

МОНИТОРИНГ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ВЯЗКОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОТВЕТЕ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ С ПОМОЩЬЮ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ПОРФИРАЗИНОВОЙ ПРИРОДЫ

Шилягина Н.Ю.¹, Коныгин К.А.¹, Костюк А.Б.¹, Лермонтова С.А.^{1,2},
Клапшина Л.Г.^{1,2}, Балалаева И.В.¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: nat-lekanova@yandex.ru

²Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН

ул. Тропинина, 49, г. Нижний Новгород, 603137, РФ

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. В работе продемонстрирована возможность мониторинга ответа опухолевых клеток на фотодинамическое воздействие с помощью фотосенсибилизатора порфиразиновой природы со свойствами вязкостного сенсора. Исследование выполнено с использованием тетрапиррольного красителя – тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина. Показано, что порфиразин эффективно поглощает и флуоресцирует в области «окна прозрачности» биологических тканей и демонстрирует свойства флуоресцентного молекулярного ротора, проявляя высокую чувствительность параметров флуоресценции к изменениям вязкости среды. Установлено, что основными местами внутриклеточной локализации порфиразина являются околядерная область клетки и ядерная оболочка или непосредственно примыкающие к ней структуры. Продемонстрирована высокая фотодинамическая активность порфиразина в отношении клеток эпидермоидной карциномы кожи человека. В экспериментах *in vitro* зарегистрировано увеличение времени жизни возбужденного состояния порфиразина в клетках после фотодинамического воздействия, свидетельствующее об увеличении локальной внутриклеточной вязкости и начавшихся необратимых дегенеративных процессах, влекущих за собой гибель опухолевых клеток.

Ключевые слова: порфиразин, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия, флуоресцентный молекулярный ротор, внутриклеточная вязкость.

ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является одним из интенсивно развивающихся методов лечения злокачественных новообразований. В основе ФДТ лежит метод локальной активации накопившегося в ткани флуоресцентного красителя-фотосенсибилизатора видимым светом, что в присутствии кислорода приводит к развитию свободно-радикальных реакций и, в конечном итоге, к гибели клеток-мишеней [6].

Несмотря на то, что ФДТ активно развивается, и область применения данного вида терапии все время расширяется, механизмы, лежащие в основе фотодинамической реакции, до конца не изучены. Следует отметить, что нерешенной представляется и задача раннего контроля эффективности ФДТ, а также индивидуализации дозовых нагрузок.

В качестве одного из подходов, направленных на контроль протекания ФДТ, в настоящее время предлагается использование флуорофоров, сочетающих свойства фотосенсибилизаторов и флуоресцентных молекулярных роторов [7]. Термин «молекулярные роторы» относится к соединениям, молекулы которых состоят из нескольких фрагментов, способных поворачиваться (вращаться) друг относительно друга. В средах с низкой вязкостью энергия, полученная молекулярным ротором вследствие поглощения кванта света, в основном расходуется на вращение (или поворот) отдельных групп в молекуле. В вязком окружении, где внутримолекулярное движение затруднено, энергия будет расходоваться на флуоресценцию, что приведет к возрастанию квантового выхода флуоресценции и увеличению времени жизни возбужденного состояния. [1]. Сочетание же свойств фотосенсибилизатора и сенсора вязкости потенциально может позволить осуществлять мониторинг физиологического состояния клетки по изменению вязкости её внутренней среды, поскольку известно, что гибель клетки сопровождается значительным увеличением внутриклеточной вязкости [10].

Целью данной работы является исследование возможности использования тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразина в качестве фотосенсибилизатора и агента для мониторинга эффективности фотодинамической терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали соединение из класса порфиразинов – тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин $\text{pz}(\text{BnOPh})_4(\text{CN})_4$ (далее Pz) [12]. Данное соединение получено методом темплатного синтеза, разработанного в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН [8]. Структурная формула Pz представлена на рисунке 1.

