

УДК 615.074

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2026.27.12.007>

ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ БЕЗОПАСНОСТИ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ ПОРФИРИНА ХЛОРИНА Е6 С РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ ЕВРОПИЕМ НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO*

О.В. Шевченко, канд. биол. наук, научный сотрудник Междисциплинарного лабораторного центра, директор Объединенного научно-технологического центра ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, ФГБУН «Институт химии» ДВО РАН, г. Владивосток; ORCID: 0000-0002-3113-3995, SPIN: 1714-4566

shevchenko.ov@tgmu.ru

К.А. Юрьева, лаборант Междисциплинарного лабораторного центра, обучающийся 5-го курса по специальности «медицинская биохимия» ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток; ORCID: 0009-0003-3167-7997, SPIN: 9437-3691

yureva.ka@tgmu.ru

И.Н. Черненко, младший научный сотрудник Междисциплинарного лабораторного центра ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, ФГБУН «Институт химии» ДВО РАН, г. Владивосток; ORCID: 0000-0001-5261-810X, SPIN: 7872-1554

chernenko.in@tgmu.ru

Е.В. Елисеева, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток

М.А. Медков, доктор хим. наук, заведующий лабораторией ФГБУН «Институт химии» ДВО РАН, г. Владивосток; ORCID: 0000-0002-9417-0312, SPIN: 8061-6645

medkov@ich.dvo.ru

М.В. Белобелецкая, канд. хим. наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт химии» ДВО РАН, г. Владивосток; ORCID: 0000-0003-3705-0848, SPIN: 4011-0467

rita@ich.dvo.ru

С.В. Лебедев, канд. мед. наук, доцент цифровой кафедры ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток; ORCID: 0000-0002-3378-4249, SPIN: 6533-4590

lebedev@tgmu.ru

Целью работы являлась оценка профиля безопасности водорастворимого комплексного соединения на основе хлорина е6 с Eu (III) и цитратом на *in vitro* моделях, включая анализ темновой токсичности, метаболической активности и особенностей клеточного накопления. Темновую цитотоксичность оценивали по доле PI-позитивных клеток методом проточной цитометрии после 24 часов инкубации без активации. Метаболическую активность после 72 часов определяли МТТ-тестом в диапазоне 0,78–100 мкг/мл. Накопление фотосенсибилизатора регистрировали флуоресцентной микроскопией с формированием совмещенных изображений каналов. Установлено, что комплексное соединение в диапазоне $\leq 12,5$ мкг/мл характеризуется более благоприятным профилем темновой токсичности по сравнению с хлорином е6 на культуре HeLa и демонстрирует

сохранение высокой метаболической активности на умеренных концентрациях при 72-часовой экспозиции. На неопухоловой культуре ФЛЭЧ-104 комплекс проявлял тенденцию к меньшей темновой токсичности на высоких концентрациях и ограниченное внутриклеточное накопление по данным микроскопии, что может соответствовать потенциально более высокому терапевтическому окну при дальнейшем изучении режимов комбинированного воздействия. Полученные результаты обосновывают диапазоны рабочих концентраций для последующих исследований эффективности и формируют основу для разработки подходов к контролю качества фармсубстанции.

Ключевые слова: хлорин е6, европий, комплекс, цитрат, фотосенсибилизатор, темновая токсичность, МТТ-тест, пропидий йодид, проточная цитометрия, клеточное накопление, *in vitro*

Фотосенсибилизаторы (ФС) на основе порфиринов рассматриваются как перспективный класс действующих веществ для противоопухолевой терапии, однако их внедрение в практику ограничивается сочетанием факторов: растворимостью, стабильностью, воспроизводимостью состава и приемлемым профилем безопасности [1–2]. Комплексообразование хлорина еб с ионами редкоземельных элементов, в частности Eu (III), потенциально позволяет модифицировать физико-химические свойства молекулы (в том числе способность к агрегации, спектральные характеристики и поведение в биосредах) [3–4]. Вместе с тем на ранних этапах разработки критически важно подтвердить биосовместимость и определить диапазон концентраций, не вызывающих выраженного цитотоксического эффекта без активации (темновая токсичность), поскольку именно эти параметры формируют основу для выбора рабочих концентраций в последующих моделях эффективности и для построения системы контроля качества фармсубстанции [5].

Целью настоящей работы являлась оценка профиля безопасности нового водорастворимого комплексного соединения на основе хлорина еб с европием и цитратом (Себ–Eu–Cit) на моделях *in vitro*, включая анализ темновой токсичности и изучение динамики накопления.

Задачи настоящего исследования:

1. Оценить темновую цитотоксичность Себ и Себ–Eu–Cit на клетках HeLa и ФЛЭЧ-104 по доле PI⁺ после 24-часовой экспозиции.

2. Определить влияние соединений на метаболическую активность клеток при 72-часовой экспозиции методом МТТ в диапазоне концентраций 0,78–100 мкг/мл.

3. Охарактеризовать особенности клеточного накопления Себ и Себ–Eu–Cit методом флуоресцентной микроскопии (регистрация в каналах Hoechst/Calcein AM и анализ совмещений).

4. Выделить диапазон концентраций, допустимых для дальнейших исследований эффективности (в т. ч. комбинированных режимов), с позиций безопасности и потенциального терапевтического окна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методика получения водорастворимого комплексного соединения Себ–Eu–Cit описана в [6].

