

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КЛЕТКАХ *PARAMECIUM CAUDATUM* И *АМОЕБА PROTEUS*

© 2022 г. Л. В. Чистякова<sup>1</sup>, Д. Р. Файзуллина<sup>2</sup>, С. В. Шмаков<sup>3</sup>, Н. Н. Петрищев<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алфёрова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: lasmed@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 01.09.2022 г.

Исследованы особенности распределения различных фотосенсибилизаторов (ФС) (радахлорина, бенгальского розового и копропорфирина) в клетках инфузорий *Paramecium caudatum* и лобозных амёб *Amoeba proteus*. Характер аккумуляции ФС оценивали по результатам как прижизненных наблюдений, так и на фиксированном материале, с использованием методов флуоресцентной и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии. Показано, что исследованные одноклеточные эукариотные организмы имеют сходное с млекопитающими внутриклеточное распределение ФС и могут быть использованы в качестве модельных объектов на первых этапах доклинических исследований веществ — потенциальных ФС. Предложены некоторые методические рекомендации по выявлению клеточных компартментов, в которых происходит избирательное накопление ФС.

**Ключевые слова:** протисты, фотосенсибилизатор, инфузории, амёбы, фотодинамическая терапия, флуоресцентная микроскопия, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия

**DOI:** 10.31857/S004445292206002X

Одноклеточные эукариоты — перспективный модельный объект исследований в различных научных направлениях; наиболее широко протисты используются при изучении характера воздействия разнообразных веществ и соединений на живые организмы. В литературе имеются сведения об использовании подвижных простейших, в том числе инфузорий, как чувствительных объектов для изучения светового воздействия, оценки сравнительной токсичности препаратов и определения распределения и накопления препаратов в клетках [1–3]. Особенности строения одноклеточных позволяют оценивать результат экспериментальных воздействий как на клеточном, так и на организменном уровне. Возможность лабораторного культивирования позволяет получать большие количества генетически однородного материала и максимально стандартизировать условия проведения эксперимента. Оптимальным представляется использование в качестве модельных объектов нескольких видов протистов, относящихся к разным крупным таксонам ранга типа, например, инфузорий (*Alveolata*, *Ciliophora*) и лобозных

амёб (*Amoebozoa*, *Tubulinea*). Подобный подход позволяет изучать механизмы воздействия тестируемых веществ на клетки с разным типом организации и детально охарактеризовать процессы, протекающие в различных компартментах. Сравнительный анализ результатов подобных экспериментов позволяет более достоверно аппроксимировать полученные данные на многоклеточные организмы, а также сократить объем исследований на млекопитающих.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой вариант фототерапии, получивший широкое распространение в различных областях медицины, обеспечивающий достижение высоких результатов при лечении патологических процессов, протекающих в доступных для облучения зонах. Фотодинамическое воздействие подразумевает комбинацию препарата, локализованного в клетках-мишенях — фотосенсибилизатора (ФС), и света определенной длины волны, который поглощается ФС, в присутствии молекулярного кислорода [4]. Взаимодействие препарат-свет приводит к развитию химических и биохимических процессов,

Таблица 1. Краткая характеристика ФС, использованных в работе

ФС	Действующее вещество	φΔ	$\epsilon_{\lambda}$ , М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	φf	λ, нм	Растворимость
Радахлорин	натриевые соли хлорина еб (80–90%), пурпурина 5 (5–20%) и хлорина рб (0–15%)	0.64 (водный раствор)	$\epsilon_{660} = 5 \cdot 10^4$	0.04	662	амфи-фильный
Копропорфирин	тетракалиевая соль копропорфирина III	0.37 фосфатный буфер (0.17 в присутствии альбумина)	$\epsilon_{400} = 4 \cdot 10^5$	0.03	635	гидрофильный
Бенгальский розовый	4,5,6,7-тетрахлоро-2',4',5',7'-тетрайодофлуоресцеин	0.75 (водный раствор)	$\epsilon_{532} = 5 \cdot 10^4$	0.05	532	гидрофильный

Примечание: <sup>1</sup> – длины волн, использованные в работе;  $\epsilon_{\lambda}$  – молярный коэффициент экстинкции, φf – квантовый выход флуоресценции, φΔ – квантовый выход синглетного кислорода. Физико-химические характеристики приведены по данным литературных источников [11–16].

которые вызывают повреждение активными формами кислорода (АФК) на клеточном уровне. Среди АФК наибольшее значение имеют: синглетный кислород (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) и супероксидный анион-радикал, который обычно превращается в более реакционноспособные пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и гидроксильный радикал (HO·). На сегодняшний день определены несколько потенциальных мишеней <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в клетке – белки, нуклеиновые кислоты, липиды мембран. Белки обладают более высокой реакционной способностью в отношении <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, по сравнению с нуклеиновыми кислотами или ненасыщенными липидами, и именно взаимодействие с белками АФК является ключевым в развитии фотодинамического эффекта [5]. Радиус действия <sup>1</sup>O<sub>2</sub> составляет около 1–1.5 мкм внутри H<sub>2</sub>O-инкубированной клетки [6]. Таким образом, фотодинамический эффект определяется в первую очередь характеристиками ФС (одной из которых является квантовый выход генерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (φΔ)), а также особенностями локализации препарата внутри клетки. В связи с этим важнейшие направления исследований в области ФДТ связаны, с одной стороны, с поиском и тестированием новых веществ – потенциальных ФС, а с другой – с разработкой методов, облегчающих импорт ФС через плазматическую мембрану и избирательное связывание с молекулами-мишенями [7, 8].