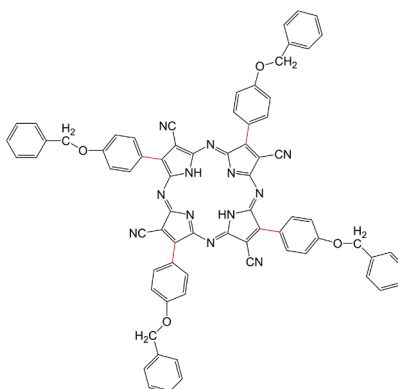


Рисунок 1. Структурная формула тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфирина (Pz)

Спектры поглощения и флуоресценции Pz регистрировали с помощью планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy MX (BioTek, США). Для этого готовили растворы Pz в деионизированной воде и спирто-глицериновых растворах различной вязкости. Концентрация Pz составляла 10 мкМ. Регистрацию спектров поглощения проводили в диапазоне длин волн 300-700 нм. Регистрацию спектров флуоресценции проводили в диапазоне 600-850 нм при длине возбуждения 360 нм.

Квантовый выход флуоресценции Pz определяли относительно родамина В (Sigma, США) в этаноле (0,65). Квантовый выход рассчитывали по формуле:

$$\varphi_1 = \frac{\varphi_2 F_1 D_2}{F_2 D_1}, \quad (1)$$

где φ_1 – квантовый выход флуоресценции порфирина; F_1 и D_1 – интенсивность флуоресценции и оптическая плотность порфирина соответственно; φ_2 – квантовый выход флуоресценции родамина В в этаноле (0,65); F_2 и D_2 – интенсивность флуоресценции и оптическая плотность родамина В соответственно.

Относительный квантовый выход флуоресценции Pz определяли для серии этанол-глицериновых растворов с процентным содержанием глицерина от 0 до 100 % с шагом 10 %. При построении зависимости квантового выхода флуоресценции Pz от вязкости раствора использовали табличные значения вязкости этанол-глицериновых растворов при температуре 25 °С.

Исследования внутриклеточной локализации, световой и темновой токсичности Pz и возможности мониторинга фотодинамической реакции проводили на клеточной линии эпидермоидной карциномы кожи человека A431 (номер по каталогу ATCC® CRL-1555™). Клетки культивировали в 25 см²-культуральных флаконах (Corning, США) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ на питательной среде DMEM (HyClone, США), содержащей 10 % бычьей фетальной сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Для снятия клеток с культурального флакона использовали раствор трипсин : ЭДТА (1:1) (ПанЭко, Россия), для промывки клеток использовали 10 мМ фосфатно-солевой буфер (PBS).

Для исследования внутриклеточной локализации Pz клетки A431 сажали в лунки тонкодонного 96-луночного планшета (Corning, США) в количестве 15 тыс. клеток на лунку и инкубировали в течение ночи. Затем питательную среду заменяли на 200 мкл раствора Pz (концентрация 5 мкМ) в среде с 10 % бычьей фетальной сывороткой и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 2,5 часов. Время инкубации с порфирином было определено на основании предварительных экспериментов по оценке динамики накопления Pz клетками. Изображения клеток получали с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия). При регистрации флуоресценции Pz использовали двухфотонное возбуждение на длине волны 800 нм. Флуоресценцию принимали в диапазоне 630-700 нм.

Для анализа жизнеспособности клетки A431 высаживали на 96-луночный планшет (Corning, США) в количестве 3 тыс. клеток на лунку и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение ночи. Затем питательную среду заменяли средой, содержащей Pz в различных концентрациях, и инкубировали клетки в течение 4-х часов. После инкубации среду с фотосенсибилизатором заменяли на полную культуральную среду, после чего клетки подвергали облучению в термостатируемых условиях при 37 °С при помощи специального светодиодного излучателя для создания равномерного светового потока в стандартных 96-луночных планшетах [2]. Дозу облучения (20 Дж/см²) контролировали длительностью освещения (16 минут 40 секунд) и мощностью светового потока (20 мВт/см²). Оценку жизнеспособности проводили через 24 часа после облучения при помощи МТТ-теста.

