

МОДЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ СФЕРОИДОВ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

DOI: 10.17691/stm2020.12.1.04

УДК 615.831:547.89:618.11-006.66-085

Поступила 18.04.2019 г.



Е.А. Соколова, к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории оптической тераностики
Института биологии и биомедицины¹;

А.О. Сенатская, магистрант Института биологии и биомедицины¹;

С.А. Лермонтова, к.х.н., научный сотрудник лаборатории поисково-прикладных исследований²;

Е.К. Акинчиц, к.б.н., научный сотрудник кафедры биофизики Института биологии и биомедицины¹;

Л.Г. Клапшина, к.х.н., старший научный сотрудник сектора хромофорных соединений для медицины²;

А.А. Брилкина, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории оптической тераностики
Института биологии и биомедицины¹;

И.В. Балалаева, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории оптической тераностики
Института биологии и биомедицины¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

²Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, ул. Тропинина, 49, Н. Новгород, 603137

Цель исследования — оценка релевантности модели сфероидов аденокарциномы яичника для изучения фотодинамического воздействия путем сравнительного анализа ответа клеток аденокарциномы яичника на фотосенсибилизатор тетраакис(4-бензилорфенил)тетрацианопорфиразин в условиях монослойной культуры и опухолевых сфероидов.

Материалы и методы. Работа выполнена на клетках аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3, выращиваемых *in vitro* в монослойной культуре или в виде опухолевых сфероидов, которые получены с использованием культурального пластика со сверхнизкой адсорбцией. В качестве фотосенсибилизатора применен порфиразин. Фотоиндуцированная токсичность соединения в отношении монослойной культуры исследована методом МТТ, в отношении сфероидов — путем оценки динамики их роста. Анализ проникновения в клетки выполнен методом конфокальной микроскопии.

Результаты. Порфиразин оказывает выраженный фотодинамический эффект на клетки SKOV-3. Значение IC₅₀ для монослойной культуры через 24 ч после воздействия составило 2,3 мкМ при облучении в дозе 20 Дж/см². В случае сфероидов эффект проявлялся в течение более длительного времени: существенные отличия в размере обработанных сфероидов от контрольных наблюдались на 5-й и 9-й дни инкубации. При этом ни при одном из режимов фотодинамического воздействия нами не отмечено уменьшения размера обработанных сфероидов. Глубина проникновения порфиразина в сфероид составляла 50–100 мкм при инкубации до 24 ч включительно.

Заключение. Ограниченное проникновение фотосенсибилизатора вглубь сфероидов и преимущественное накопление в поверхностных клеточных слоях может служить одним из ключевых факторов, обуславливающих значительные различия в интенсивности фотодинамического воздействия на поверхностные и глубокие слои сфероидов. В отношении клеток, расположенных близко к поверхности, фотодинамический эффект сравним с таковым для монослойной культуры, в то время как клетки глубоких слоев сохраняют жизнеспособность и обеспечивают продолжающийся рост сфероидов даже при интенсивных воздействиях. Тот факт, что наблюдающееся *in vitro* распределение соответствует особенностям накопления фотосенсибилизаторов в опухолях *in vivo*, позволяет рассматривать сфероиды как наиболее релевантную модель для исследования свойств фотодинамических агентов по сравнению с монослоем.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия; фотосенсибилизатор; опухолевый сфероид; аденокарцинома яичника человека; порфиразины.

Как цитировать: Sokolova E.A., Senatskaya A.O., Lermontova S.A., Akinchits E.K., Klapshina L.G., Brilkina A.A., Balalaeva I.V. Model of ovarian adenocarcinoma spheroids for assessing photodynamic cytotoxicity. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(1): 34–42, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.1.04>

Для контактов: Соколова Евгения Александровна, e-mail: malehanova@mail.ru

Model of Ovarian Adenocarcinoma Spheroids for Assessing Photodynamic Cytotoxicity

E.A. Sokolova, PhD, Junior Researcher, Laboratory of Optical Theranostics, Institute of Biology and Biomedicine¹;

A.O. Senatskaya, Graduate Student, Institute of Biology and Biomedicine¹;

S.A. Lermontova, PhD, Researcher, Laboratory for Search and Applied Research²;

E.K. Akinchits, PhD, Researcher, Department of Biophysics, Institute of Biology and Biomedicine¹;

L.G. Klapshina, PhD, Senior Researcher, Sector of Chromophore Compounds for Medicine²;

A.A. Brilkina, PhD, Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Optical Theranostics, Institute of Biology and Biomedicine¹;

I.V. Balalaeva, PhD, Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Optical Theranostics, Institute of Biology and Biomedicine¹

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²G.A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 49 Tropinina St., Nizhny Novgorod, 603137, Russia

The aim of the study was to compare the relevance of ovarian adenocarcinoma spheroids with that of a monolayer culture for assessing photodynamic effect of the tetrakis(4-benzyloxyphenyl)tetracyanoporphyrazine photosensitizer.

Materials and Methods. The work was performed on SKOV-3 human ovary adenocarcinoma cells grown *in vitro* in a monolayer culture and in the form of tumor spheroids obtained using culture plates with ultra-low attachment. We determined the photoinduced toxicity of porphyrazine on a monolayer culture using the MTT assay; the effect on the spheroids was tested by assessing the dynamics of their growth. Cellular uptake of porphyrazine was analyzed by confocal microscopy.

Results. Porphyrazine has a pronounced photodynamic effect on SKOV-3 cells. When exposed to light at a dose of 20 J/cm², the IC₅₀ value 24 h after exposure was 2.3 μM for SKOV-3 monolayer culture. For the spheroids, the effect manifested after a latency period: significant growth retardation of the treated spheroids appeared no sooner than 5 and 9 days after exposure. Notably, no decrease in the initial size of the treated spheroids was observed under any of the photodynamic regimes. The penetration depth of porphyrazine into spheroids was 50–100 μm during 24 h incubation.