В настоящей работе с использованием методов флуоресцентной, а также конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (КСЛМ) исследованы особенности распределения различных ФС (радахлорина (РДХ), бенгальского розового (БР) и копропорфирина (КПФ)) в клетках инфузорий *Paramecium caudatum* (Ciliophora, Oligohymenophorea) и лобозных амёб *Amoeba proteus* (Tubulinea, Eumetazoa). Проведен сравнительный анализ характера аккумуляции ФС у исследованных одноклеточных эукариот и различных культур клеток млекопитающих, с целью определения целесообразности использования *P. caudatum* и *A. proteus* в

качестве модельных объектов на первых этапах доклинических исследований веществ – потенциальных ФС.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инфузории *Paramecium caudatum* (клон 39–9) были получены из Коллекции культур ресурсного центра “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ. Инфузорий культивировали по стандартной методике [9]. Амёбы *Amoeba proteus* (изолят Pskov) были получены из Коллекции штаммов свободноживущих амёб ИНЦ РАН. Культуру амёб поддерживали на среде Прескотта с рисовыми зёрнами и инокулированной в среду смесью инфузорий *Colpidium* sp. и жгутиконосцев *Chilomonas* sp., в культуральной среде также присутствовали одноклеточные зеленые водоросли [10].

В качестве ФС использовали препараты различного химического строения: радахлорин® (ООО “РАДА-Фарма”, Россия), копропорфирин® (ООО “НПФ “ЭЛЕСТ”, Россия), бенгальский розовый (“Acros organics”, США) (табл. 1).

Все эксперименты проводили в 24 луночных культуральных планшетах (Corning, США). Для флуоресцентной микроскопии (ФМ) использовали микроскоп Leica DM2500, оснащенный флуоресцентным модулем с фильтр-кубами В\G\R и N2.1 и камерой Leica DFM 495 (Leica-Microsystems, Wetzlar, Германия). КСЛМ проводили на приборе Axio Observer Z1 с конфокальным модулем Yokogawa CSU-X1 (Carl Zeiss, Германия), с использованием иммерсионного объектива при увеличении 40/60/100×, с ПО Leica Application Suite (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия) и AxioVision SE64 Software (Carl Zeiss, Германия) соответственно. Регистрацию флуоресценции проводили при ФМ и КСЛМ следующих параметрах: БР – 515–60/580 и 488.545/580–690 нм; РДХ – 450–90/510 и 488/640–680 нм; КПФ 450–90/510 и 405.630/660–680 нм соответственно.

В первой серии экспериментов для выявления в клетках митохондрий использовали MitoTracker™ Red CMXRos (M7512, ThermoFisher Scientific Inc., США) в концентрации 250 нМ при окраске инфузорий и 500 нМ при окраске амёб. Клетки инкубировали в растворе митотрекера в течение получаса в темноте, затем отмывали водой 5–7 мин, помещали на предметное стекло и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа. Для выявления лизосом и пищеварительных вакуолей у инфузорий использовали лизотрекер CytoPainter (ab112136, Abcam, США), компоненты набора смешивали в соответствии с протоколом и добавляли в культуру инфузорий в соотношении 1:1. Для выявления лизосом и пищеварительных вакуолей у амёб использовали LysoTracker™ Green DND-26 (L7526, ThermoFisher Scientific Inc., США) в концентрации 100 нМ. Клетки инкубировали в растворе лизотрекера в течение 30 мин в темноте, затем отмывали водой 5–7 мин, помещали на предметное стекло и исследовали при помощи микроскопии.

Во второй серии экспериментов, направленных на оценку внутриклеточного распределения ФС, перед обработкой клеток инфузорий растворами ФС их помещали в стерильную среду на основе листьев салата на 1 ч при комнатной температуре (21–22°C), для уменьшения количества пищевых вакуолей, маскирующих другие органеллы. Затем переносили клетки в лунки планшета – 30 клеток в серии эксперимента, по 5 клеток в лунке планшета объемом 15 мкл. К клеткам добавляли 10 мкл готового водного раствора ФС (см. табл. 2), затем инкубировали в полной темноте в течение 30 мин. После этого клетки трижды последовательно отмывали фосфатным буферным солевым раствором (НПЦ “Эко-Сервис”, Россия) в течение 15 мин. Отмытые клетки помещали на предметные стекла, которые имели адгезивное покрытие Polysine (“Thermo Scientific Inc.”, США), и исследовали с помощью микроскопии. При необходимости инфузории фиксировали в течение 10 мин при помощи 4% параформальдегида (“Sigma-Aldrich”, США) непосредственно на предметном стекле. Далее выполняли однократное (в связи с высоким риском разрушения клеток) отмывание в фосфатно-солевом буфере в течение 5 мин. После удаления фосфатно-солевого буфера препарат заключали в глицерин и накрывали предметным стеклом. Ядра окрашивали DAPI (1351303, Bio-Rad, США) в концентрации 2 мкг/мл непосредственно перед приготовлением препарата. Препарат помещали в холодильник (+4°C) на 20–30 мин.