Профиль безопасности изучали на клеточных линиях рака шейки матки (HeLa) и фибробластов

легкого человека (ФЛЭЧ-104), полученных из коллекции клеточных культур ООО «Биолот». Клетки культивировали в полной среде ДМЕМ (ООО «Биолот», Россия), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, ООО «Биолот», Россия) и смеси антибиотик-антимикотик (ООО «Биолот», Россия) при 37°C в атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂ в CO₂-инкубаторе Alphavita MCO-170HS (Alphavita, КНР).

Темновую цитотоксичность оценивали методами проточной цитофлуориметрии и МТТ-теста. Вносили 100 мкл клеточной суспензии в лунки 96-луночного планшета (JetBiofil, КНР) в концентрациях – 5×10⁵ кл/мл для HeLa и 1×10⁵ кл/мл для ФЛЭЧ-104 и инкубировали в условиях, описанных выше, 24 часа для образования клеточного монослоя. По окончании инкубации проводили замену культуральной среды на 100 мкл предварительно разведенных в полной культуральной среде исследуемых веществ в концентрациях 100; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,17; 0,78 мкг/мл и инкубировали 24 часа в CO₂-инкубаторе. По окончании инкубации растворы веществ заменяли на полную культуральную среду и инкубировали 48 часов для проведения МТТ-теста.

При оценке цитотоксичности методом проточной цитофлуориметрии через 24 часа контакта с исследуемыми веществами клеточный монослой HeLa снимали холодным раствором Версена (ООО «Биолот», Россия), для ФЛЭЧ-104 монослой отделяли теплым раствором Трипсина (ООО «Биолот», Россия). Далее клетки дважды отмывали в течение 5 минут при 2000 об/мин. После клеточный осадок разводили в 300 мкл раствора Версена и окрашивали 5 мкл PI («Люмипроб», Россия) в течение 5 минут в темноте. По окончании инкубации пробы анализировали на проточном цитофлуориметре MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Германия). Фиксацию данных проводили по каналу B2 (λ=585/40 нм). Анализ данных проточной цитофлуориметрии проводили с применением ПО Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, США), клетками с поврежденной клеточной мембраной считались клетки, положительные по каналу B2.

Для проведения МТТ-теста по окончании инкубации проводили замену культуральной среды на свежую, после вносили 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл, «ПанЭко», Россия) и инкубировали 4 часа при 37°C в атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂. Далее удаляли культуральную среду и вносили 100 мкл ДМСО (ООО «Биолот», Россия), инкубировали 15 минут при 37°C в термошейкере PST-100HL (Biosan, Латвия).

По окончании инкубации проводили измерение оптической плотности растворов формазана на планшетном ридере FlexA-200HT (Allsheng, Китай) при $\lambda=570/800$ нм. Положительным контролем выступал 20%-ный раствор ДМСО, отрицательным – культуральная среда. Все измерения проводили в трехкратном повторении.

Для оценки накопления в лунки 4-луночных слайд-флаконов вносили 300 мкл клеточной суспензии в концентрациях, указанных выше, и инкубировали 24 часа в стандартных условиях. По окончании инкубации проводили замену культуральной среды на 300 мкл растворов исследуемых веществ в концентрациях 100 и 50 мкг/мл и инкубировали в течение 2 часов. По окончании инкубации проводили смену растворов веществ на 200 мкл рабочего раствора Calcein AM/Hoechst 33342 (Elabscience, КНР) и окрашивали в течение 30 минут при 37°C. Далее краситель удаляли, промывали 1 раз в фосфатно-солевом буфере (pH-7.4, «ПанЭко», Россия) и микроскопировали с применением флуоресцентного микроскопа Axio Scope A1 (Karl Zeis, Германия) на следующих длинах волн: $\lambda=365, 470, 590$ нм. Фотофиксацию проводили при экспозиции 300 мс. Накопление фотосенсибилизатора регистрировали в красном канале при настройках возбуждения/экспозиции, одинаковых для сравниваемых условий, после чего формировали совмещенное изображение для оценки пространственной сококализации сигналов.

Данные анализировали методами описательной статистики; при сравнении групп применяли параметрические или непараметрические критерии в зависимости от распределения (уровень значимости $p<0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