Время-разрешенный имиджинг проводили на системе лазерной сканирующей микроскопии Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) с модулем FLIM (Becker & Hickl, Германия). Исследование времени жизни возбужденного состояния Pz в клетках до и через различные промежутки времени после облучения проводили при двухфотонном возбуждении на длине волны 800 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 640-710 нм. Полученные кривые затухания флуоресценции аппроксимировали

биэкспоненциальной зависимостью и по ним определяли средневзвешенное время жизни возбужденного состояния:

$$\tau_i = \frac{\alpha_1 \tau_1^2 + \alpha_2 \tau_2^2}{\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2}, \quad (2)$$

где α_1 – доля 1-компоненты; α_2 – доля 2-компоненты; τ_1 – время жизни возбужденного состояния 1-компоненты; τ_2 – время жизни возбужденного состояния 2-компоненты.

Фотодинамическое воздействие при микроскопических исследованиях в дозе 20 Дж/см² осуществляли путем сканирования участка образца лазером с длиной волны 594 нм с мощностью на объективе 75 мкВт.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования нами были проанализированы оптические свойства Pz как потенциального фотосенсибилизатора. Показано, что диапазон поглощения для Pz регистрируется в области 340-400 нм и 550-650 нм, с двумя максимумами на 360 нм (коротковолновая область, полоса Соре) и 590 нм (длинноволновая область, Q-полоса) (рис. 2). Коэффициент молярной экстинкции в длинноволновой области спектра составил $\sim 2 \cdot 10^5$ л·моль⁻¹·см⁻¹. Следует отметить, что такая структура спектра типична для тетрапиррольных макроциклических соединений [14]. Флуоресценция Pz регистрируется в области 625-825 нм, с пиком на 675 нм (рис. 2), что сходно со свойствами других представителей группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов [13, 15]. Исследование спектральных свойств Pz показало, что данное соединение поглощает и флуоресцирует в диапазоне длин волн, соответствующему окну прозрачности биологических тканей, что удовлетворяет одному из требований, которые предъявляются к «идеальным» фотосенсибилизаторам [6].

Для подтверждения принадлежности Pz к классу флуоресцентных молекулярных роторов нами были рассчитан относительный квантовый выход флуоресценции и определены значения времени жизни возбужденного состояния Pz в растворах различной вязкости. Отличительной чертой молекулярных роторов является сильная зависимость этих параметров флуоресценции от вязкости среды, связанная с индуцированным светом внутримолекулярным вращением или скручиванием [5]. Известно, что для соединений, которые обладают свойствами молекулярных роторов, зависимость флуоресцентных параметров от вязкости может быть описана с помощью уравнений Фёрстера-Хоффмана [4], связывающих квантовый выход флуоресценции (2) и время жизни возбужденного состояния (3) с вязкостью растворителя:

$$\lg(\varphi) = z + \alpha \lg(\eta), \quad (3)$$

где φ – квантовый выход флуоресценции; z и α – константы; η – вязкость.

$$\lg(\tau) = \lg(z/k_r) + \alpha \lg(\eta), \quad (4)$$

где τ – время жизни возбужденного состояния; η – вязкость; z и α – константы; k_r – константа скорости излучательного перехода.

Нами было установлено, что значение коэффициента α , характеризующего степень «вязкостной чувствительности» квантового выхода и времени жизни флуоресценции, составило 0,74 и 0,49 соответственно (рис. 3). Известно, что для молекулярных роторов коэффициент α равен, по разным источникам 0,5-0,75 [5] или 0,37-0,67 [11, 16]. Таким образом, нами было показано, что Pz обладает свойствами флуоресцентного молекулярного ротора.

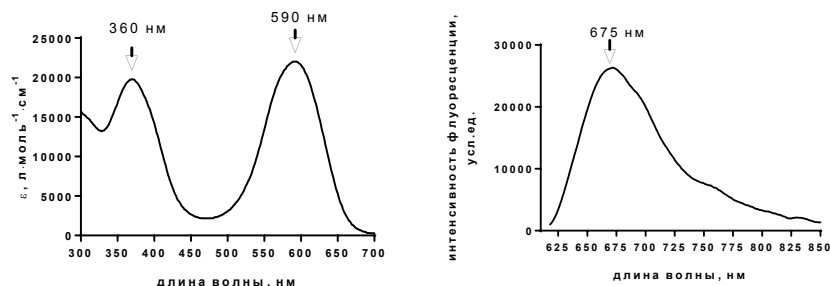


Рисунок 2. Спектры поглощения (слева) и флуоресценции (справа) Pz (10 мкМ) в воде, длина волны возбуждения флуоресценции 360 нм