В третьей серии экспериментов контролировали фотодинамический эффект с использованием культуры *P. caudatum* после определения нецитотоксичных концентраций растворов ФС. Для этого после подсчета клеток, инфузорий отделяли от питательной среды центрифугированием (15 мин при

**Таблица 2.** Нецитотоксичные молярные концентрации растворов, использованные в работе

Действующее вещество	Молекулярная масса вещества, г/моль	Молярная концентрация раствора, моль/л
хлорин е <sup>6</sup> *	596.7	$6.3 \times 10^{-6}$
бенгальский розовый	1049.8	$6.3 \times 10^{-6}$
тетракалиевая соль копропорфирина III**	654.7	$6.3 \times 10^{-5}$

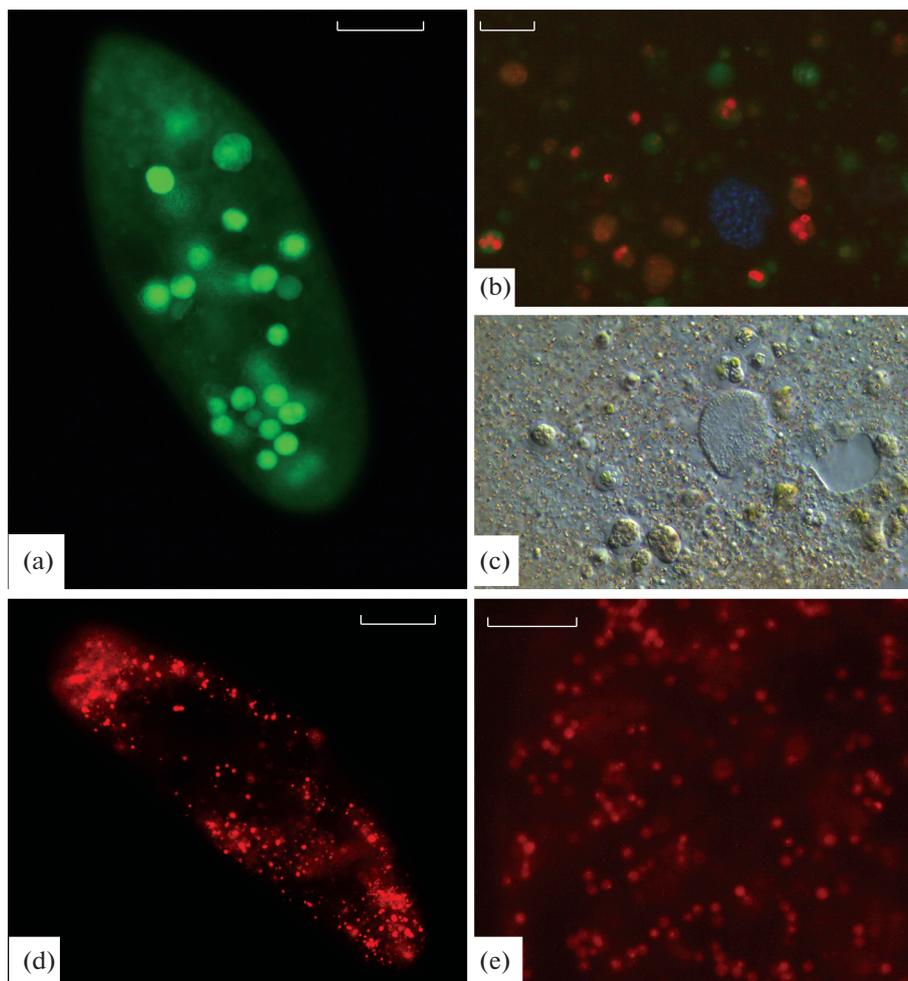
Примечание: \* – радахлорин – препарат хлоринового ряда, имеет следующий состав: хлорин е<sup>6</sup> (80–90%), пурпурин 5 (5–20%), пурпурин 18 – хлорин р<sup>6</sup> (0–15%); \*\* – копропорфин – препарат, состоящий из водорастворимой тетракалиевой соли копропорфирина III (89.25%), не более чем на 1% – из белковых и пептидных соединений и приблизительно на 10% – из примесей других порфиринов, продуцентом которых является культура *Arthrobacter globiformis*.

5000 об/мин), ресуспендировали в 2 мл готовых растворов ФС и переносили в стеклянные чашки Петри диаметром 6 см. Инкубировали в течение 30 мин, далее чашки облучали диодными лазерными аппаратами с длинами волн соответствующими ФС. Параметры облучения: диаметр облучаемой поверхности 70.0 мм; расстояние от торца волокна до поверхности питательной среды – 100.0 мм; плотность мощности 52 мВт/см<sup>2</sup> ( $\lambda = 662, 635$  нм); плотность мощности 106 мВт/см<sup>2</sup> ( $\lambda = 532$  нм). Плотность энергии увеличивали постепенно с шагом в 1 Дж/см<sup>2</sup>, летальную дозу простейших контролировали, измеряя динамику движения объектов при помощи ПО “МультиМедиа Каталог” (MMCSOft, Россия).

