more than 80 %. Using flow cytometry, the maximum accumulation of substances in cells was determined after one day of co-incubation. Based on these indicators, we were able to determine the range of concentrations at which there was no direct cytotoxic effect on the cell culture. This data will serve as a basis for further assessment of the compounds' effectiveness and their mode of action.

Keywords: dark cytotoxicity, Ehrlich's adenocarcinoma, Chlorin e6, europium, samarium, MTT test, flow cytometry

Funding. The work was carried out within the framework of the Strategic Academic Leadership Program "Priority 2030" (FSBI VO TSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation) and the state assignment of the FSBI Institute of Chemistry of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, the topic "Targeted synthesis and research of the structure and properties of new substances, materials and coatings (including nanoscale) for marine technologies and equipment and various functional purposes" (FWFN (0205)-2022-0003).

Одним из необходимых оценочных параметров при разработке потенциальных фотосенсибилизаторов (ФС) является темновая цитотоксичность [1, 2, 3]. Известно, что механизм действия ФС основывается на способности им поглощать квант света с последующей генерацией активных форм кислорода, разрушающих клетки опухоли. Несмотря на это, необходимо оценивать безопасность именно соединения, без воздействия источником излучения, для выбора безопасных концентраций с целью проведения дальнейших работ [2, 3]. Более того, выбор диапазона вносимых концентраций веществ также должен основываться на селективности накопления субстанций в опухолевых клетках для уменьшения эффекта воздействия на непораженные участки [4].

В рамках настоящего исследования проведено изучение темновой токсичности впервые синтезированных порошков Хлорин еб-европей и Хлорин еб-самарий в отношении культуры клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха (АКЭ) методом спектрофотометрического калориметрического МТТ-теста. С применением метода проточной цитометрии проведена количественная оценка накопления Хлорина еб (вещество сравнения), Хлорин еб-европей и Хлорин еб-самарий.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить темновую токсичность впервые синтезированных комплексов на основе Хлорина еб, допированного редкоземельными элементами, на модели клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез комплексных соединений. В работе использовали коммерческий препарат «Фотодитазин» (Хлорин еб, ООО «Вета-Гранд, Россия), хлорид европия $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.), хлорид самария $\text{SmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.). Концентрации Хлорина Еб и Eu(III) или Sm(III) в исходных растворах составляли 5×10^{-3} моль/л и $6,6 \times 10^{-3}$ моль/л соответственно. Предварительно в каждом из исходных растворов создавали $\text{pH} = 6,5\text{--}7,3$ добавлением к раствору димеглума хлорина Еб разбавленной 1:1 соляной кислоты HCl (х.ч.), а к раствору хлорида европия или хлорида самария 10%-го раствора аммиака NH_4OH . К раствору, содержащему Хлорин еб, добавляли раствор европия или самария в мольном соотношении 1 : 1 при перемешивании на магнитной мешалке до образования осадка. Образующийся в виде осадка продукт взаимодействия (комплекс) хлорина Еб с европием или самарием отфильтровывали и высушивали на воздухе.

Подготовка клеточной культуры. Культивирование клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха осуществляли согласно протоколу [5]. Все исследования проведены после одобрения Междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 8 от 08.04.2024).