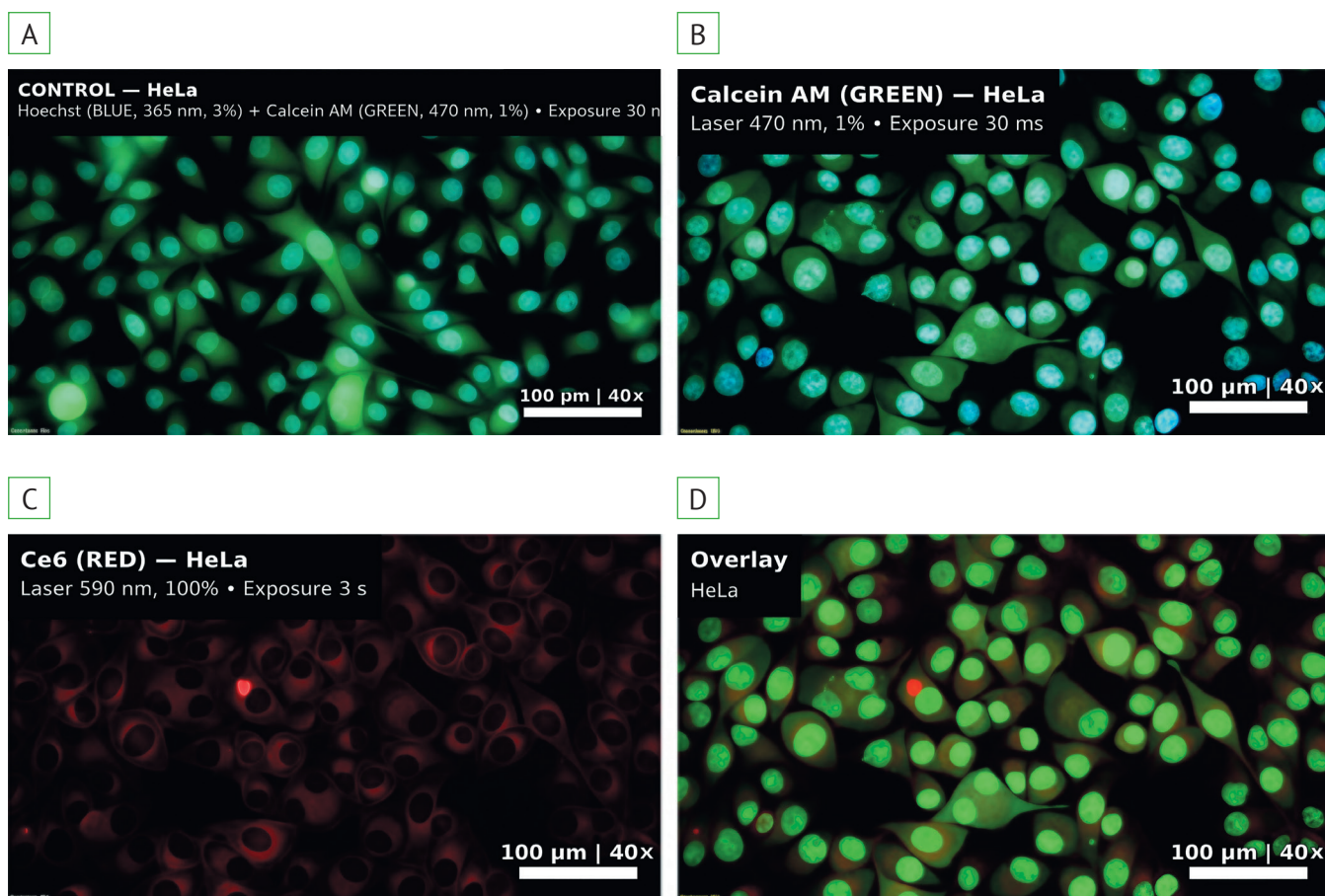
Профиль безопасности оценивали в последовательности: морфология/витальность по микроскопии; мембранная целостность (PI, 24 часа); метаболическая активность (МТТ, 72 часа). Такой дизайн позволяет разделить раннее мембранное повреждение и более поздние изменения метаболизма, что важно для установления диапазона рабочих концентраций.

Жизнеспособность и морфология клеток HeLa в процессе инкубации оценивались по флуоресценции Calcein AM как индикатора эстеразной активности живых клеток) а ядра визуализировались красителем Hoechst. В контрольных условиях клетки формируют типичный монослой с сохраненной

адгезией и вытянутой (полигональной) морфологией. Интенсивная зеленая флуоресценция Calcein AM и равномерно окрашенные ядра (Hoechst) указывают на высокую долю жизнеспособных клеток и отсутствие выраженных признаков цитотоксического воздействия в момент регистрации. При регистрации только канала Calcein AM сохраняется выраженная витальная флуоресценция у большинства клеток, что подтверждает сохранение метаболической активности и целостности мембран на момент исследования. Наблюдаемая неоднородность интенсивности зеленого сигнала отражает нормальную биологическую вариабельность (различия в активности эстераз / плотности клетки и т. п.), а также возможные локальные различия в плотности монослоя.

При инкубации клеток Hela с Себ регистрируется красная флуоресценция в клеточном слое, имеющая преимущественно цитоплазматический характер (с усилением по контурам клеток и в перинуклеарных областях) (рис. 1С). Сигнал неоднороден: видны клетки с более интенсивной флуоресценцией, что согласуется с различиями в уровне поглощения фотосенсибилизатора и возможной зависимостью от фазы клеточного цикла и метаболического статуса. В совмещении (рис. 1D) красный сигнал пространственно соответствует областям, где присутствует зеленый витальный маркер, что указывает на накопление Себ преимущественно в жизнеспособных клетках на момент визуализации. При инкубации с Себ–Eu–Cit регистрируется более выраженный красный сигнал в клеточном монослое (рис. 2С). Флуоресценция также локализуется преимущественно в цитоплазме, при этом отмечаются участки интенсивного внутриклеточного сигнала и более выраженные локальные области повышенной яркости. В совмещении (рис. 2D) красная флуоресценция визуализируется на фоне сохраненного зеленого сигнала Calcein AM (рис. 2B), что позволяет интерпретировать наблюдаемое накопление как происходящее в значительной мере в жизнеспособных клетках. Это важно с прикладной точки зрения: накопление в жизнеспособных клетках является необходимым условием для реализации радиофотодинамического эффекта при последующем воздействии излучением [7].

На препарате неопухолевых фибробластов ФЛЭЧ-104 после инкубации с Себ (рис. 3а) и контрастирования ядер Hoechst / витальности Calcein AM сигнал Себ визуализируется преимущественно внеклеточно и по периферии клеток. В красном канале отмечаются отдельные слабые участки



A – контроль (Hoechst 33342 + Calcein AM);
B – сигнал Calcein AM (оценка жизнеспособности, зеленый канал);
C – Се6 (RED, красный канал; визуализация внутриклеточного накопления фотосенсибилизатора);
D – совмещенное изображение каналов (Hoechst + Calcein AM + Се6), демонстрирующее пространственное соотношение ядер, живых клеток и распределения Се6.