Conclusion. The limited penetration of the photosensitizer into the body of spheroids and its predominant accumulation in the surface layers can be one of the key factors behind the significant differences in the photodynamic response between the surface and deep layers of a spheroid. For cells located close to the spheroid surface, the photodynamic effect is comparable to that for a monolayer culture, while in deeper layers, the cells remain viable and support/maintain the growth of the spheroid even under intense photo-exposure. The fact that the *in vitro* distribution is similar to the inhomogeneous accumulation of photosensitizers in tumors *in vivo* allows us to consider spheroids more relevant than a monolayer culture for studying photodynamic anti-tumor effects.

Key words: photodynamic therapy; photosensitizer; tumor spheroid; human ovarian adenocarcinoma; porphyrazines.

Введение

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) — это современный, малоинвазивный, интенсивно развивающийся способ диагностики и лечения злокачественных новообразований и ряда неопухолевых заболеваний. Фотодинамическая реакция индуцируется при облучении фотоактивного красителя — фотосенсибилизатора — светом определенной длины волны в присутствии кислорода [1, 2]. В результате продуцируются активные формы кислорода, что приводит к развитию цепных свободнорадикальных процессов, вызывающих повреждение биомолекул и мембранных структур. В конечном итоге в клетке активируются сигнальные пути, приводящие к ее гибели [3]. Основной

молекулой-эффектором при ФДТ считается синглетный кислород [4], но значительную роль играют и другие активные формы кислорода, такие как пероксид водорода [5], супероксидный анион-радикал и гидроксильный радикал [6].

В качестве фотосенсибилизаторов используются химические соединения различных структурных типов, которые можно подразделить на порфириновые и непорфириновые [7]. Из непорфириновых соединений наибольшее развитие получили препараты на основе фенотиазиновых красителей (аналоги метиленового голубого, толуидинового голубого и нильского синего) и цианинов, а также полициклические ароматические соединения (гиперицин). Фотоактивные красители с тетрапирольной структурой включают гематопорфирины,

протопорфирин XI и препараты второго поколения — порфирины, хлорины и бактериохлорины, феофорбиды, пурпурины, протопорфирины, порфиразины, в том числе фталоцианины, и др. [8–12].

Перспективными агентами для ФДТ служат соединения из класса тетра(арил)тетрацианопорфиринов [13, 14]. Уникальной особенностью данной группы фотосенсибилизаторов является высокая чувствительность их фотофизических параметров к вязкости. Такое поведение объясняется принадлежностью этих соединений к так называемым флуоресцентным молекулярным роторам. Для них характерно внутримолекулярное вращение боковых радикалов макроцикла при поглощении кванта света, что обеспечивает безызлучательную релаксацию возбужденного состояния молекулы [15]. При увеличении вязкости среды вращение радикалов затруднено. Это отражается в многократном увеличении квантового выхода и времени жизни флуоресценции. Ранее [16] нами была показана возможность использования соединений из данного класса для мониторинга вязкостных свойств клеток при развитии ответа клеток на ФДТ. В перспективе подход, основанный на применении соединений с описанным сочетанием свойств, можно использовать как основу для разработки методов ФДТ с контролем функционального состояния облучаемой ткани в режиме реального времени.

Традиционно при апробации новых фотоактивных соединений используют их тестирование на монослойных клеточных культурах. Такие культуры имеют ряд несомненных преимуществ: характеризуются простотой получения и поддержания, а также обеспечивают возможность контроля состояния каждой индивидуальной клетки. Однако монослойные культуры не отражают многих свойств реальных опухолей, обусловленных их трехмерной организацией. Опухоль характеризуется наличием градиентов газов, питательных веществ и катаболитов, присутствием клеток неопухолевой природы и межклеточного матрикса. Специфическое микроокружение клеток обуславливает гетерогенность клеток опухоли в отношении особенностей метаболизма, экспрессии генов и резистентности к терапевтическим воздействиям [17, 18].

В связи с перечисленным все большее распространение получают трехмерные (3D) *in vitro* модели опухолей — от сферических конгломератов опухолевых клеток (сфероидов) до сложных многокомпонентных моделей, — включающих помимо опухолевых клеток клеточные компоненты опухолевой стромы, а также внеклеточный матрикс [19, 20]. Структурная близость 3D-моделей к реальным опухолям подразумевает их более высокую релевантность по сравнению с монослойными культурами. К настоящему времени опубликован ряд работ, в которых показано влияние трехмерной структуры *in vitro* на молекулярные механизмы, запускаемые в клетках карцином легкого и толстого кишечника при ответе на фотодинамическое воздей-

ствие и, как следствие, на чувствительность клеток к ФДТ [21, 22], однако в отношении аденокарциномы яичника подобные исследования не проводились.

Цель исследования — оценка релевантности модели сфероидов аденокарциномы яичника для изучения фотодинамического воздействия путем сравнительного анализа ответа клеток аденокарциномы яичника на фотосенсибилизатор тетраакис(4-бензилоксибензил)тетрацианопорфиразин в условиях монослойной культуры и опухолевых сфероидов.

Материалы и методы

Получение сфероидов аденокарциномы яичника человека SKOV-3. Для работы использовали клеточную линию аденокарциномы яичников человека — SKOV-3 (номер по каталогу ATCC — HTB-77). Клетки культивировали в условиях CO₂-инкубатора (5% CO₂, 37°C) на питательной среде McCoy's 5A, содержащей 1,5 мМ глутамин (HyClone, США), с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка (HyClone). Для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена («ПанЭко», Россия).