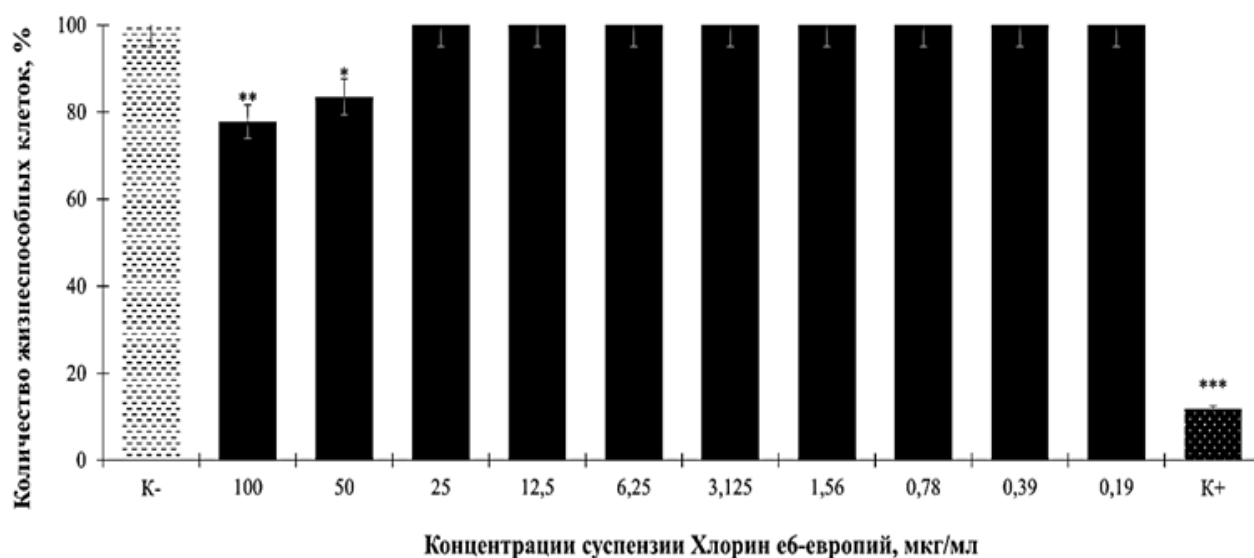
Определение темновой токсичности и накопления. Для оценки темновой токсичности исследуемые вещества в концентрациях от 0,19 до 100 мкг/мл (при двукратном разбавлении) вносили к культуре клеток АКЭ (1×10^6 кл/мл) через 1 сут. после посадки в 96-луночный планшет с дальнейшим помещением в CO_2 -инкубатор и ограниченным воздействием прямых солнечных лучей. Количество жизнеспособных клеток отмечали через 2 сут. контакта с применением МТТ-теста согласно методике [6], регистрируя сигнал оптической плотности на спектрофотометре Allsheng FlexA-200 (Allsheng, КНР) при $\lambda = 530$. Референсные значения определяли при $\lambda = 620$ нм. При интерпретации результатов 100 % жизнеспособных клеток составляли оптические плотности, содержащие клетки отрицательного контроля (интактные), то есть без внесения исследуемых субстанций. Все измерения проводили в трехкратной повторности. В качестве вещества сравнения во всех исследованиях применяли широко применяемый фотосенсибилизатор порфиринового ряда Хлорин еб. Количественное изучение клеток, поглотивших изучаемые вещества, оценивали с применением метода проточной цитофлуориметрии (MacQuant Analyzer 10, Miltenyi Biotec, Германия) при трехкратном измерении по каналу R1 ($\lambda_{\text{возбуждения}} = 635$ нм, $\lambda_{\text{испускания}} = 655\text{--}730$ нм). Анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis 2.8 (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ данных. Полученные данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ выполнен с использованием ANOVA, реализованного в программном обеспечении Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc., США). Различия между группами считались значимыми, если соответствующее p -значение было меньше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