Параметры съемки: возбуждение Hoechst $\lambda=365$ нм, 3%; возбуждение Calcein AM $\lambda=470$ нм, 1% (экспозиция 30 мс); возбуждение Се6 $\lambda=590$ нм, 100% (экспозиция 3 с); увеличение $\times 40$

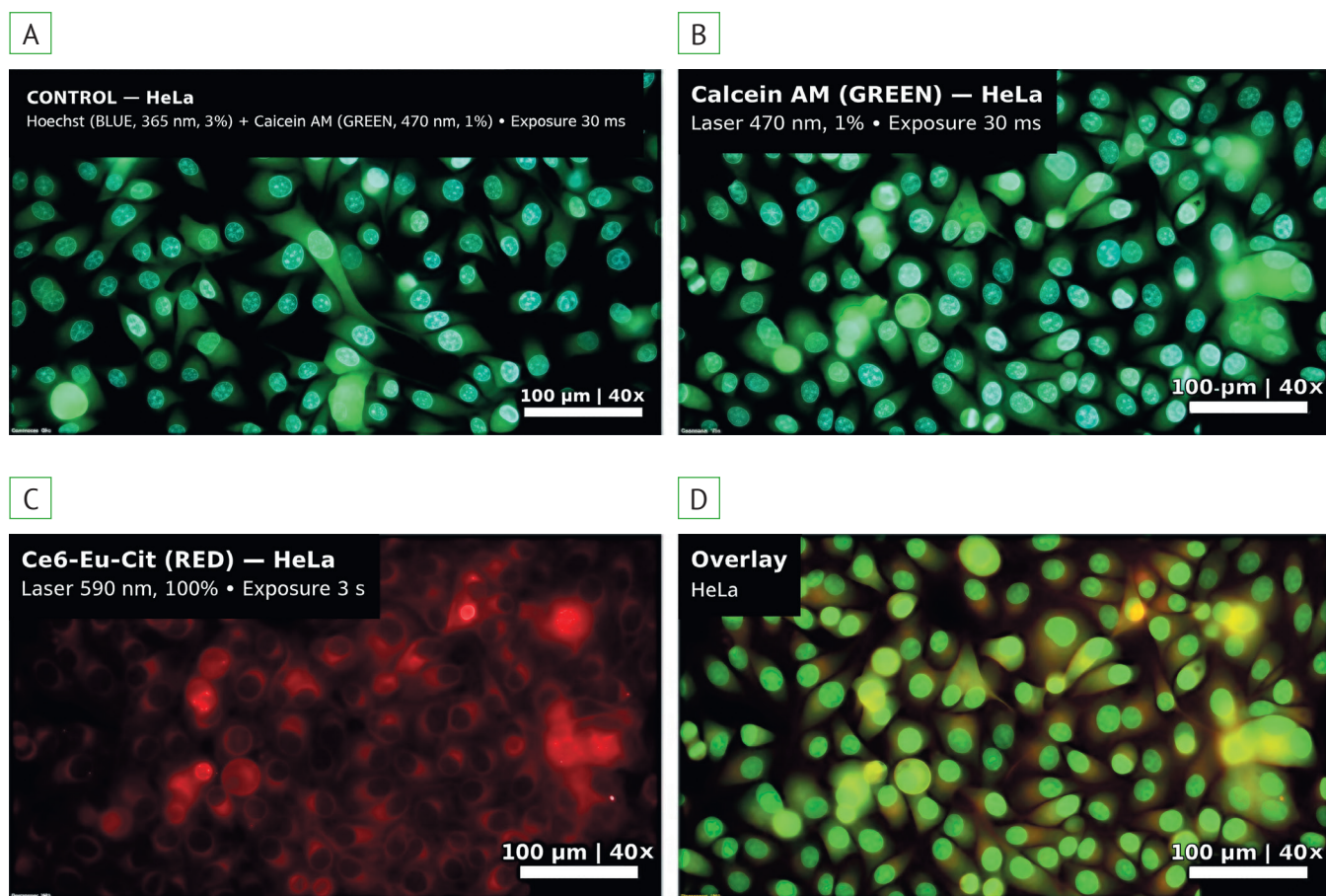
РИС. 1. Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa (человеческая линия аденокарциномы шейки матки) после окрашивания ядер Hoechst 33342 (синий канал) и витального маркера Calcein AM (Calcein acetoxymethyl ester, зеленый канал), а также регистрации флуоресценции фотосенсибилизатора Се6 (Се6, красный канал)

флуоресценции, локализованные в межклеточном пространстве и вдоль клеточных контуров, без выраженного равномерного заполнения цитоплазмы. На **рис. 3а** доминируют зеленая метка жизнеспособных клеток и четкие ядра; солокализация красного сигнала с клеточными структурами выражена ограниченно, что указывает на низкую степень внутриклеточного накопления Се6 в ФЛЭЧ-104 при данных условиях экспозиции.

На неопухолевой культуре ФЛЭЧ-104 по данным флуоресцентной микроскопии (наложение каналов) красный сигнал Се6–Eu–Cit выявлялся преимущественно вне клеточных контуров и демонстрировал слабую солокализацию с цитоплазмой, что свидетельствует об ограниченном внутриклеточном проникновении комплекса

в нормальные клетки (**рис. 3б**). Данный профиль распределения следует рассматривать как потенциально благоприятный с медико-биологических позиций, поскольку снижение накопления в неопухолевых клетках может соответствовать более высокому терапевтическому окну и меньшему риску внеопухолевой радиофототоксичности. В сочетании с более выраженным накоплением в опухолевых клетках это указывает на предпосылки селективного действия препарата [6].