Методами ФМ и КСЛМ анализировали не менее 20 клеток в каждой постановке опытов. Было выполнено не менее 10 повторов для каждой экспериментальной группы. Отмечали высокую воспроизводимость результатов в соответствии с описанной методикой. Стандартизации исследований способствовали: соблюдение и контроль условий культивирования, соблюдение методики проведения исследования, особенно в части работы с препаратами, контроль параметров облучения, подбор фильтров и длин волн для оценки флуоресценции методами микроскопии в соответствии с исследуемыми ФС.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью лизотрекера в клетках инфузорий *P. caudatum* обнаруживаются округлые равномерно флуоресцирующие тельца диаметром 7–10 мкм (рис. 1а). В клетках амёб *A. proteus* выявляются многочисленные округлые вакуоли диаметром 5–12 мкм, равномерно флуоресцирующие зеленым цветом, флуоресцирующие зеленым цветом по периферии и красным в центре, или же окрашенные

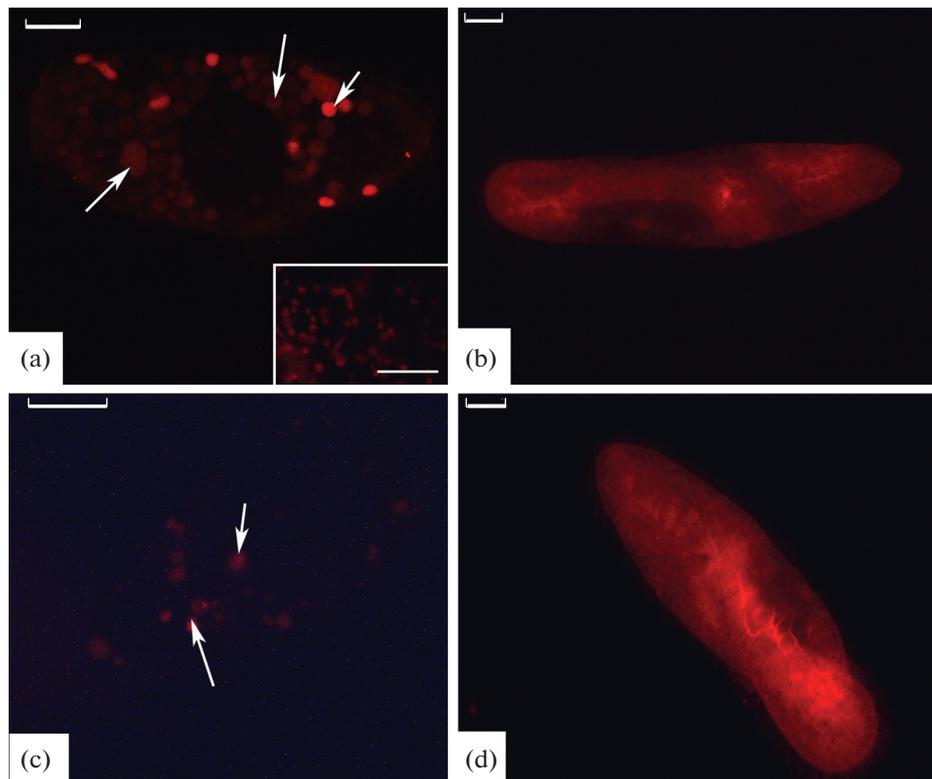


**Рис. 1.** Флуоресцентная микроскопия протистов *in vivo*, с лизотрекерами: *P. caudatum* (a), *A. proteus* (b), тот же участок клетки амебы методом ДИК (c); с митотрекером: *P. caudatum* (d), *A. proteus* (e). Масштабные линейки a, d – 30 мкм, b, c, e – 20 мкм.

в бурые тона (рис. 1b). Сопоставление результатов флуоресцентной и дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (ДИК) позволяет предположить, что вакуоли содержат одноклеточные зеленые водоросли на разных стадиях переваривания, красная и бурая окраска обусловлены автофлуоресценцией хлорофилла (рис. 1b,c). При окраске митотрекером в цитоплазме инфузорий и амеб обнаруживаются многочисленные округлые тельца диаметром 1–1.5 мкм (рис. 1d,e).

Особенности накопления ФС в клетках *P. caudatum* и *A. proteus* оценивали, основываясь на сопоставлении данных, полученных в экспериментах, и результатов окрашивания инфузорий и амеб митототрекерами. Характер аккумуляции ФС в клетках инфузорий исследовали как на прижизненных, так и на фиксированных препаратах, с использованием как ФМ, так и КСЛМ. На рис. 2 показаны результаты ФМ, демонстрирующие накопление БР и КПФ в клетках *P. caudatum*. Суще-

ственным отличием между рис. 2a, 2c и рис. 2b, 2d является то, что первые фото – живые клетки, а вторые – фиксированные. У живых инфузорий, обработанных БР, флуоресценция визуализируется преимущественно в пищевых вакуолях, отмечается отсутствие препарата в ядерном аппарате (макро- и микронуклеус) – отрицательная генотоксичность (рис. 2a). Кроме того, на препаратах видны многочисленные флуоресцирующие тельца диаметром 1–1.5 мкм, сходные с теми, которые выявлялись у инфузорий с помощью митотрекера (рис. 2a (вклейка)). Флуоресценция фиксированной клетки более интенсивная, отмечается более равномерное распределение БР в клетке, визуализируются мембрана и реснички (рис. 2b). КПФ при ФМ живых клеток удавалось визуализировать только в эндосомах, не зафиксировано его накопление в цитоплазме в концентрации с отсутствием цитотоксичности (рис. 2c). У фиксированных кле-



**Рис. 2.** Сравнение флуоресцентной микроскопии живых и фиксированных клеток *P. caudatum* после инкубации с бенгальским розовым и копропорфирином (30 мин): живая клетка с БР (а); фиксированная клетка с БР (b); живая клетка с КПФ (с); фиксированная клетка с КПФ (d). Стрелки – пищевые вакуоли. Масштабные линейки: а, с – 20 мкм (вклейка 10 мкм); b, d – 20 мкм.