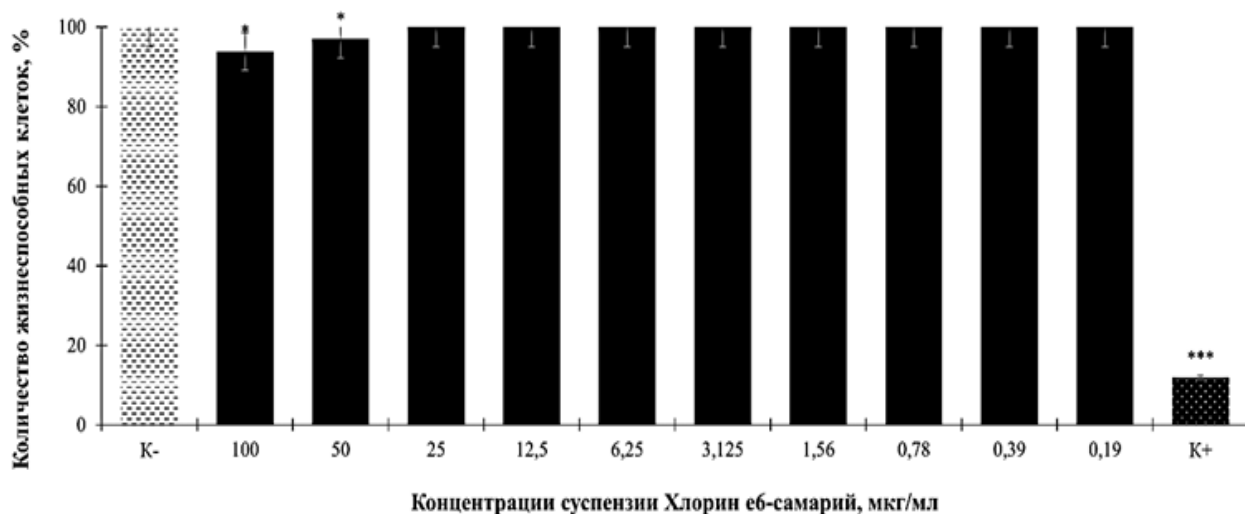
Согласно данным калориметрического МТТ-теста процент жизнеспособных клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха на 2-е сутки после внесения суспензии Хлорин еб-европей в концентрации 100 мкг/мл составил $(77,82 \pm 3,89)$ %. Для меньших концентраций количество метаболически-активных клеток более 80 %. Отмечено $(95,22 \pm 4,76)$ % живых интактных клеток и $(11,86 \pm 0,59)$ % клеток положительного контроля (после внесения 20 % диметилсульфоксида) (рис. 1).

Аналогичные исследования темновой токсичности проведены для Хлорина еб, допированного самарием. Результаты демонстрируют высокую жизнеспособность для всего диапазона вносимых к культуре АКЭ концентраций: $(97,80 \pm 2,45)$ % для 100 мкг/мл (рис. 2).



* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Рис. 1. Жизнеспособность клеток АКЭ через 2 сут. контакта с Хлорин еб-европей по данным МТТ-теста



* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

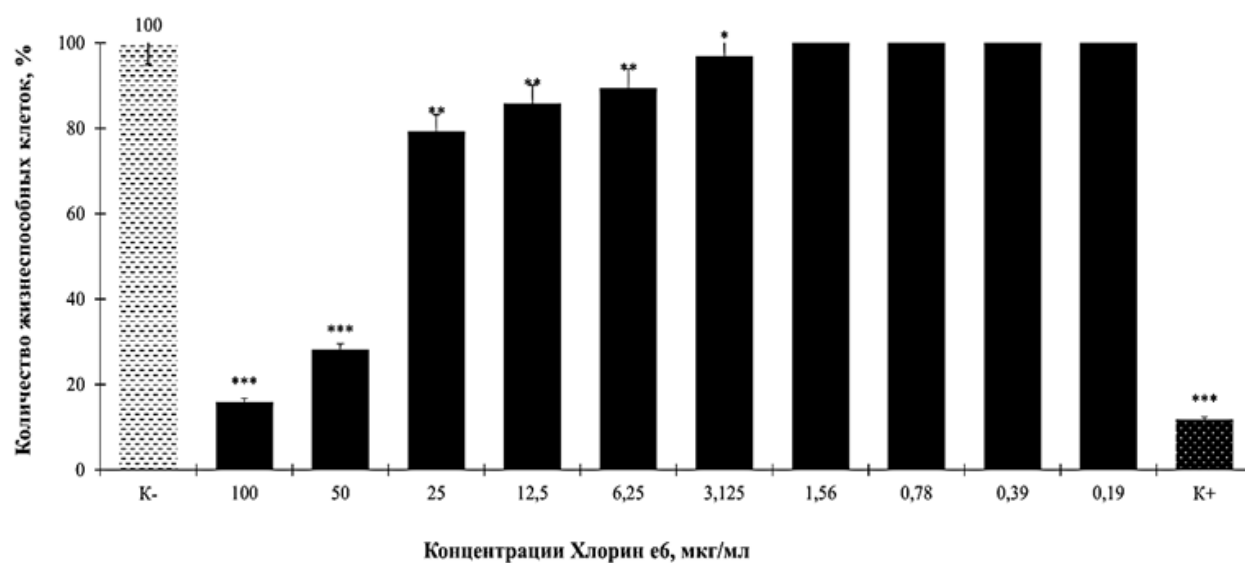
Рис. 2. Жизнеспособность клеток АКЭ через 2 сут. контакта с Хлорин еб-самарий по данным МТТ-теста