С медико-биологических позиций ограниченное внутриклеточное накопление в неопухолевых фибробластах следует трактовать как потенциально благоприятный признак. Для фотосенсибилизаторов и радиофотоактивируемых систем риск нежелательных эффектов во многом определяется



A – контроль (Hoechst 33342 + Calcein AM);
B – сигнал Calcein AM (оценка жизнеспособности, зеленый канал);
C – Ce6–Eu–Cit (RED, красный канал; визуализация внутриклеточного накопления фотосенсибилизатора);
D – совмещенное изображение каналов (Hoechst + Calcein AM + Ce6–Eu–Cit), демонстрирующее пространственное соотношение ядер, живых клеток и распределения Ce6–Eu–Cit.

Параметры съемки: возбуждение Hoechst $\lambda=365$ нм, 3%; возбуждение Calcein AM $\lambda=470$ нм, 1% (экспозиция 30 мс); возбуждение Ce6 $\lambda=590$ нм, 100% (экспозиция 3 с); увеличение $\times 40$

РИС. 2. Флуоресцентная микроскопия клеток HeLa (человеческая линия аденокарциномы шейки матки) после окрашивания ядер Hoechst 33342 (синий канал) и витального маркера Calcein AM (зеленый канал), а также регистрация флуоресценции фотосенсибилизатора Ce6–Eu–Cit (красный канал)

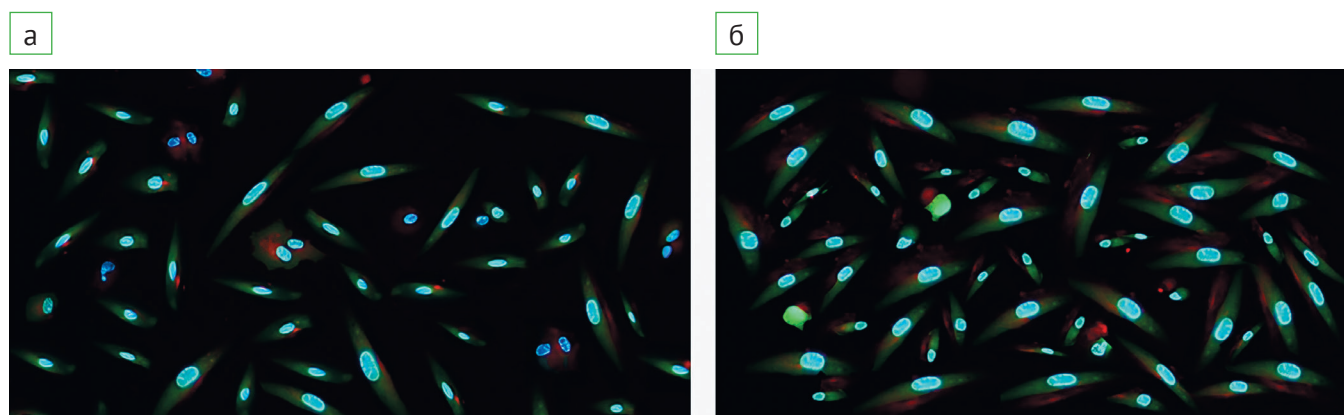


РИС. 3. Накопление фотосенсибилизаторов в неопухолевой клеточной культуре ФЛЭЧ-104 (флуоресцентная микроскопия, наложение каналов): а) Ce6; б) Ce6–Eu–Cit. Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий канал), жизнеспособные клетки визуализированы Calcein AM (зеленый канал), фотосенсибилизатор зарегистрирован в красном канале (флуоресценция Ce6/Ce6–Eu–Cit)