Для получения сфероидов суспензию клеток SKOV-3 высаживали на 96-луночные круглодонные планшеты из пластика со сверхнизкой адсорбцией Ultra-Low Attachment Microplate (Corning, США) в количестве 500 клеток на лунку и культивировали в течение 3 сут до формирования хорошо оформленных конгломератов клеток [23]. При длительном культивировании сфероидов среду в лунках заменяли раз в 7 дней для поддержания жизнедеятельности клеток.

Исследование жизнеспособности клеток SKOV-3 в монослое после фотодинамического воздействия. В работе использовали новое фотоактивное соединение из класса порфиразинов — тетраакис(4-бензилоксибензил)тетрацианопорфиразин (порфиразин), синтезированное в Институте металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН (Н. Новгород) [24].

Клетки SKOV-3 рассаживали на два культуральных 96-луночных планшета в количестве 2000 клеток на лунку. Через сутки ростовую питательную среду заменяли на среду McCoy's 5A без сыворотки, содержащую порфиразин в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкМ, и инкубировали ее в течение 4 ч в условиях CO₂-инкубатора (5% CO₂, 37°C). Затем среду, содержащую порфиразин, заменяли на свежую среду с сывороткой. После этого клетки в одном из планшетов облучали в дозе света 20 Дж/см² с помощью светодиодного излучателя с фотодиодами, длина волны которого составила 615–635 нм [25]. Второй планшет с клетками в это время находился в темноте. Затем клетки в обоих планшетах инкубировали в условиях CO₂-инкубатора в течение суток и оценивали их жизнеспособность методом МТТ-теста [26]. Для этого среду в лунках заменяли на свежую среду, содержащую 0,5 мг/мл МТТ (Alfa Aesar, Великобритания), и инкуби-

рвали в течение 4 ч. Затем кристаллы формазана, образовавшиеся в живых клетках в результате восстановления МТТ митохондриальными оксидоредуктазами, растворяли в диметилсульфоксиде («ПанЭко»), а потом измеряли оптическую плотность в лунках при $\lambda=570$ нм с использованием планшетного спектрофотометра Synergy MX (BioTek, США). Относительную жизнеспособность клеток представляли в виде процентного соотношения усредненной оптической плотности в лунках с обработанными и необработанными клетками. На основании полученных данных рассчитывали значение IC_{50} порфиразина методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели «доза–эффект» в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software).

Исследование роста сфероидов SKOV-3 после фотодинамического воздействия. Сфероиды SKOV-3 инкубировали в среде McCoy's 5A без сыворотки, содержащей порфирин в тех же концентрациях, что и для монослоя, в течение 4 ч. После этого среду заменяли на среду с сывороткой и проводили фотодинамическое воздействие в тех же условиях, что и в случае с монослойной культурой. Затем сфероиды инкубировали в условиях CO_2 -инкубатора (5% CO_2 , 37°C) в течение 9 дней.

Изображения сфероидов получали ежедневно с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 200 с использованием объектива EC Plan-Neofluar 10×/0.3 M27 (Carl Zeiss, Германия). Для определения размеров сфероидов использовали программное обеспечение Microscope AxioVision LE. Объем сфероидов (V , μm^3) рассчитывали по формуле: $V=a \cdot b^2/2$, где a — больший диаметр (μm), b — меньший диаметр (μm). Объем каждого сфероида в каждой временной точке представляли в процентах от объема в день облучения. На основании полученных данных рассчитывали значение IC_{50} порфиразина методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели «доза–эффект» в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

Анализ проникновения фотосенсибилизатора в клетки SKOV-3. Для исследования распределения порфиразина в клетках монослойной культуры клетки SKOV-3 высаживали на тонкодонные чашки Петри (Eppendorf, Германия) в количестве 200 000 клеток на чашку. Через сутки ростовую питательную среду заменяли на среду McCoy's 5A без сыворотки, содержащую порфиразин в концентрации 1 или 10 μM , и инкубировали в течение 4 ч при 37°C и 5% CO_2 . Сфероиды получали описанным выше способом и инкубировали в присутствии 1 или 10 μM порфиразина в течение 1, 4 или 24 ч также в питательной среде McCoy's 5A без сыворотки. Указанные варианты продолжительности инкубации были выбраны нами по предварительным результатам исследования фармакокинетики порфиразина *in vivo*, обнаружившим практически полное выведение его из опухоли через сутки после внутривенного введения.

По завершении инкубации клетки однократно промывали PBS, фиксировали 4% формальдегидом в PBS в течение 15 мин в темноте, после чего дважды промывали PBS. Изображения монослоя и сфероидов получали с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO Duo (Carl Zeiss, Германия) с использованием объективов C-Apochromat 63×/1.20 W Korr M27 и EC Plan-Neofluar 20×/0.50 M27 соответственно. Для возбуждения флуоресценции порфиразина использовали лазер с $\lambda=594$ нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 600–693 нм.

Результаты

Цитотоксичность порфиразина для клеток аденокарциномы яичника человека. Исследуемое в работе соединение порфиразина представляет собой фотосенсибилизатор с широкой полосой поглощения в красной области спектра и флуоресценцией с максимумом эмиссии при 670 нм [24]. Высокая липофильность данного соединения обеспечивает его поступление и распределение в плазматической и внутриклеточных мембранах клеток.