Следует отметить, что исследовалась также токсичность Хлорина еб как контрольного вещества в условиях отсутствия непосредственного воздействия лучей света. Выживаемость клеток более 80 % отмечена для 12,5 мкг/мл, ($85,85 \pm 4,29$ %), и ниже, при прежних значениях контролей. Наиболее токсичными оказались концентрации: 100; 25 и 12,5 мкг/мл. После контакта со 100 мкг/мл количество мертвых клеток составило ($84,05 \pm 4,20$ %) (рис. 3).

Для объяснения этих явлений изучали биодоступность (интенсивность накопления) впервые полученных веществ в клетках АКЭ.

Согласно данным проточной цитофлуориметрии количество флуоресцирующих клеток, то есть поглотивших вещества, через 1 сут. после контакта с концентрациями Che6-Eu от 100 до 25 мкг/мл составило от ($99,21 \pm 4,96$) и ($98,93 \pm 4,95$) % соответственно.

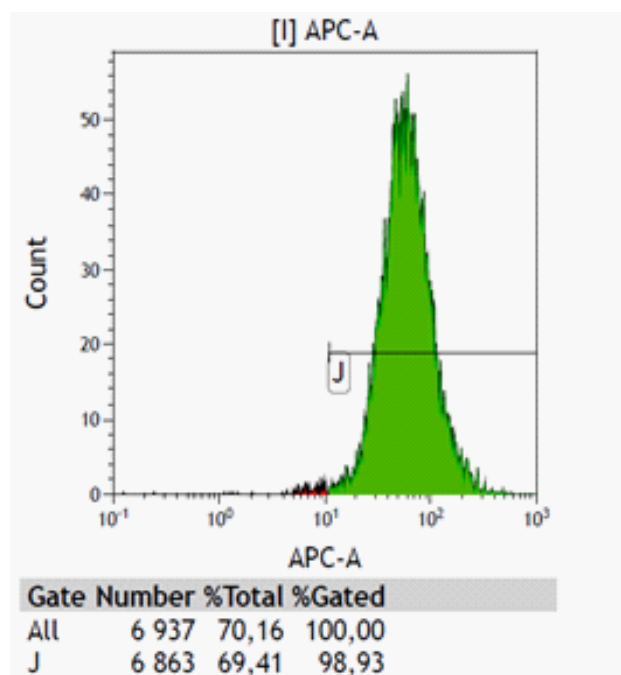
После контакта с 100 мкг/мл Che6-Sm ($99,17 \pm 4,96$ %). Для свободной молекулы Хлорина еб: 100 мкг/мл ($92,44 \pm 4,62$ %) и для 25 мкг/мл ($89,74 \pm 4,49$ %), при значениях отрицательного контроля ($0,04 \pm 0,002$ %) и ($98,93 \pm 1,98$ %) для положительного (рис. 4).



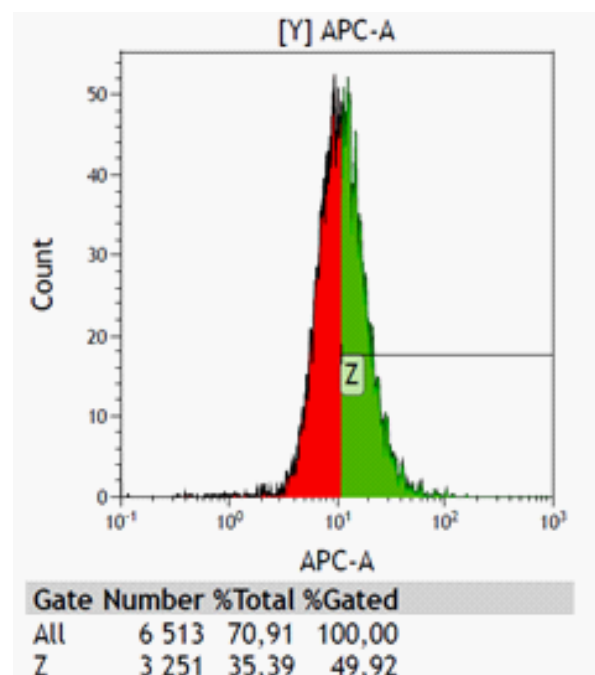
* $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Рис. 3. Жизнеспособность клеток АКЭ через 2 сут. контакта с Хлорин еб по данным МТТ-теста.