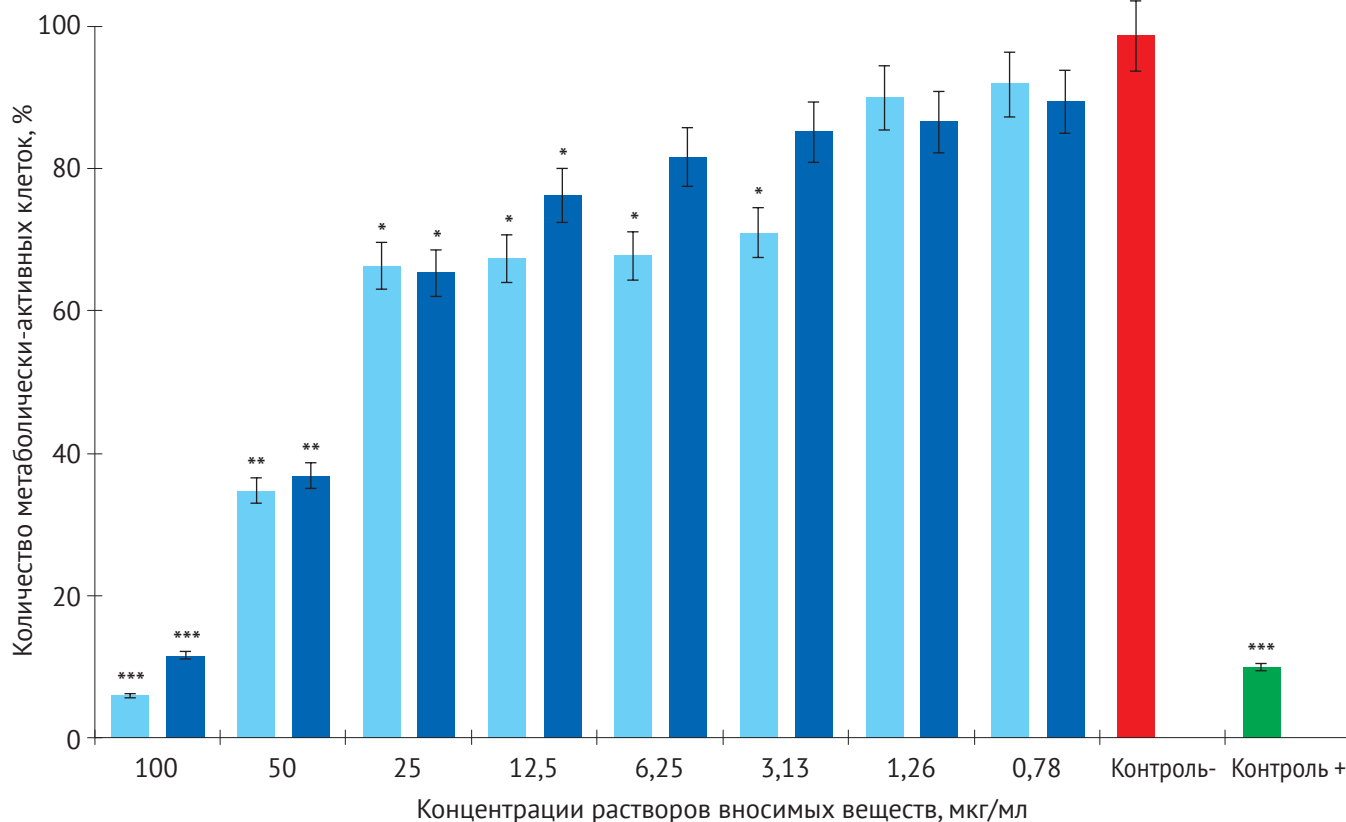
внеопухолевым распределением и степенью проникновения в нормальные клетки [6]. Преимущественно внеклеточное распределение красного сигнала в ФЛЭЧ-104 при сохранении витального зеленого канала может указывать на меньшую экспозицию внутриклеточных мишеней и потенциально меньший риск повреждения нормальных тканей при дальнейшем переходе к режимам активации.

Темновую цитотоксичность Се6 и комплекса Се6–Eu–Cit оценивали методом проточной цитометрии по доле PI-позитивных клеток (PI⁺) после 24 часов инкубации без светового воздействия. В отрицательном контроле (K⁻) доля PI⁺ клеток составила 7,57±0,39% для HeLa и 15,64±0,47% для ФЛЭЧ-104, тогда как в положительном контроле (K⁺) – 97,73±4,89% и 85,89±2,58% соответственно, что подтверждает корректность постановки анализа.

Для культуры HeLa оба соединения продемонстрировали выраженную дозозависимую темновую токсичность с ростом PI⁺ при увеличении концентрации. При высоких концентрациях наблюдалась существенная гибель клеток: Се6–Eu–Cit – 86,33±4,32% (100 мкг/мл) и 35,38±1,77% (50 мкг/мл); для Се6–93,02±4,65% (100 мкг/мл) и 26,44±1,32% (50 мкг/мл).

В диапазоне ≤12,5 мкг/мл комплекс Се6–Eu–Cit проявлял меньшую темновую токсичность, чем Се6: при 12,5 мкг/мл доля PI⁺ составила 14,37±0,72% против 22,5±1,13%, при 6,25 мкг/мл – 9,26±0,46% против 18,38±0,92%, при 3,125 мкг/мл – 4,09±0,21% против 8,63±0,43%. Минимальные значения наблюдались при 0,78 мкг/мл: 1,72±0,09% для комплекса и 5,56±0,28% для Се6.

Для ФЛЭЧ-104 исходный уровень PI⁺ (K⁻) был выше, чем в HeLa (15,64±0,47%), что указывает



■ Се6 ■ Се6–Eu–Cit

Данные представлены как среднее значение ±SD

* p<0,05

** p<0,01

*** p<0,001 по сравнению с контролем (K⁻).

K⁻ – клетки без препарата; K⁺ – положительный контроль (цитотоксическое воздействие)

РИС. 4. МТТ-тест на клетках HeLa (третьи сутки инкубации): зависимость метаболической активности клеток (% относительно контроля) от концентрации Се6 и комплекса Се6–Eu–Cit (мкг/мл)