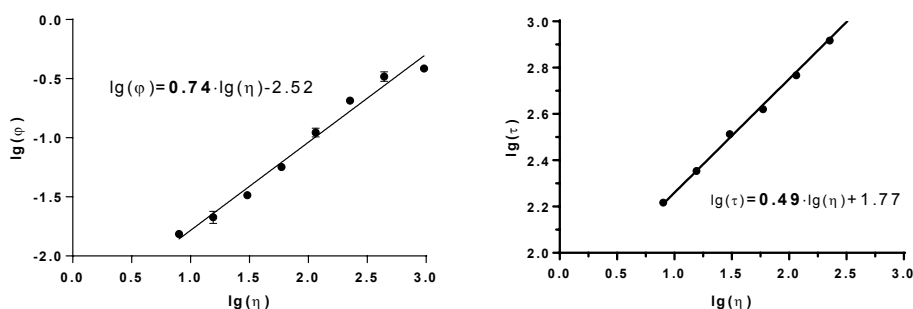


Рисунок 3. Зависимость квантового выхода (слева) и времени жизни флуоресценции (справа) Pz от вязкости среды

Ключевую роль в механизме фотоповреждения клетки играет внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора. Она определяет мишени, которые в первую очередь подвергнутся фотодинамическому воздействию. Это связано, прежде всего, с чрезвычайно малой (10-20 нм) диффузионной длиной синглетного кислорода и других АФК [3, 9]. Нами было показано, что основными местами внутриклеточной локализации Pz в клеточной культуре эпидермоидной карциномы человека являются околядерная область клетки и ядерная оболочка, либо непосредственно примыкающие к ней структуры. Накопление Pz в околядерной области и, в особенности, в ядерной оболочке может иметь важное значение для ФДТ, так как последняя наиболее чувствительна к фотоповреждению.

Нами была также проведена оценка световой активности Pz в отношении клеток A431 для подтверждения возможности использования Pz в качестве фотодинамического агента. На рисунке 5 показана зависимость жизнеспособности клеток линии A431 от концентрации Pz. Из рисунка видно, что исследуемый фотосенсибилизатор обладает выраженной фототоксичностью при облучении в дозе 20 Дж/см². Ингибирующая концентрация IC₅₀ при облучении составила 0,4 мкМ, тогда как в отсутствии освещения она превышала 10 мкМ.

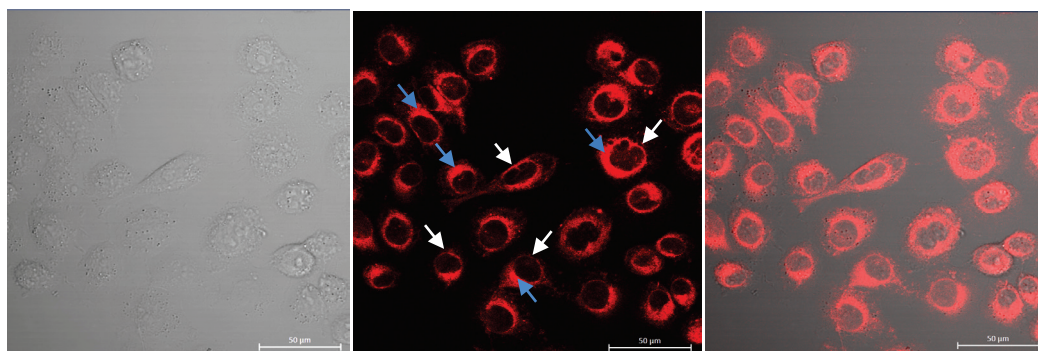


Рисунок 4. Внутриклеточная локализация Pz. Клеточная культура A431, концентрация Pz 5 мкМ, время инкубации 2,5 часа, длина волны возбуждения 594 нм, регистрация сигнала 630–700 нм. Размер изображений 212,5x212,5 мкм. Слева: изображение в проходящем свете, в центре: канал флуоресценции, справа: наложение каналов проходящего света и флуоресценции. Голубыми стрелками указана цитоплазма, белыми – ядерная оболочка