Ось абсцисс – краситель аллофикоцианин (allophycocyanin, APC), канал В6;
ось ординат – количество клеток в 100 мкл, абс. ед.



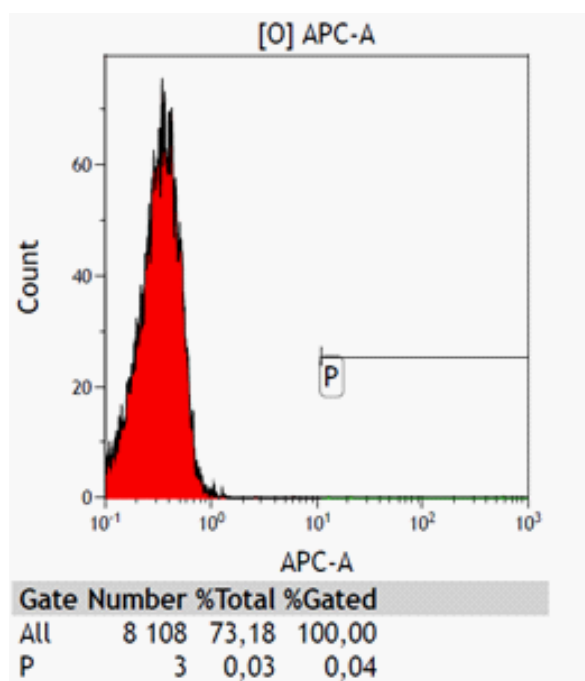
а



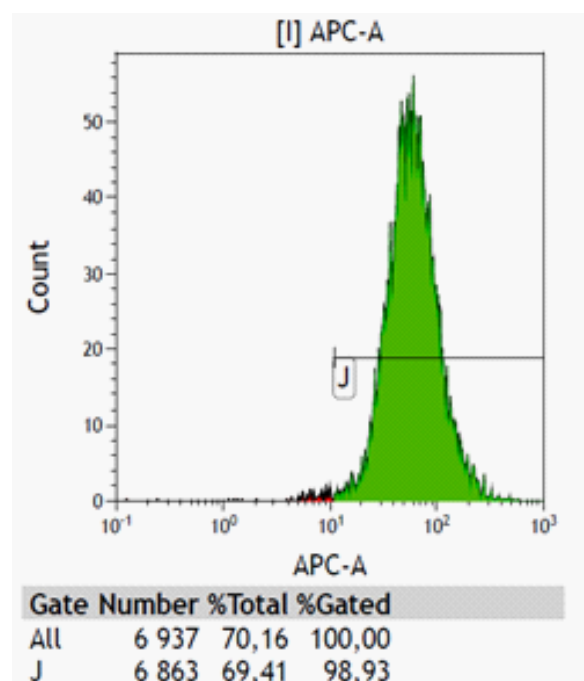
б

Рис. 4. Гистограммы интенсивности флуоресценции клеток аденокарциномы Эрлиха через 2 сут. контакта с:

а) 25 мкг/мл Хлорин еб-европей; б) 25 мкг/мл Хлорин еб-самарий;



В



Г

Рис. 4. Продолжение. Гистограммы интенсивности флуоресценции клеток аденокарциномы Эрлиха через 2 сут. контакта с:

в) интактными клетками (без внесения Che6-Eu или Che6-Sm);

г) клетками положительного контроля (20 % ДМСО)