ток наблюдалась довольно равномерная флуоресценция по всему объему клетки (рис. 2d).

При ФМ инфузорий, инкубированных с РДХ, отмечается интенсивная флуоресценция, которая не позволяет визуализировать внутриклеточное распределение препарата.

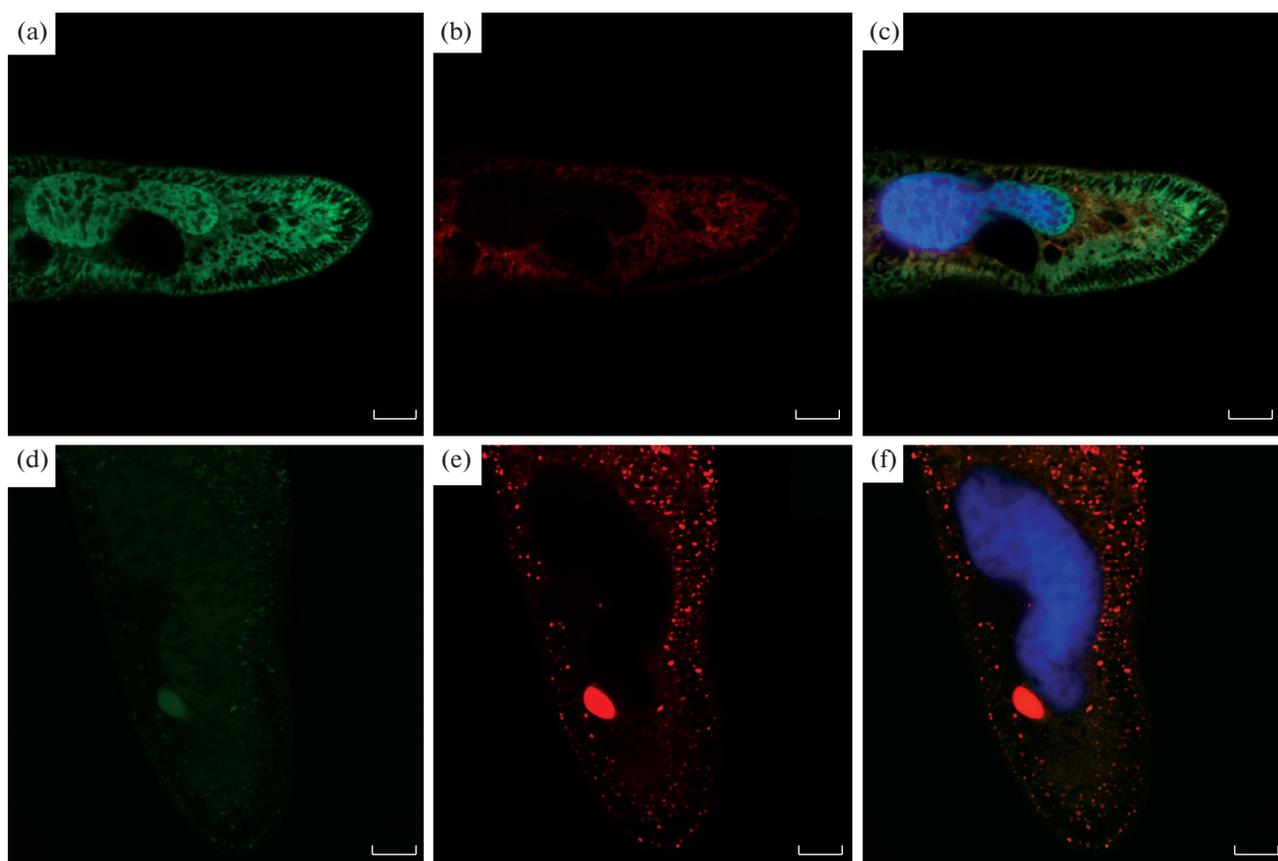
С использованием КЛСМ в фиксированных клетках инфузорий БР определяется в цитоплазме, трихоцистах (рис. 3а–с). Очевидно, происходит накопление БР в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), однако на фоне интенсивной окраски этого компартмента дифференцировать другие органеллы, аккумулирующие препарат, не удается. Окрасивание в области расположения макронуклеуса также можно объяснить концентрацией препарата в ЭПР, а также общим избыточным накоплением БР в фиксированных клетках, поскольку на прижизненных препаратах флуоресценции в области ядра не наблюдалось. РДХ накапливается на наружной мембране, кортексе, визуализируются реснички, что объясняет интенсивное свечение клеток при исследовании с помощью флуоресцентного микроскопа. С помощью КСЛМ удается продемонстрировать, что в клетке РДХ аккумулируется преимущественно в митохондриях, а также, по-видимому, в пищеварительных вакуолях (рис. 3d–е).

Несмотря на разницу во внутриклеточном распределении БР и РДХ, лазерное облучение соответствующими длинами волн с плотностью энергии 10 Дж/см<sup>2</sup> приводило к 100% гибели клеток инфузорий. КПФ требовал более высокой плотности энергии для достижения эффекта – 15 Дж/см<sup>2</sup>.