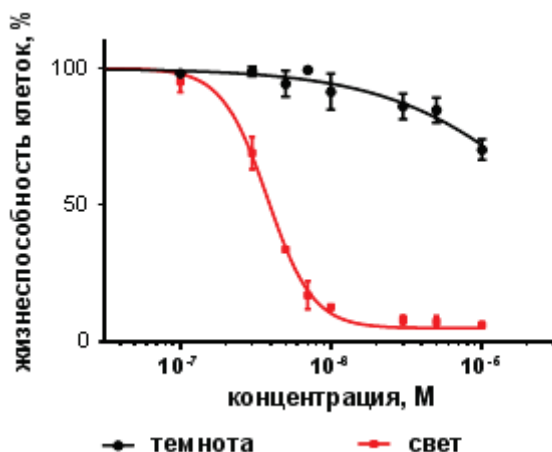


Рисунок 5. Зависимость жизнеспособности клеток A431 от концентрации в среде Pz. Черная кривая – инкубация в темноте, красная – 20 Дж/см²

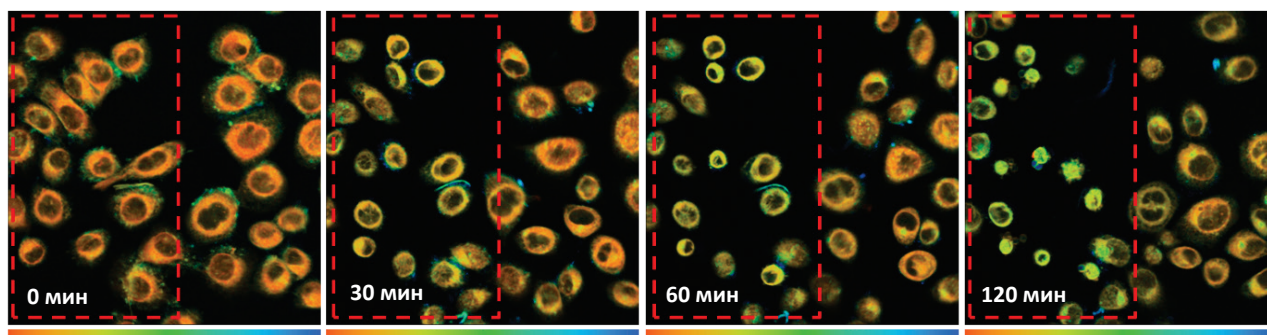


Рисунок 6. Изменение времени жизни возбужденного состояния Pz в клетках A431 при фотодинамическом воздействии. Метод FLIM. Размер изображений 212,5x212,5 мкм. Длина волны возбуждения 800 нм, диапазон регистрации сигнала 640-710 нм. Доза облучения 20 Дж/см² (лазер 594нм), область облучения выделена красным пунктиром. Псевдоцветная палитра отображает времена жизни в диапазоне от 400 до 2400 пс

Таким образом, Pz является одновременно фотосенсибилизатором (проявляет фотодинамическую активность в отношении опухолевых клеток в культуре) и флуоресцентным молекулярным ротором (характеризуется высокой вязкостной чувствительностью). По данным литературы известно, что гибель клеток сопровождается увеличением внутриклеточной вязкости [10], благодаря этому, мы имеем потенциальную возможность отслеживать протекание фотодинамической реакции по изменению фотофизических свойств Pz, а именно, времени жизни возбужденного состояния, зависящего от локальных вязкостных параметров. Для подтверждения этой гипотезы нами была проведена серия экспериментов, в ходе которых часть поля зрения микроскопа, в которой находились клетки, накопившие Pz, подвергалась облучению, при этом необлученная часть клеток играла роль контроля. При проведении мониторинга нами оценивалось морфологическое состояние клеток и изменение времени жизни возбужденного состояния Pz в клетках, которые подвергались фотодинамическому воздействию.