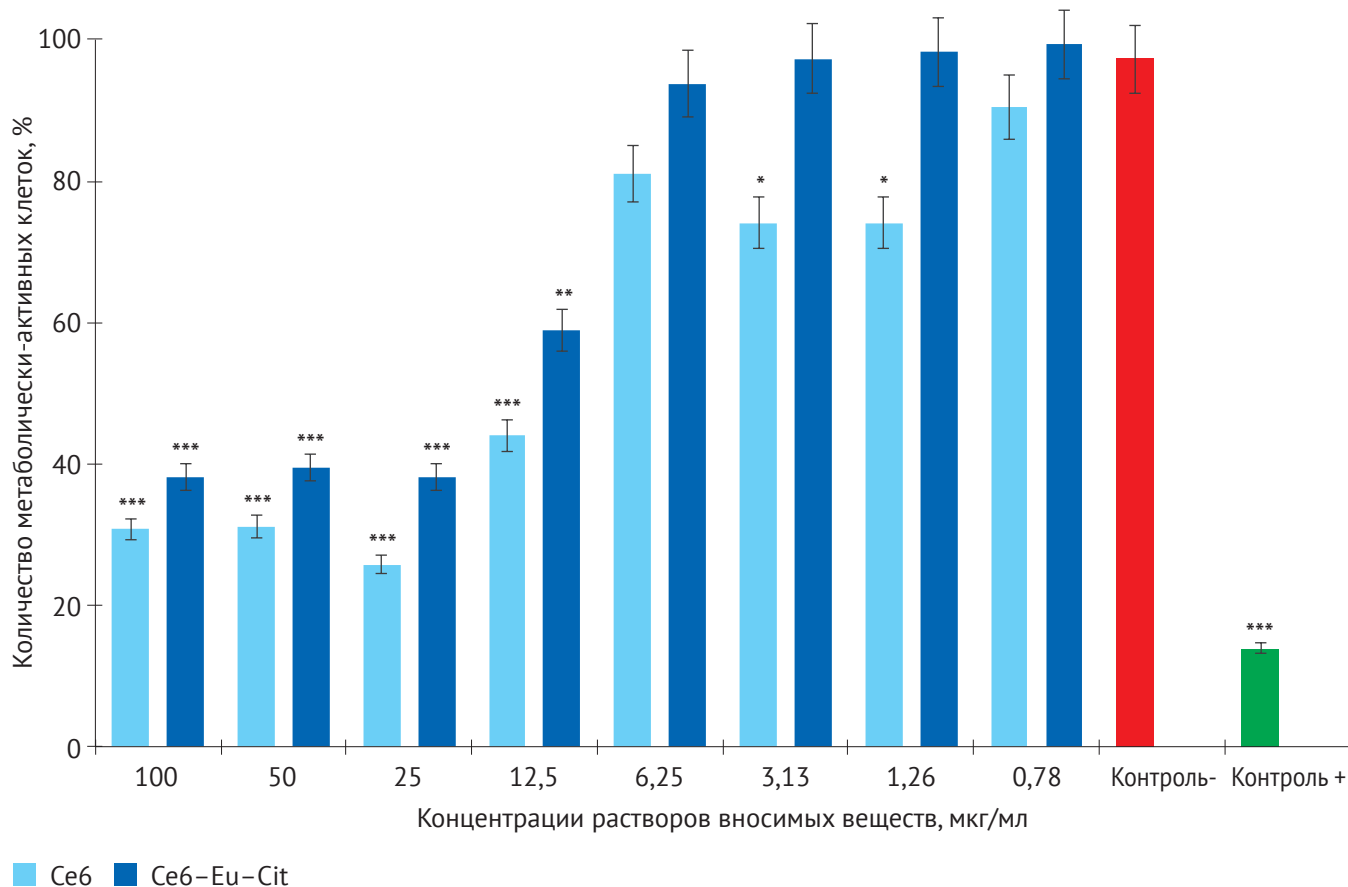
на большую базовую долю мембранно-поврежденных клеток ввиду особенности клеточной линии и процесса ее пробоподготовки. В присутствии Се6 и Се6–Eu–Cit отмечался умеренно выраженный дозозависимый эффект. На максимальной концентрации 100 мкг/мл комплекс был менее токсичен, чем Се6: $72,85 \pm 2,19\%$ против $86,93 \pm 2,61\%$. При 50 мкг/мл значения были сопоставимы: $62,78 \pm 1,88\%$ и $65,12 \pm 1,95\%$. При 25 мкг/мл: $40,94 \pm 1,23\%$ для комплекса и $40,91 \pm 1,23\%$ для Се6; при 0,78125 мкг/мл: $26,73 \pm 0,80\%$ и $24,1 \pm 0,72\%$. В целом для ФЛЭЧ-104 комплекс демонстрировал тенденцию к меньшей темновой токсичности на высокой дозе, однако на низких концентрациях различия с Се6 были минимальными.

Через 72 часа инкубации отмечено выраженное дозозависимое снижение метаболической активности клеток HeLa при повышении концентрации хлорина е6 и комплекса (рис. 4). В отри-

цательном контроле сохранялась высокая жизнеспособность (контроль: $98,64 \pm 4,93\%$), тогда как в положительном контроле метаболическая активность снижалась до $9,9 \pm 0,5\%$.

Для Се6 при 100 мкг/мл отмечено $5,89 \pm 0,29\%$ метаболически-активных клеток и $34,70 \pm 1,74\%$ при 50 мкг/мл. При более низких концентрациях количество жизнеспособных клеток было более 50%. При тех же условиях в диапазоне 12,5–3,13 мкг/мл комплекс Се6–Eu–Cit демонстрировал более высокий уровень метаболической активности клеток по сравнению с Се6, что указывает на более благоприятный профиль темновой токсичности комплекса в данном интервале.