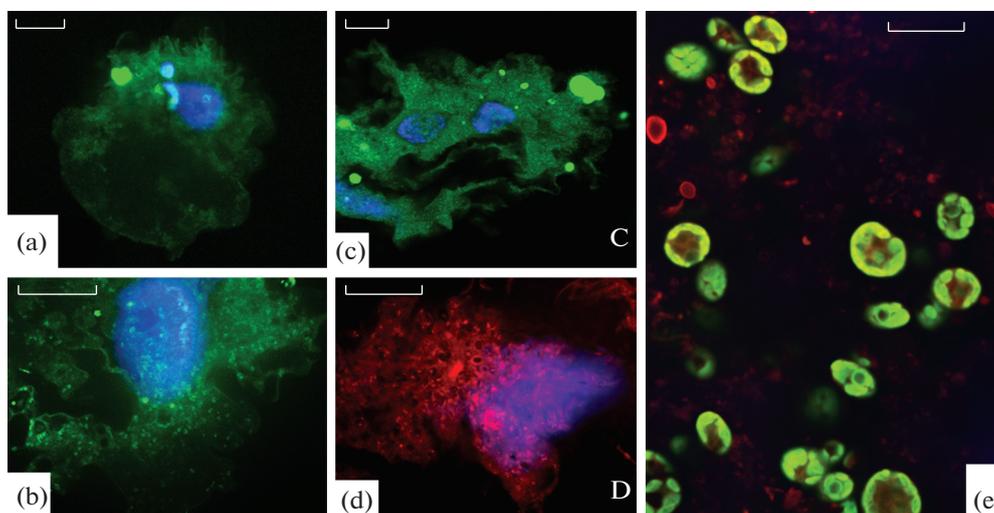
Исследование особенностей аккумуляции ФС у амёб методом КСЛМ показало, что БР и РДХ накапливаются преимущественно в митохондриях и пищеварительных вакуолях (рис. 4а–d). КПФ является исключительно в пищеварительных вакуолях; свечение в красной области спектра, по всей видимости, обусловлено автофлуоресценцией хлорофилла фагоцитированных одноклеточных водорослей (рис. 4е).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Химико-физические свойства препаратов, такие как растворимость (гидрофильность, гидрофобность, амфифильность), заряд, определяют взаимодействия с мембранами и органеллами, а следовательно, и особенности внутриклеточного распределения ФС [4, 17]. Присутствие ФС внутри клеток в функционально-активных органеллах яв-



**Рис. 3.** КСЛМ исследование накопления водных растворов ФС в клетках *P. caudatum* после инкубации в течение 30 мин. а – БР (488 нм); б – БР (660 нм); в – БР совмещенное изображение +ДАПИ; д – РДХ (488 нм); е – РДХ (660 нм); ф – РДХ совмещенное изображение +ДАПИ. Масштабные линейки 10 мкм.



**Рис. 4.** Оценка накопления ФС различного химического строения в *A. proteus*: бенгальский розовый (а, б); радахлорин (с, д), копропорфирин (е). Масштаб фото: а – д 20 мкм, е – 10 мкм.

ляется критичным для развития как некроза, так и апоптоза после ФДТ, при этом отмечено, что наилучшие результаты наблюдаются при использовании ФС, локализующихся в митохондриях [4].

Согласно полученным нами данным, все три исследованных ФС – КПФ, БР и РДХ в клетках инфузорий и амёб выявляются в пищеварительных вакуолях. Сравнительный анализ результатов ФМ

и КЛСМ позволяет заключить, что у обоих исследованных видов одноклеточных РДХ и БР также аккумулируются в митохондриях. БР, по крайней мере у парамеций, выявляется в ЭПР. Следует отметить, что после инкубации инфузорий с КПФ фотодинамический эффект наблюдался при использовании лазерного излучения с большей плотностью энергии, по сравнению с клетками, проинкубированными с РДХ и БР, что согласуется с полученными нами данными об особенностях аккумуляции исследованных ФС у протистов. Сходные данные об эффективности использования различных ФС для ФДТ были получены и при изучении фотодинамического повреждения сосудов микроциркуляторного русла кожи крыс при сравнении РДХ и КПФ. Снижение кожного кровотока и структурно-морфологические изменения при одинаковой дозе облучения – 50 Дж/см<sup>2</sup>, при использовании РДХ в качестве ФС, в сравнении с КПФ были значительно более выражены [18]. В работе на сосудах брыжейки крыс также была продемонстрирована сравнительно меньшая эффективность фотодинамического эффекта КПФ в сравнении с РДХ и БР [19].

Полученные нами результаты хорошо согласуются с имеющимися литературными данными о характере накопления ФС у различных линий культур клеток млекопитающих. В экспериментах с клетками гепатомы мыши было показано, что облучение после обработки БР вызывает выделение лизосомальных ферментов, что приводит к разрушению клетки [20]. Также было отмечено, что в клетках мышечных фибробластов NIH 3T3 БР накапливается в цитоплазме, правда, авторы не конкретизировали, в каких именно клеточных компартментах [21]. Позднее было показано, что обработка БР клеток HeLa вызывает изменения ферментативной активности митохондрий и лизосом, а также нарушения в структуре митохондрий [22]. РДХ, по литературным данным, в клетках аккумулируется преимущественно в митохондриях, лизосомах и ЭПР [23, 24]. Инфузорий (*P. primaurelia*) ранее использовали в качестве модельного объекта для изучения воздействия облучения разными длинами волн на физиологический статус клетки [25]. Эксперименты по определению характера аккумуляции различных фотосенсибилизаторов в клетках протистов ранее не проводились, за исключением одной работы, посвященной изучению особенностей проникновения БР в клетки инфузорий *P. aurelia* [26]. Было показано, что этот ФС накапливается на плазматической мембране клетки, также была отмечена слабая флуоресценция цитоплазмы. Нужно, однако, отметить, что в данной работе авторы высушивали клетки на стекле без предварительной фиксации, что могло повлиять на полученный результат.