Для анализа цитотоксичности исследуемого фотосенсибилизатора в отношении монослойной культуры клеток SKOV-3 использовали стандартный МТТ-тест. Результаты исследования показали значительное снижение жизнеспособности клеток SKOV-3 в монослое в результате фотодинамического воздействия с порфиразином в диапазоне концентраций 0,1–10,0 μM при дозе облучения 20 Дж/см²: через 24 ч после облучения рассчитанное значение IC_{50} составило 2,3 μM (рис. 1, красная кривая). При этом темновая токсичность данного соединения (в отсутствие облучения) не наблюдалась (рис. 1, черная кривая). Ранее [27] было показано, что в отношении клеток эпидермоидной

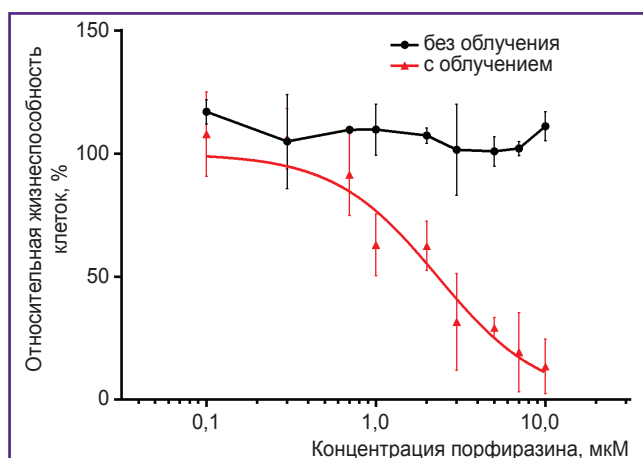


Рис. 1. Относительная жизнеспособность клеток SKOV-3 в монослое в зависимости от концентрации порфиразина в среде без облучения (в темноте) и через 24 ч после облучения светом 615–635 нм в дозе 20 Дж/см². Показаны средние значения ± стандартная ошибка среднего (n=3)

карциномы человека A-431 значение IC_{50} исследуемого порфиразина в аналогичных условиях облучения было существенно ниже и составило 0,68 мкМ, что в совокупности свидетельствует об относительно высокой устойчивости клеток SKOV-3 к действию этого фотосенсибилизатора.

Фотоиндуцированная токсичность порфиразина в отношении опухолевых сфероидов аденокарциномы яичника человека. Для получения сфероидов SKOV-3 мы использовали круглодонные планшеты со сверхнизкой адсорбцией. Сфероиды формировались на 3-й день после посадки клеток в планшет и представляли собой плотные округлые конгломераты клеток с четко очерченной границей.

Об эффективности фотодинамического действия порфиразина в отношении сфероидов судили по динамике их роста. В отсутствие фотодинамического воздействия в течение 9 дней после формирования сфероида наблюдалась близкая к линейной зависимость его объема от времени инкубации (рис. 2). Отклонение от типичной для клеточных культур экспоненциальной зависимости может объясняться затрудненным проникновением вглубь сфероидов питательных веществ и газов, а также оттоком катаболитов, что приводит к замедлению клеточного деления и увеличению доли покоящихся клеток [17, 28].

При обработке порфиразином и последующем облучении (20 Дж/см²) наблюдали дозозависимое торможение роста сфероидов (во избежание перегруженности рис. 2 на графике представлены кривые роста сфероидов при фотодинамическом воздействии порфиразином в двух концентрациях — 2,0 и 5,0 мкМ). В отличие от монослойной культуры в случае сфероидов эффект порфиразина проявлялся в течение более длительного времени: через 24 ч после

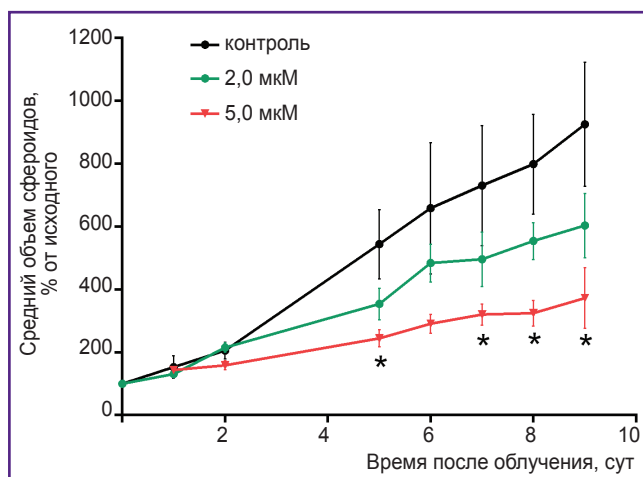


Рис. 2. Динамика роста сфероидов в контроле без облучения и после него в присутствии 2,0 или 5,0 мкМ порфиразина

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего; * — статистически значимое различие от контроля; $p < 0,05$, критерий Даннета ($n = 4-6$)

воздействия влияния на размер сфероидов не обнаруживалось (рис. 3, *бордовые столбики*), в то время как на 5-й и 9-й дни инкубации наблюдались значимые отличия в размере обработанных сфероидов от контрольных (рис. 3, *красные и розовые столбики*). На приведенных микрофотографиях сфероидов на 9-й день после фотодинамического воздействия также видно, что при высоких концентрациях порфиразина сфероиды разрыхляются, теряют четкие очертания и окружены дебрисом, что, по всей видимости, связано с гибелью клеток внешних слоев сфероида под действием порфиразина.

Необходимо отметить, что ни при одном из режимов фотодинамического воздействия нами не наблюдалось уменьшения размера обработанных сфероидов. Можно предположить, что в сфероидах сохраняется значительная по объему жизнеспособная популяция клеток: на рис. 3 видно, что рост сфероидов составлял не менее 40% от контроля даже в условиях, приводящих к практически полной гибели клеток в монослойной культуре. В то же время рассчитанные значения IC_{50} на 5-й и 9-й дни инкубации составили 3,5 и 1,8 мкМ соответственно, что близко к значению IC_{50} для монослоя клеток через 24 ч после облучения.