Полученные данные на ФЛЭЧ-104 показывают, что Се6–Eu–Cit имеет более благоприятный профиль темновой токсичности в отношении неопухолевых клеток, особенно в диапазоне 6,25–1,56 мкг/мл, где жизнеспособность при комплексе



Данные представлены как среднее значение \pm SD

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$ по сравнению с контролем (К-)

К- — клетки без препарата; К+ — положительный контроль (цитотоксическое воздействие)

РИС. 5. МТТ-тест на неопухолевой культуре ФЛЭЧ-104 (третьи сутки инкубации): зависимость метаболической активности клеток (% относительно контроля) от концентрации Се6 и комплекса Се6–Eu–Cit (мкг/мл)

близка к интактной ($93,79 \pm 4,68$ и $99,32 \pm 4,97\%$ соответственно), тогда как для Се6 в тех же условиях сохраняется выраженное снижение метаболической активности ($74,03 \pm 3,70$ и $81,07 \pm 4,05\%$) (рис. 5). Это можно трактовать как потенциальный выигрыш по безопасности – потенциальное терапевтическое окно при переходе к режимам комбинированного воздействия, где важно минимизировать повреждение нормальных клеток.

Таким образом, на основании PI-теста (24 часа) и МТТ-теста (72 часа) диапазон концентраций $\leq 12,5$ мкг/мл может рассматриваться как условно допустимый для дальнейших исследований эффективности без активации, поскольку в этом интервале для HeLa комплекс демонстрирует более низкую темновую токсичность по PI и более высокую/сопоставимую метаболическую активность по МТТ по сравнению с Се6. Концентрации 50–100 мкг/мл сопровождаются выраженной темновой цитотоксичностью и требуют осторожной интерпретации как нерелевантные для режимов без активации.

ВЫВОДЫ

Се6–Eu–Cit демонстрирует более благоприятный профиль темновой токсичности на клетках HeLa в диапазоне $\leq 12,5$ мкг/мл по сравнению с Се6 (по доле PI⁺ после 24 часов и по сохранению метаболической активности после 72 часов).

На неопухолевых фибробластах ФЛЭЧ-104 комплекс характеризуется тенденцией к меньшей токсичности на высоких концентрациях и ограниченным внутриклеточным накоплением по данным микроскопии.

Ограниченное проникновение/накопление в неопухолевых клетках может рассматриваться как потенциально благоприятный фактор терапевтического окна для последующих исследований режимов активации.

Полученные результаты позволяют обосновать рабочий диапазон концентраций для дальнейших исследований эффективности и могут быть использованы при формировании подходов к контролю качества (воспроизводимость, стабильность, биосовместимость) фармсубстанции Се6–Eu–Cit.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Tian Z. et al. Enhanced photodynamic therapy by improved light energy capture efficiency of porphyrin photosensitizers // *Current Treatment Options in Oncology*. – 2023. – Vol. 24. – № 9. – P. 1274–1292.
2. Rajak P. et al. Porphyrin-Based Nanoparticles and Their Potential Scopes for Targeted Drug Delivery and Cancer Therapy // *Porphyrin-Based Composites: Materials and Applications*. – 2025. – P. 273–298.
3. Hafez R.S., Ismail A.M., El-Khiyami S.S. Multifunctional PVA-based materials doped with rare-earth chlorides (Eu³⁺, Yb³⁺): Comprehensive thermal, optical, electrical and antibacterial analysis // *Journal of Thermoplastic Composite Materials*. – 2025. – См. 08927057251408477.
4. Higgins R.F. et al. Coordination chemistry-driven approaches to rare-earth element separations // *Accounts of Chemical Research*. – 2022. – Vol. 55. – №18. – P. 2616–2627.
5. Шевченко О.В. и др. Обзор современных разработок в области X-лучевой фотодинамической терапии // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2025. – №1. – С. 5–9.
6. Шевченко О.В. и др. Водорастворимый препарат на основе хлорина Е6 с цитратом европия как потенциальный фотосенсибилизатор нового поколения // *Вестник «Биомедицина и социология»*. – 2024. – №4. – С. 64–72.
7. Jiao Y., Cao F., Liu H. Radiation-induced cell death and its mechanisms // *Health Physics*. – 2022. – Vol. 123. – №5. – P. 376–386.

EVALUATION OF THE SAFETY PROFILE OF A NOVEL COMPLEX COMPOUND OF PORPHYRIN CHLORINE E6 WITH THE RARE-EARTH ELEMENT EUROPIUM ON IN VITRO MODELS

O.V. Shevchenko¹, K.A. Yurieva¹, I.N. Chernenko¹, E.V. Eliseeva¹, M.A. Medkov², M.V. Belobeletskaya², S.V. Lebedev¹

¹ Pacific State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Vladivostok, Russia

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

The aim of this study was to evaluate the safety profile of a water-soluble coordination compound based on Chlorin e6 with Eu (III) and citrate using in vitro models, including assessment of dark toxicity, metabolic activity, and cellular uptake characteristics. Dark cytotoxicity was determined as the proportion of PI-positive cells by flow cytometry after 24 h incubation without activation. Metabolic activity after 72 h was measured by the MTT assay over a concentration range of 0.78–100 µg/mL. Photosensitizer uptake was assessed by fluorescence microscopy with merged multi-channel imaging. The coordination compound showed a more favorable dark-toxicity profile than Chlorin e6 in HeLa cells at concentrations ≤ 12.5 µg/mL and maintained high metabolic activity at moderate concentrations after 72 h exposure. In the non-tumor FLECH-104 culture, the compound tended to exhibit lower dark toxicity at high concentrations and limited intracellular accumulation by microscopy, which may indicate a potentially wider therapeutic window for further investigation of combined-treatment regimens. These findings substantiate working concentration ranges for subsequent efficacy studies and provide a basis for developing quality-control approaches for the active pharmaceutical ingredient.

Keywords: Chlorin e6, europium, complex, citrate, photosensitizer, dark cytotoxicity, MTT assay, propidium iodide, flow cytometry, intracellular accumulation, *in vitro*