Результаты свидетельствуют о большей биодоступности Хлорин еб-европей в ряду впервые синтезированных веществ для клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха. Стоит отметить, что при максимальном накоплении вещества через 1 сут. контакта значения темновой токсичности остаются низкими, что обуславливает, на начальном этапе, безопасность применения веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего исследование проведено изучение возможности накопления впервые синтезированных субстанций на основе фотосенсибилизатора порфиринового ряда Хлорина еб, допированного редкоземельными элементами европием или самарием. Полученные данные по накоплению в клетках АКЭ согласуются с результатами по темновой токсичности соединений. Стоит отметить высокую токсичность не допированного Хлорина еб, которая при 100 мкг/мл в $(4,88 \pm 0,24)$ раза превышает значения для Che6-Eu и в $(6,13 \pm 0,31)$ раза для Che6-Sm, что подтверждается многочисленными исследованиями [7, 8, 9, 10], в том числе на клетках глиомы и нормальных нервных клетках [8]. Таким образом, полученный нами материал представляет собой перспективную платформу в качестве фотосенсибилизатора нового поколения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Яницкая А.В., Ярковой М.А., Малаева Е.В., Землянская И.В. Струсовская О.Г. Анатомо-морфологическое изучение плодов *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae). *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2019;4:50–53.
2. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*. 2021;13(9):1332. doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.
3. Li Y., Zhang P., Xie Y., Yang J., Yang Y., Shi L. et al. Photosensitizers with multiple degradation modes for efficient and postoperatively safe photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2023;299:122182. doi: 10.1016/j.biomaterials.2023.122182.
4. Баранов А.В., Корнев А.И., Борискин А.А., Мустафаев Р.Д., Дербенев В.А., Горин Д.С. и др. Накопление фотосенсибилизатора в слизистой оболочке мочевого пузыря при хроническом цистите. *Лазерная медицина*. 2021;24(2–3): 9–14. doi: 10.37895/2071-8004-2020-24-2-3-9-14.
5. Abdulrahman J.M., AbdElsamie G.H., Al-Rawi R.A., Abd El Kaream S.A. Anti-tumor synergistic activity of nano-chlorophyll with sonophotodynamic on Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Zanco Journal of Medical Sciences*. 2020;24(1): 132–142. doi: 10.15218/zjms.2020.016.
6. Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Kudriashova E.S., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Fedorov A.Y. Conjugates of Porphyrinoid-Based Photosensitizers with Cytotoxic Drugs: Current Progress and Future Directions toward Selective

Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;65(3):1695–1734. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01953.

7. Капинус В.Н., Каплан М.А., Ярославцева-Исаева Е.В., Спиченкова И.С., Иванов С.А. Применение хлорин Е6-фотодинамической терапии базально-клеточного рака кожи. *Исследования и практика в медицине*. 2021;8(4):33–43. URL: <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2021-8-4-3>.

8. Žárská L., Malá Z., Langová K., Malina L., Binder S., Bajgar R. et al. The effect of two porphyrine photosensitizers TMPyP and ZnTPPS4 for application in photodynamic therapy of cancer cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2021;34:102224. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102224.

9. Shimolina L.E., Khlynova A.E., Gulin A.A., Elagin V.V., Gubina M.V., Bureev P.A. et al. Photodynamic therapy with Photoditazine increases microviscosity of cancer cells membrane *in cellulo* and *in vivo*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2024;259:113007. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2024.113007.

10. Zhao X., Liu J., Fan J., Chao H., Peng X. Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: From molecular design to application. *Chemical Society Reviews*. 2021;50(6):4185–4219. doi: 10.1039/D0CS00173B.

REFERENCES

1. Yanitskaya A.V., Yarkovoy M.A., Malaeva E.V., Zemlyanskaya E.A., Strusovskaya N.L. Anatomic-morphological investigation of fruits *Psoralea corylifolia* L. (*Fabaceae*). *Volgogradskii nauchno-meditsinskii zhurnal = Volgograd Scientific and Medical Journal*. 2019;4:50–53. (In Russ.).

2. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*. 2021;13(9):1332. doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.