Нами было показано, что в облученной области (рис. 6), выделена красным пунктиром, клетки заметно округлились уже через 30 минут после воздействия, что напрямую свидетельствует об их фотодинамическом повреждении. В необлученной области клетки практически не меняли своей изначальной морфологии. Кроме того, наблюдалось значительное увеличение времени жизни возбужденного состояния Pz в клетке в облученной области (рис. 6). Количественная оценка наблюдаемых явлений показала увеличение времени жизни возбужденного состояния Pz от 660 до 1040 пс (рис. 7, 8 слева). Некоторое изменение наблюдалось и в области, которая не подвергалась фотодинамическому воздействию, что мы связываем с дозой света, полученной при сканировании клеток с целью получения изображения. В данной области изменения значительно менее выражены – время жизни возбужденного состояния увеличивается от 680 до 800 пс (рис. 7 и 8 справа). Изменения времени жизни Pz в сторону увеличения могут свидетельствовать либо о возрастании локальной вязкости в клетках, либо о других стерических затруднениях, которые могут объясняться, в частности, связыванием Pz с макромолекулами клетки. Сильная зависимость фотофизических свойств, таких как квантовый выход и время жизни возбужденного состояния, от потенциального свободного объема делает возможным использование Pz в качестве сенсора для определения параметров микроокружения при протекании внутриклеточных процессов.

Кроме изменения времени жизни возбужденного состояния Pz происходило его постепенное фотообесцвечивание (рис. 7 и 8 слева), что свидетельствует о фотохимической деградации молекул фотосенсибилизатора в ходе фотодинамических реакций.

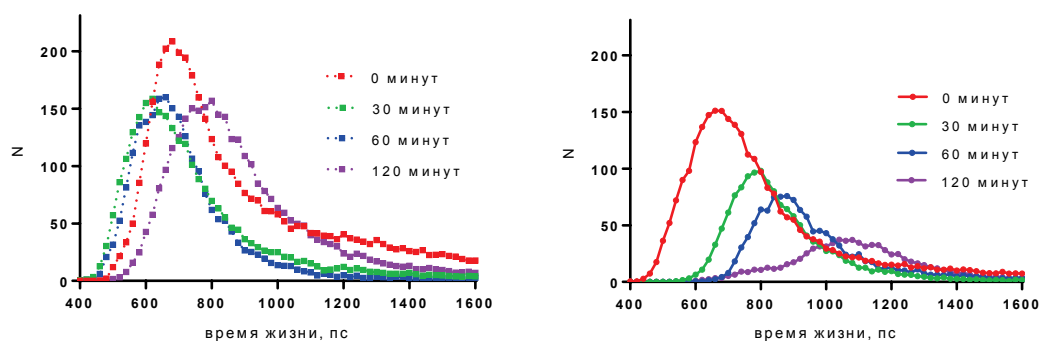


Рисунок 7. Зависимость распределения времени жизни возбужденного состояния Pz на полученных FLIM-изображениях в контрольной (слева) и облученной (справа) областях от времени, прошедшего с момента облучения. Доза облучения 50 Дж/см² (лазер 594 нм). N – количество пикселей на полученных FLIM-изображениях с соответствующим средневзвешенным временем жизни возбужденного состояния