Влияние 3D-структуры на устойчивость опухолевых клеток к фотодинамическому воздействию неоднозначно. Так, опубликованы сведения о сопоставимой активности фотодинамического действия в отношении сфероидов и монослойной культуры в случае гибридного нанофотосенсибилизатора на основе комплексов рутения [29] и органических наночастиц, содержащих хлорин Е6 [30]. Большинство исследователей, однако, говорят о повышении устойчивости опухолевых клеток к фотодинамическому воздействию при их культивировании в условиях 3D-модели *in vitro* [22, 31, 32]. В качестве возможных причин высокой устойчивости рассматриваются низкая скорость проникновения фотосенсибилизатора в глубину клеточной массы; развитие гипоксических условий вследствие быстрого расходования кислорода в ходе фотодинамической реакции и его медленного возобновления; повышенная экспрессия белков из группы АВС-транспортеров, обеспечивающих активное выкачивание красителя из опухолевых клеток [22]; а также недавно показанное ингибирование активности ряда генов проапоптотических белков [21].

Особенности накопления порфиразина в клетках аденокарциномы яичника человека в монослое и в сфероидах. Для оценки эффективности проникновения фотосенсибилизатора в глубину сфероида как возможной причины устойчивости клеток к фотодинамическому воздействию нами было проанализировано накопление порфиразина в клетках SKOV-3 в условиях монослойной культуры и трехмерного сфероида методом конфокальной микроскопии.

Установлено, что в течение 4 ч порфиразин интенсивно накапливается в клетках SKOV-3 в монослое

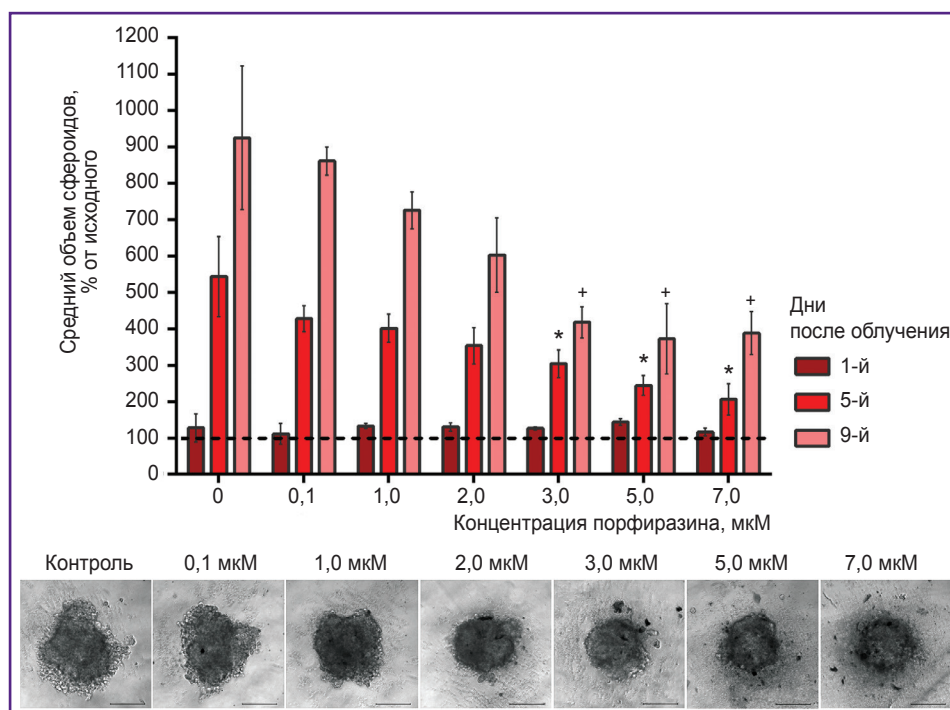


Рис. 3. Относительный объем сфероидов SKOV-3 в зависимости от концентрации порфиразина в среде на 1, 5 и 9-й дни после облучения светом 615–635 нм в дозе 20 Дж/см²

Показаны средние значения ± стандартная ошибка среднего (*сверху*) и морфология сфероидов при различных концентрациях порфиразина на 9-й день после воздействия, бар — 200 мкм (*внизу*); *, + — статистически значимое различие с контролем (0 мкМ) на 5-й и 9-й дни соответственно ($p < 0,05$, критерий Даннета, $n = 4-6$); пунктирная линия — исходный объем сфероидов (в день облучения)

(рис. 4) и окрашивает мембранные структуры, предположительно аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум.

Для сфероидов свойственно медленное проникновение порфиразина вглубь (рис. 5). В течение первых нескольких часов зарегистрировано флуоресцентное окрашивание только поверхностных слоев клеток. По истечении суток инкубации в присутствии 1,0 мкМ порфиразина глубина его проникновения достигает ~50 мкм при диаметре сфероида 400–450 мкм. Увеличение концентрации порфиразина до 10,0 мкМ обеспечило более интенсивное окрашивание всех слоев сфероида, однако и в этом случае основная часть флуоресцентного сигнала фотосенсибилизатора зарегистрирована на глубинах до 100 мкм.