Таким образом, инфузории *Paramecium caudatum* и амёбы *Amoeba proteus* демонстрируют сходное

с млекопитающими внутриклеточное распределение ФС, что, по нашему мнению, свидетельствует о наличии общих механизмов проникновения и аккумуляции исследованных веществ в клетках организмов, далеко отстоящих друг от друга на филогенетическом древе. Мы полагаем, что изученные в настоящей работе виды одноклеточных эукариот могут быть использованы в качестве модельных объектов на первых этапах доклинических исследований веществ – потенциальных ФС. При изучении характера аккумуляции ФС в клетках мы рекомендуем, по возможности, совмещать прижизненные наблюдения с изучением фиксированных клеток с использованием КЛСМ. С помощью КЛСМ удастся более детально охарактеризовать особенности накопления ФС в клетках протистов. При использовании метода ФМ для изучения особенностей накопления и распределения ФС предпочтительно проводить наблюдения на живых клетках. Это позволяет минимизировать избыточное окрашивание цитоплазмы и, в результате, более качественно визуализировать органеллы, в которых происходит избирательное накопление препарата. Возникновение артефактов при фиксации клеток происходит вследствие неспецифического проникновения ФС в клеточные компартменты. Однако в совокупности данные методы позволяют минимизировать влияние артефактов на результат анализа полученных изображений и наиболее детально охарактеризовать распределение ФС в клетках.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Инфузории *Paramecium caudatum* (клон 39-9) были получены из Коллекции культур ресурсного центра “Культивирование микроорганизмов” Научного парка СПбГУ.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Отсутствует.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Н.Н.П. – идея работы, научное консультирование; Л.В.Ч. – планирование эксперимента, сбор и обработка данных, культивирование простейших; Д.Р.Ф. – сбор данных; С.В.Ш. – выполнение КСЛМ, обработка результатов; написание и редактирование манускрипта – все авторы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carrasco-Pujante J, Bringas C, Malaina I, Fedetz M, Martínez L, Pérez-Yarza G, Dolores Boyano M, Berdieva M, Goodkov A, López JI, Knafo S, De la Fuente IM (2021) Associative Conditioning Is a Robust Systemic Behavior in Unicellular Organisms: An Interspecies Comparison. *Front Microbiol* 12: 707086. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707086>
2. Petrishchev NN, Papayan GV, Chistyakova LV, Struy AV, Faizullina DR (2018) Effect of Photobiomodulation by Red and Infrared Laser Radiation on Motility of *Paramecium caudatum*. *J Evol Biochem Physiol* 54: 457–464. <https://doi.org/10.1134/s0022093018060054>
3. Herman P, Kiss A, Fábíán I, Kalmár J, Nagy G (2021) In situ remediation efficacy of hybrid aerogel adsorbent in model aquatic culture of *Paramecium caudatum* exposed to Hg(II). *Chemosphere* 275: 130019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130019>
4. Benov L (2015) Photodynamic therapy: current status and future directions. *Med Princ Pract* 24: 14–28. <http://dx.doi.org/10.1159%2F000362416>
5. Nonell S, Flors C (2016) Singlet oxygen: applications in biosciences and nanosciences. Royal Society of Chemistry, Cambridge, England
6. Ogilby PR (2010) Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev* 39: 3181–3209. <https://doi.org/10.1039/b926014p>
7. Sztandera K, Gorzkiewicz M, Wang X, Boye S, Appelhans D, Klajnert-Maculewicz B (2022) pH-stable polymerosome as nanocarrier for post-loaded rose bengal in photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 217: 112662. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112662>
8. Krechetov SP, Miroshkina AM, Yakovtseva MN, Mochalova EN, Babenyshev AV, Maslov IV, Loshkarev AA, Krasnyuk II (2021) Radachlorin-Containing Microparticles for Photodynamic Therapy. *Adv Pharm Bull* 11:458–468. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.053>
9. Sonneborn TM (1970) Methods in paramecium research. In *Methods of Cell Physiology*. Academic Press Inc., New York 4: 241–339.
10. Prescott DM, Carrier R (1964). Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In *Methods in cell biology* New York, London, Acad. Press. 1: 85–95.
11. Mirzaei H, Djavid GE, Hadizadeh M, Jahanshahi-Moghadam M, Hajian P (2015) The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells. *J Photochem Photobiol B Biol* 142: 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.007>
12. Vargas F, Díaz Y, Yartsev V, Marcano A, Lappa A (2004) Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media Propiedades fotofísicas del nuevo fotosensibilizador Radaclorin en diferentes medios. *Sci J from Exp Fac Sci* 12: 70–77.
13. Bagrov IV, Belousova IM, Gorelov SI, Dobrun MV, Kiselev VM, Kislyakov IM, Kris'ko AV, Kris'ko TK (2017) A comparative study of the processes of generation of singlet oxygen upon irradiation of aqueous preparations on the basis of chlorin e6 and coproporphyrin III. *Opt Spectrosc* 122: 163–167. <https://doi.org/10.1134/S0030400X17020060>
14. Murav'eva TD, Dadeko AV, Kiselev VM, Kris'ko TK, Kislyakov IM, Kris'ko AV, Starodubisev AM, Bagrov IV, Belousova IM, Ponomarev G V (2018) Comparative study of the photophysical properties of low-toxicity photosensitizers based on endogenous porphyrins. *J Opt Technol* 85: 709–721. <https://doi.org/10.1364/JOT.85.000709>
15. Redmond RW, Gamlin JN (1999) A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. *Photochem Photobiol* 70: 391–475.
16. Chang CC, Yang YT, Yang JC, Wu H Da, Tsai T (2008) Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dye Pigment* 79: 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2008.02.003>
17. Panzarini E, Inguscio V, Dini L (2011) Overview of cell death mechanisms induced by rose bengal acetate-photodynamic therapy. *Int J Photoenergy* 2011: 11. <https://doi.org/10.1155/2011/713726>
18. Файзуллина ДР, Сухорукова ЕГ, Юкина ГЮ, Петрищев НН, Корнева ЕА (2020) Изменения микроциркуляции и структурных компонентов кожи при фотодинамическом воздействии. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 19 (1): 73–81. [Faizullina DR, Sukhorukova EG, Yukina GYu, Petrishchev NN, Korneva EA. (2020) Changes in microcirculation and structural components of the skin under photodynamic effects. *Regional blood circulation and microcirculation* 19 (1): 73–81. (In Russ)]. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-1-73-81>
19. Гришачева ТГ, Белик АГ, Цыганенко ВН, Струй АВ, Михайлова ИА, Петрищев НН (2018) Фотореактивность сосудов микроциркуляторного русла. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова*. 104 (2): 174–183. [Grishacheva TG, Belik AG, Tsyganenko VN, Struy AV, Mikhailova IA, Petrishchev NN (2018) Photoreactivity of mesenteric microvessels. *Russian journal of physiology* 104 (2): 174–183.]
20. Wachter E, Dees C, Harkins J, Fisher W, Scott T (2002) Functional Imaging of Photosensitizers using Multiphoton Microscopy. In: *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences II* 4620: 143–147. <https://doi.org/10.1117/12.470688>
21. Theodossiou T, Hotherall JS, Woods EA, Okkenhaug K, Jacobson J, MacRobert AJ (2003). Firefly luciferin-activated rose bengal: in vitro photodynamic therapy by intracellular chemiluminescence in transgenic NIH 3T3 cells. *Cancer research* 63 (8): 1818–1821.
22. Panzarini E, Tenuzzo B, Palazzo F, Chionna A, Dini L (2006) Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal acetate. *J Photochem Photobiol B Biol* 83: 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.11.014>
23. Biswas R, Moon JH, Ahn JC (2014) Chlorin e6 derivative radachlorin mainly accumulates in mitochondria, lysosome and endoplasmic reticulum and shows high affinity toward tumors in nude mice in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 90: 1108–1118. <https://doi.org/10.1111/php.12273>