3. Li Y., Zhang P., Xie Y., Yang J., Yang Y., Shi L. et al. Photosensitizers with multiple degradation modes for efficient and postoperatively safe photodynamic therapy. *Biomaterials*. 2023;299:122182. doi: 10.1016/j.biomaterials.2023.122182.

4. Baranov A.V., Kornev A.I., Boriskin A.A. Photosensitizer accumulation in the bladder mucosa in chronic cystitis. *Lazernaya meditsina = Laser Medicine*. 2021;24(2–3):9–14. (In Russ.) doi: 10.37895/2071-8004-2020-24-2-3-9-14.

5. Abdulrahman J.M., Abdelsamie G.H., Al-Rawi R.A., Abd El Kaream S.A. Anti-tumor synergistic activity of nano-chlorophyll with sonophotodynamic on Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Zanco Journal of Medical Sciences*. 2020;24(1):132–142. doi: 10.15218/zjms.2020.016.

6. Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Kudriashova E.S., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Fedorov A.Y. Conjugates of Porphyrinoid-Based Photosensitizers with Cytotoxic Drugs: Current Progress and Future Directions toward Selective Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;65(3):1695–1734. doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01953.

7. Kapinus V.N., Kaplan M.A., Yaroslavlseva-Isayeva E.V., Spichenkova I.S., Ivanov S.A. Chlorin E6-photodynamic therapy basal cell carcinoma. *Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.)*. 2021;8(4):33–43. (In Russ.) doi: 10.17709/2410-1893-2021-8-4-3.

8. Žárská L., Malá Z., Langová K., Malina L., Binder S., Bajgar R. et al. The effect of two porphyrine photosensitizers TMPyP and ZnTPPS4 for application in photodynamic therapy of cancer cells in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2021;34:102224. doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102224.

9. Shimolina L.E., Khlynova A.E., Gulin A.A., Elagin V.V., Gubina M.V., Bureev P.A. et al. Photodynamic therapy with Photoditazine increases microviscosity of cancer cells membrane *in cellulo* and *in vivo*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2024;259:113007. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2024.113007.

10. Zhao X., Liu J., Fan J., Chao H., Peng X. Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: From molecular design to application. *Chemical Society Reviews*. 2021;50(6):4185–4219. doi: 10.1039/D0CS00173B.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этические требования соблюдены. Текст не сгенерирован нейросетью.

Информация об авторах

Ольга Вячеславовна Шевченко – кандидат биологических наук, научный сотрудник Междисциплинарного лабораторного центра, Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия; ✉ shevchenko.ov@tgmu.ru

Екатерина Валерьевна Елисеева – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой общей и клинической фармакологии, Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия; yeliseeff23@gmail.com

Ксения Андреевна Юрьева – обучающаяся 4 года по специальности «Медицинская биохимия», Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия; yureva.ka@tgmu.ru

Маргарита Витальевна Белобелецкая – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории переработки минерального сырья, Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия; rita@ich.dvo.ru

Михаил Азарьевич Медков – доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией переработки минерального сырья, Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия; medkov@ich.dvo.ru

Статья поступила в редакцию 04.03.2025; одобрена после рецензирования 14.05.2025; принята к публикации 20.08.2025.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Ethical requirements are met. The text is not generated by a neural network.

Information about the authors

Olga V. Shevchenko – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Interdisciplinary Laboratory Center, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia; ✉ shevchenko.ov@tgmu.ru

Ekaterina V. Eliseeva – MD, Professor, Head of the Department of General and Clinical Pharmacology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia; yeliseeff23@gmail.com

Ksenia A. Yurieva – a 4-year student specializing in Medical Biochemistry, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia; yureva.ka@tgmu.ru

Margarita V. Belobeletskaya – Candidate of Chemical Sciences, Senior Researcher at the Laboratory of Mineral Processing, Institute of Chemistry of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia; rita@ich.dvo.ru

Mikhail A. Medkov – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Mineral Processing, Institute of Chemistry of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia; medkov@ich.dvo.ru

The article was submitted 04.03.2025; approved after reviewing 14.05.2025; accepted for publication 20.08.2025.