Подавляющее большинство используемых в настоящее время фотосенсибилизаторов представляет собой молекулы размером 1–2 кДа. Наличие большого количества межклеточных и клеточно-матричных контактов в трехмерной структуре опухоли является барьером для диффузии соединений со средней и высокой молекулярной массой, глубина проникновения которых в опухолевую ткань редко превышает 100–150 мкм [33, 34]. Такие глубины проникновения зарегистрированы на 3D-моделях опухолевого роста *in vitro* для фотосенсибилизаторов разной природы [32, 35]. По нашим данным, накопление порфиразина

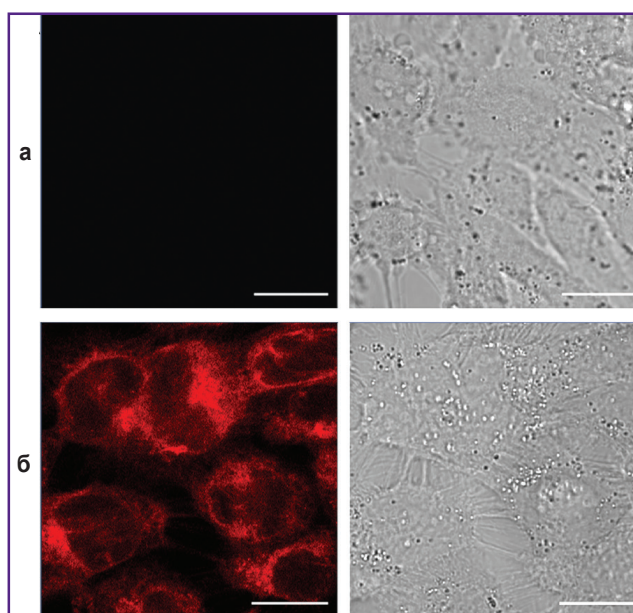


Рис. 4. Накопление порфиразина в клетках SKOV-3 в монослое:

а — конфокальная микроскопия клеток в контроле (в отсутствие порфиразина); б — через 4 ч инкубации в присутствии 1,0 мкМ порфиразина; представлены изображения в канале регистрации флуоресценции порфиразина (*слева*) и в проходящем свете (*справа*); бар — 20 мкм

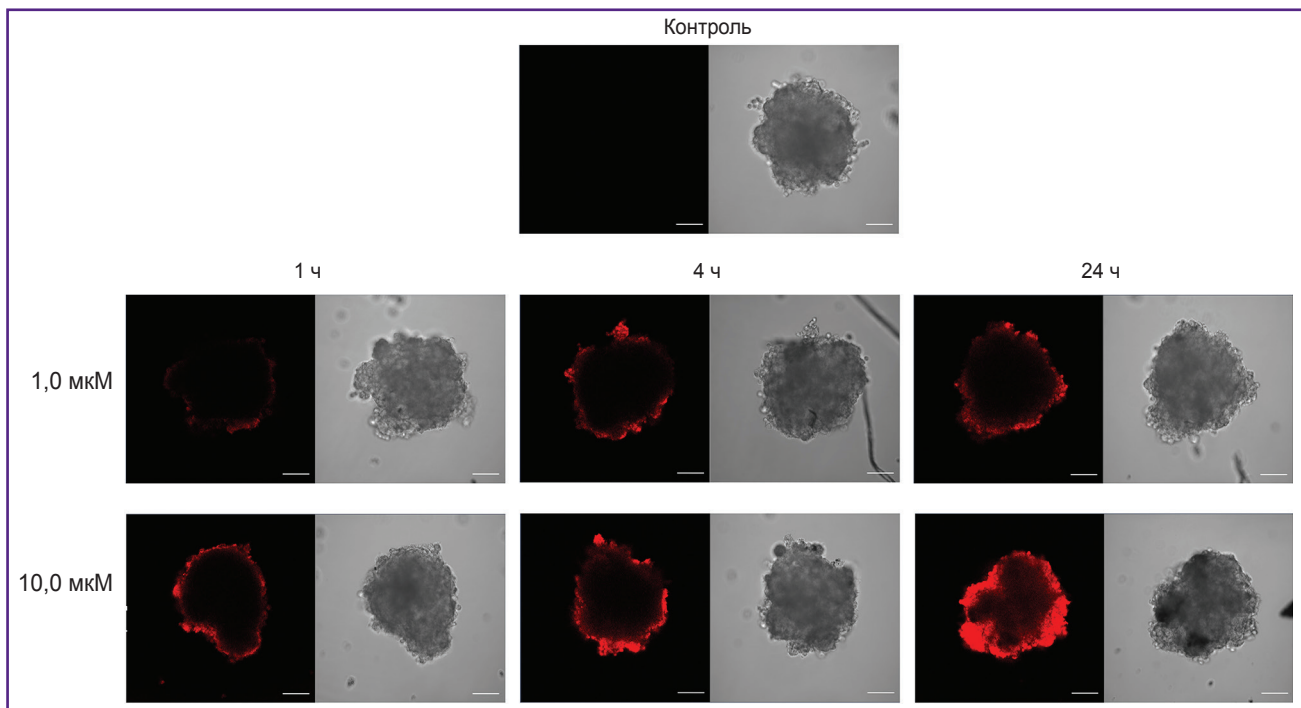


Рис. 5. Накопление порфиразина в сфероиде SKOV-3:

конфокальная микроскопия сфероидов в контроле (в отсутствие порфиразина) и через 1, 4 или 24 ч инкубации в присутствии 1,0 или 10,0 мкМ порфиразина; представлены изображения в канале регистрации флуоресценции порфиразина (слева) и в проходящем свете (справа); бар — 100 мкм

преимущественно в поверхностных клеточных слоях обуславливает значительные различия в интенсивности фотодинамического воздействия на поверхностные и глубокие слои сфероида. В отношении клеток, расположенных близко к поверхности, фотоиндуцированная токсичность порфиразина сравнима с таковой для монослойной культуры, что обуславливает сравнимые значения IC_{50} . Для глубоких слоев с низким накоплением фотосенсибилизатора характерна низкая чувствительность к облучению. Клетки этих слоев сохраняют жизнеспособность и обеспечивают продолжающийся рост сфероида даже при интенсивных воздействиях.