24. Zhikhoreva AA, Belashov AV, Belyaeva TN, Salova AV, Litvinov IK, Semenova LV, Vasyutinskii OS (2022) Comparative analysis of radachlorin accumulation, localization and photobleaching in three cell lines by means of holographic and fluorescent microscopy Photodiagnosis and photodynamic therapy 39: 102973. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102973>
25. Amaroli A, Ravera S, Parker S, Panfoli I, Benedicenti A, Benedicenti S (2015) The protozoan, *Paramecium primaurelia*, as a non-sentient model to test laser light irradiation: the effects of an 808nm infrared laser diode on cellular respiration. *Alternatives to Laboratory Animals* 43 (3): 155–162. <https://doi.org/10.1177/026119291504300305>
26. Croce AC, Wyroba E, Bottiroli G (1992) Distribution and retention of rose bengal and disulphonated aluminium phthalocyanine: a comparative study in unicellular eukaryote. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 16 (3–4): 318–330. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)80019-R](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)80019-R)

## A Comparative Analysis of the Distribution of Different Photosensitizers in *Paramecium caudatum* and *Amoeba proteus*

L. V. Chistyakova<sup>a</sup>, D. R. Faizullina<sup>b</sup>, S. V. Shmakov<sup>c</sup> and , and N. N. Petrishchev<sup>b, #</sup>

<sup>a</sup> Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup> Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science,  
St. Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: lasmed@yandex.ru

The accumulation patterns of different photosensitizers (PSs) (radachlorin, bengal rose, coproporphyrin) in ciliated infusoria *Paramecium caudatum* and amoebae *Amoeba proteus* were evaluated by the results of intravital observations and on the fixed material, using the methods of fluorescent and confocal scanning laser microscopy. It was found that the above single-celled eukaryotic organisms share similar intracellular distribution patterns of different PSs with mammalian cells and thus can be used as model objects at the initial stages of preclinical studies of various substances, potential PSs. Some methodological recommendations for the identification of intracellular compartments, where PSs selectively accumulate, are proposed.

**Key words:** protists, photosensitizer, infusoria, amoebae, photodynamic therapy, fluorescent microscopy, confocal scanning laser microscopy