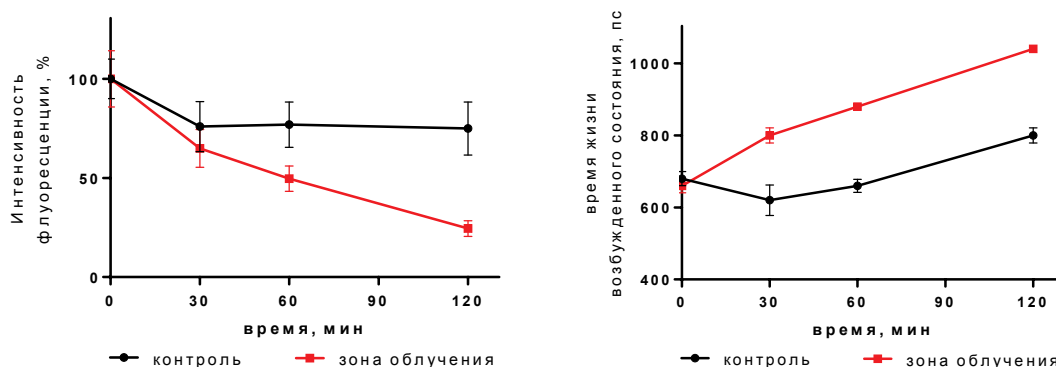


Рисунок 8. Зависимость интенсивности флуоресценции в % от исходной (слева) и времени жизни возбужденного состояния (справа) Pz в контрольной и облученной областях от времени, прошедшего с момента облучения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованный в работе тетра(4-бензилоксифенил)тетрацианопорфиразин относится к уникальной группе соединений, которые сочетают свойства эффективного фотодинамического агента и сенсора локальной вязкости. Данное соединение не только соответствует требованиям, которые предъявляются к «идеальным» фотосенсибилизаторам – поглощение и флуоресценция в «оптическом окне» прозрачности биологических тканей, высокая фотодинамическая активность в отсутствие выраженной темновой токсичности, накопление в важной внутриклеточной мишени клетки – ядерной оболочке, но и является флуоресцентным молекулярным ротором. Выраженная зависимость таких параметров флуоресценции, как квантовый выход и время жизни возбужденного состояния, от локальной внутриклеточной вязкости делает возможным использование порфиразина в качестве сенсора протекания внутриклеточных процессов, в том числе индуцированных фотодинамическим воздействием.

Таким образом, роторные свойства Pz как фотосенсибилизатора могут открыть новые перспективы в области исследования механизмов ответа клетки на фотодинамическое воздействие, позволяя с помощью измерения времени жизни возбужденного состояния фотосенсибилизатора отслеживать изменения внутриклеточной среды, которые, в свою очередь, коррелируют с функциональным состоянием клетки.

Работа выполнена в рамках Госзадания №6.3099.2017/ПЧ (химический синтез и исследование фотофизических свойств) и проекта МК 980.2017.4 (исследования на клеточных культурах).

Список литературы / References:

1. Ужинов Б.М., Иванов В.Л., Мельников М.Я. Молекулярные роторы – люминесцентные сенсоры локальной вязкости и вязкого течения в растворах и биологических системах. *Успехи химии*, 2011. т. 80, № 12, с. 1231-1243. [Uzhinov B.M., Ivanov V.L., Melnikov M.Ya. Molecular rotors as luminescence sensors of local viscosity and viscous flow in solutions and organized systems. *RUSS CHEM REV*, 2011, vol. 80, no. 12, pp.1179-1190. (In Russ.)]
2. Шилиягина Н.Ю., Плеханов В.И., Шкунов И.В. Светодиодный излучатель для исследования *in vitro* световой активности препаратов для фотодинамической терапии. *Современные технологии в медицине*, 2014, т. 6, № 2, с. 15-24. [Shilyagina N.Y., Plekhanov, V.I., Shkunov I.V., Shilyagin P.A., Dubasova L.V., Brilkina A.A., Sokolova E.A., Turchin I.V., Balalaeva I.V. LED Light Source for *in vitro* Study of Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 15-22. (In Russ.)]
3. DeRosa M.C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002, vol. 233, pp. 351-371.
4. Förster T., Hoffmann G. Die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten einiger Farbstoffsysteme. *Z Phys Chem*, 1971, vol. 75, p. 6376.
5. Haidekker M., Brady T., Wen K., Okada C., Stevens H., Snell J., Frangos J., Theodorakis E. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 33, no. 6, pp. 415-425.
6. Hamblin M.R., Mroz P. History of PDT: The first hundred years. In: *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*. Norwood, MA: Artech House, Inc, 2008.
7. Izquierdo M. Angeles, Vyšniauskas Aurimas, Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Kuimova M.K. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers during photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, no. 3, pp.1089-1096.
8. Klapshina L.G., Douglas W.E., Grigoryev I.S., Ladilina E.Yu, Shirmanova M.V., Mysyagin S.A., Balalaeva I.V., Zagaynova E.V. Novel PEG-organized biocompatible fluorescent nanoparticles doped with an ytterbium cyanoporphyrazine complex for biophotonic applications. *Chem. Commun.*, 2010, no. 44, pp. 8398-8400.