Ограничение глубины проникновения фотосенсибилизаторов из питающих опухоль сосудов в опухолевую ткань *in vivo* является причиной их неомогенного распределения и в конечном итоге существенно снижает эффективность терапии. Необходимо учитывать при этом, что в случае внутривенного введения фотосенсибилизаторы образуют комплексы с белками плазмы крови, преимущественно с альбумином и липопротеинами, и в таком виде транспортируются по кровотоку [36]. Экстравазация фотосенсибилизаторов, диффузия в межклеточном матриксе и взаимодействие с клетками также в значительной степени обусловлены их комплексами с белками, что еще более усложняет ситуацию. Один из предлагаемых в настоящее время подходов к решению описанной проблемы связан с

разработкой носителей, обеспечивающих увеличение проникающей способности фотодинамических агентов. В качестве таких носителей предложены липосомы, органические и гибридные наночастицы, продуцируемые клетками мембранные везикулы [27, 32, 35, 37]. Показанные в экспериментальных исследованиях преимущества при использовании таких носителей могут в перспективе стать основой разработки методов и подходов для повышения эффективности ФДТ.

Заключение

Проведенный анализ ответа клеток аденокарциномы яичника на фотодинамическое воздействие в эксперименте с использованием фотосенсибилизатора из группы тетра(арил)тетрацианопорфиразинов показал существенную роль условий их культивирования. В случае опухолевых сфероидов трехмерная структура обеспечивает сохранение жизнеспособности части популяции опухолевых клеток, что отражается в продолжающемся росте сфероидов даже при интенсивных воздействиях. Одним из важнейших факторов повышения устойчивости таких клеток является ограниченное проникновение фотосенсибилизатора в глубину сфероида, не превышающее 100–150 мкм. Тот факт, что наблюдающееся *in vitro* распределение фотосенсибилизаторов соответствует особенностям их накопления в опухолях *in vivo*, позволяет рассмат-

ривать сфероиды как наиболее релевантную модель по сравнению с монослоем для проведения исследований. Использование опухолевых сфероидов, а также других 3D-моделей опухолевого роста *in vitro* не только позволит более точно оценить эффективность потенциальных лекарственных агентов в ходе предварительного исследования, но и обеспечит инструмент для поиска методов повышения эффективности фотодинамической терапии.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (задание 6.3099.2017/ПЧ) в части синтеза фотосенсибилизатора и Российского научного фонда (проект №17-74-10227) в части получения опухолевых сфероидов и проведения исследования с их использованием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Triesscheijn M., Baas P., Schellens J.H.M., Stewart F.A. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* 2006; 11(9): 1034–1044, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-9-1034>.
- Hamblin M.R., Mroz P. History of PDT: the first hundred years. In: Hamblin M.R., Mroz P. (editors). *Advances in photodynamic therapy: basic, translational and clinical*. Norwood, MA: Artech House; 2008; p. 1–12.
- Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* 2009; 96(1): 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>.
- Krasnovsky A.A. Luminescence and photochemical studies of singlet oxygen photonics. *J Photochem Photobiol A Chem* 2008; 196(2): 210–218, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.12.015>.
- Brilkina A.A., Peskova N.N., Dudenkova V.V., Gorokhova A.A., Sokolova E.A., Balalaeva I.V. Monitoring of hydrogen peroxide production under photodynamic treatment using protein sensor HyPer. *J Photochem Photobiol B* 2018; 178: 296–301, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.020>.
- Choi Y., Chang J.E., Jheon S., Han S.J., Kim J.K. Enhanced production of reactive oxygen species in HeLa cells under concurrent low-dose carboplatin and Photofrin® photodynamic therapy. *Oncol Rep* 2018; 40(1): 339–345, <https://doi.org/10.3892/or.2018.6415>.
- Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J* 2016; 473(4): 347–364, <https://doi.org/10.1042/bj20150942>.
- Garland M.J., Cassidy C.M., Woolfson D., Donnelly R.F. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. *Future Med Chem* 2009; 1(4): 667–691, <https://doi.org/10.4155/fmc.09.55>.
- Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R.K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 2011; 40(1): 340–362, <https://doi.org/10.1002/chin.201117269>.
- Ormond A.B., Freeman H.S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* 2013; 6(3): 817–840, <https://doi.org/10.3390/ma6030817>.
- Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future. *Chem Rec* 2017; 17(8): 775–802, <https://doi.org/10.1002/tcr.201600121>.
- Brilkina A.A., Dubasova L.V., Sergeeva E.A., Pospelov A.J., Shilyagina N.Y., Shakhova N.M., Balalaeva I.V. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: a comparative *in vitro* analysis. *J Photochem Photobiol B* 2019; 191: 128–134, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.020>.
- Shilyagina N.Y., Peskova N.N., Lermontova S.A., Brilkina A.A., Vodeneev V.A., Yakimansky A.V., Klapshina L.G., Balalaeva I.V. Effective delivery of porphyrazine photosensitizers to cancer cells by polymer brush nanocontainers. *J Biophotonics* 2017; 10(9): 1189–1197, <https://doi.org/10.1002/jbio.201600212>.
- Лермонтова С.А., Григорьев И.С., Ладиллина Е.Ю., Балалаева И.В., Шильягина Н.Ю., Клапшина Л.Г. Порфиразиновые структуры с акцепторными заместителями, как основа материалов для фотоники и биомедицины. *Координационная химия* 2018; 44(2): 151–166. Lermontova S.A., Grigor'ev I.S., Ladilina E.Yu., Balalaeva I.V., Shilyagina N.Yu., Klapshina L.G. Porphyrazine structures with acceptor substituents as the basis of materials for photonics and biomedicine. *Koordinatsionnaya khimiya* 2018; 44(2): 151–166, <https://doi.org/10.7868/s0132344x1802007x>.
- Haidekker M.A., Theodorakis E.A. Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors. *J Biol Eng* 2010; 4(1): 11, <https://doi.org/10.1186/1754-1611-4-11>.
- Izquierdo M.A., Vyšniauskas A., 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. *J Mater Chem B* 2015; 3(6): 1089–1096, <https://doi.org/10.1039/c4tb01678e>.
- Thoma C.R., Zimmermann M., Agarkova I., Kelm J.M., Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 69–70: 29–41, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.03.001>.
- Unger E., Porter T., Lindner J., Grayburn P. Cardiovascular drug delivery with ultrasound and microbubbles. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 72: 110–126, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.01.012>.
- Sokolova E.A., Vodeneev V.A., Deyev S.M., Balalaeva I.V. 3D *in vitro* models of tumors expressing EGFR family receptors: a potent tool for studying receptor biology and targeted drug development. *Drug Discov Today* 2019; 24(1): 99–111, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.003>.
- Mohammad-Hadi L., MacRobert A.J., Loizidou M., Yaghini E. Photodynamic therapy in 3D cancer models and the utilisation of nanodelivery systems. *Nanoscale* 2018; 10(4): 1570–1581, <https://doi.org/10.1039/c7nr07739d>.
- Manoto S.L., Hourel N., Hodgkinson N., Abrahamse H. Modes of cell death induced by photodynamic therapy using zinc phthalocyanine in lung cancer cells grown as a monolayer and three-dimensional multicellular spheroids. *Molecules* 2017; 22(5): 791, <https://doi.org/10.3390/molecules22050791>.
- Khot M.I., Perry S.L., Maisey T., Armstrong G., Andrew H., Hughes T.A., Kapur N., Jayne D.G. Inhibiting ABCG2 could potentially enhance the efficacy of hypericin-mediated photodynamic therapy in spheroidal cell models of

- colorectal cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018; 23: 221–229, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.027>.
23. Balalaeva I.V., Sokolova E.A., Puzhikhina A.D., Brilkina A.A., Deyev S.M. Spheroids of HER2-positive breast adenocarcinoma for studying anticancer immunotoxins in vitro. *Acta Naturae* 2017; 9(1): 38–43, <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-1-38-43>.
24. Lermontova S.A., Grigor'ev I.S., Ladilina E.Y., Klapshina L.G., Peskova N.N., Balalaeva I.V., Boyarskii V.P. New promising porphyrazine-based agents for optical theranostics of cancer. *Russ J Gen Chem* 2017; 87(3): 479–484, <https://doi.org/10.1134/s1070363217030173>.
25. 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; 6(2): 15–24.
26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
27. Yudinsev A.V., Shilyagina N.Yu., Dyakova D.V., Lermontova S.A., Klapshina L.G., Guryev E.L., Balalaeva I.V., Vodeneev V.A. Liposomal form of tetra(aryl) tetracyanoporphyrazine: physical properties and photodynamic activity in vitro. *J Fluoresc* 2018; 28(2): 513–522, <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2212-9>.
28. Huang B.W., Gao J.Q. Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research. *J Control Release* 2018; 270: 246–259, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.005>.
29. Zhang D.Y., Zheng Y., Zhang H., He L., Tan C.P., Sun J.H., Zhang W., Peng X., Zhan Q., Ji L.N., Mao Z.W. Ruthenium complex-modified carbon nanodots for lysosome-targeted one- and two-photon imaging and photodynamic therapy. *Nanoscale* 2017; 9(47): 18966–18976, <https://doi.org/10.1039/c7nr05349e>.
30. Kumari P., Rompicharla S.V.K., Bhatt H., Ghosh B., Biswas S. Development of chlorin e6-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine (Lond)* 2019; 14(7): 819–834, <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0255>.
31. Rizvi I., Celli J.P., Evans C.L., Abu-Yousif A.O., Muzikansky A., Pogue B.W., Finkelstein D., Hasan T. Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. *Cancer Res* 2010; 70(22): 9319–9328, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-1783>.
32. Millard M., Yakavets I., Piffoux M., Brun A., Gazeau F., Guigner J.M., Jasniewski J., Lassalle H.P., Wilhelm C., Bezdetsnaya L. mTHPC-loaded extracellular vesicles outperform liposomal and free mTHPC formulations by an increased stability, drug delivery efficiency and cytotoxic effect in tridimensional model of tumors. *Drug Deliv* 2018; 25(1): 1790–1801, <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1513609>.
33. Choi I.K., Strauss R., Richter M., Yun C.O., Lieber A. Strategies to increase drug penetration in solid tumors. *Front Oncol* 2013; 3: 193, <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00193>.
34. Namazi H., Kulish V.V., Wong A., Nazeri S. Mathematical based calculation of drug penetration depth in solid tumors. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 8437247, <https://doi.org/10.1155/2016/8437247>.
35. Yakavets I., Lassalle H.P., Scheglmann D., Wiehe A., Zorin V., Bezdetsnaya L. Temoporfin-in-cyclodextrin-in-liposome — a new approach for anticancer drug delivery: the optimization of composition. *Nanomaterials (Basel)* 2018; 8(10): 847, <https://doi.org/10.3390/nano8100847>.
36. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three — photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2005; 2(2): 91–106, [https://doi.org/10.1016/s1572-1000\(05\)00060-8](https://doi.org/10.1016/s1572-1000(05)00060-8).
37. Lee J., Kim J., Jeong M., Lee H., Goh U., Kim H., Kim B., Park J.H. Liposome-based engineering of cells to package hydrophobic compounds in membrane vesicles for tumor penetration. *Nano Lett* 2015; 15(5): 2938–2944, <https://doi.org/10.1021/nl5047494>.