9. Krasnovskii A.A. Photodynamic activity and singlet oxygen. *Biofizika*, 2004, vol. 49, no. 2, pp. 305-21.
10. Kuimova M.K., Botchway S.W., Parker A.W., Balaz M., Collins H.A., Anderson H.L., Suhling K., Ogilby P.R. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nat Chem*, 2009, vol. 1, pp. 69-73.
11. Kuimova M.K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, vol. 14, no. 37, pp. 12671-12686.
12. Lermontova S., Grigorev I., Shilyagina N., Peskova N., Balalaeva I., Shirmanova M., Klapshina L. New Porphyrine Macrocycles with High Viscosity-Sensitive Fluorescence Parameters. *Russian Journal of General Chemistry*, 2016, vol. 86, no. 6, pp. 1011-1018.
13. Lermontova S.A., Grigor'ev I.S., Ladilina E.Y., Balalaeva I.V., Shilyagina N.Y., Klapshina L.G. Porphyrine Structures with Electron-Withdrawing Substituents as the Base for Materials for Photonics and Biomedicine. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 2018, vol. 44, no. 4, pp. 301-315.
14. Makarov D.A., Yuzhakova O.A., Slivka L.K., Kuznetsova N.A., Negrimovsky V.M., Kaliya O.L., Lukyanets E.A. Cationic Zn and Al phthalocyanines: synthesis, spectroscopy and photosensitizing properties. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2007, vol. 11, no. 8, pp. 586-595.
15. Shilyagina N.Yu., Peskova NN, Lermontova SA, Brilkina AA, Vodenev VA, Yakimansky AV, Klapshina LG, Balalaeva IV. Effective delivery of porphyrine photosensitizers to cancer cells by polymer brush nanocontainers. *Journal of Biophotonics*, 2017, vol. 10, no. 9, pp. 1189-1197.
16. Yoon H., Dakanali M., Lichlyter D., Chang W., Nguyen K., Nipper M., Haidekker M., Theodorakis E. Synthesis and evaluation of self-calibrating ratiometric viscosity sensors. *Org. Biomol. Chem.*, 2011, vol. 9, no. 9, pp. 3530-3540.

MONITORING OF INTRACELLULAR VISCOSITY OF CANCER CELLS UNDER PHOTODYNAMIC TREATMENT WITH A PORPHYRINE PHOTSENSITIZER

Shilyagina N.Yu.¹, Konygin K.A.¹, Kostyuk A.B.¹, Lermontova S.A.^{1,2}, Klapshina L.G.^{1,2}, Balalaeva I.V.¹

¹Lobachevsky University

Gagarin ave., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia: e-mail: nat-lekanova@yandex.ru

²G.A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry of the RAS

Tropinin str., 49, Nizhny Novgorod, 603137, Russia

Abstract. The possibility of monitoring of cancer cells response to photodynamic treatment by the use of porphyrine photosensitizer as a viscosity sensor is shown. The research was done with tetrapyrrole dye – tetra(4-benzyloxyphenyl)tetracyanoporphyrine. The dye was shown to demonstrate effective absorption and fluorescence in biological transparent window. In addition, the dye has a molecular rotor properties showing high sensitivity of fluorescence parameters to media viscosity changes. Pre-nuclear region and nuclear membrane or its environment are shown to be the primary space of intracellular accumulation of the dye. The high photodynamic activity of the porphyrine was detected in relation to epidermoid carcinoma cells of human skin. The significant increase of fluorescence life-time of the dye inside the cells was registered after the photodynamic therapy. It may be concerned as an evidence of the local intracellular viscosity increase and a verification of irreversible degenerative processes onset, leading to the death of cancer cells.

Key words: porphyrine, photosensitizer, photodynamic therapy, fluorescent molecular rotor, intracellular viscosity.