

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТУПЛЕНИЯ НАТРИЙ-МЕДНОГО ХЛОРОФИЛЛИНА В ЛИМФОЦИТЫ

© 2023 г. Л.А. Ромодин*, **, #

*Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, ул. Маршала Новикова, 23, Москва, 123098, Россия

**Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Волоколамское шоссе, 11, Москва, 125080, Россия

#E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2023 г.

После доработки 24.01.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Оценена возможность попадания натрий-медного хлорофиллина внутрь лимфоцитов. Для этого фотометрическим методом определено содержание хлорофиллина в лизате лимфоцитов, предварительно инкубированных в среде, содержащей 300 мкМ медного хлорофиллина. Обнаружено большое содержание хлорофиллина, что позволяет говорить о том, что он может поступать внутрь клеток. Остается открытым вопрос о том, может ли хлорофиллин проникать через ядерную мембрану. На основе анализа собственной и представленной в литературе информации сделан вывод, что через нее хлорофиллин проходит значительно хуже, чем через плазмалемму.

Ключевые слова: лимфоциты, хлорофиллин, радиопротекторы, спектрофотометрия, трансмембранный транспорт.

DOI: 10.31857/S0006302923040051, EDN: KJSRDS

Многими исследователями препараты на основе хлорофилла изучались в качестве средства борьбы с различными патологиями [1–3], в том числе с последствиями лучевого поражения. В литературе имеются сведения и о радиозащитных свойствах препаратов на основе хлорофилла [4–10].

Обычно молекулярно-биологические эффекты действия ионизирующего облучения рассматриваются в аспекте разрушения клеточных молекул ДНК (в более общем смысле — повреждения генетического аппарата) или в аспекте перехода клетки в состояние окислительного стресса, главным образом — запуска реакций перекисного окисления липидов. При этом препараты на основе хлорофилла продемонстрировали как генопротекторные свойства [7, 8, 11], так и способность ослаблять степень окислительного стресса [4, 9].

Однако в недавно проведенном исследовании [12] по облучению рентгеновским излучением в дозе 2 Гр суспензии лимфоцитов, проведенном методом гель-электрофореза одиночных клеток, у натрий-медного хлорофиллина защитные свойства обнаружены не были. Данный метод заключается в анализе кометоподобных структур, образующихся из содержащихся в предварительно лизированных клетках молекул ДНК в геле в

электрическом поле. Степень повреждений ДНК тем выше, чем более выражен хвост ДНК-кометы [13–16]. Значения величин содержания ДНК в хвосте ДНК-кометы и момента хвоста (произведения содержания ДНК в хвосте на длину хвоста) для диапазона концентраций хлорофиллина 0–100 мкМ не дали достоверных различий.

Для интерпретации полученных в работе [12] результатов было выдвинуто предположение о том, что хлорофиллин в обсуждаемом исследовании не попал внутрь лимфоцитов, а потому не смог проявить внутри них своих антиоксидантных свойств. Поэтому возникла необходимость изучить способность хлорофиллина к проникновению в лимфоциты.

В настоящем исследовании использована модельная система, аналогичная использованной в работе [12]. Для оценки поступления хлорофиллина внутрь лимфоцитов после инкубации в нем клетки были выделены из среды инкубации, после чего — лизированы. Далее были зарегистрированы спектры оптической плотности лизатов. По данным спектрам и было оценено наличие хлорофиллина в лизате, а значит — и в цитоплазме лимфоцитов после инкубации.

Стоит отметить, что исследование по биодоступности натрий-медного хлорофиллина было

проведено авторами работы [17] более 10 лет назад. Однако они изучали возможность попадания хлорофиллина в органы крыс, которым скармливался хлорофиллин. При этом использовались огромные дозы хлорофиллина: 10–30 мг/г массы животного. Это многократно превышает концентрации хлорофиллина, использованные в работе [12]. Кроме того, авторы работы [17] оценивали содержание хлорофиллина не в клетках, а в органах, где он мог находиться, скажем, в межклеточном веществе. Не удивительно, что на фотографиях, представленных в работе [17], почки и печень крыс, получавших хлорофиллин в дозе 30 мг/г массы животного, полностью окрашены в зеленый цвет: содержание хлорофиллина в органах оказалось колоссальным.

Однако анализировать результаты работы [12] в контексте работы авторов [17] некорректно, так как экспериментальные модельные системы в них слишком различаются. Необходимо также принять во внимание возможные химические превращения хлорофиллина в желудочно-кишечном тракте животных. Поэтому мы и провели эксперимент на суспензии лимфоцитов, аналогичной использованной в работе [12], с аналогичным веществом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение лимфоцитов крови. Лимфоциты были выделены из проб крови пациентов ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА России методом центрифугирования в градиенте плотности. Гепаринизированная кровь в соотношении 1 : 1 была разведена фосфатно-солевым буфером, приготовленным путем растворения таблетки буфера (Thermo Fisher Scientific, США) в деионизированной воде. Далее в центрифужные пробирки добавляли по 2 мл раствора фиколла плотностью 1.077 г/мл («ПанЭко», Россия), после чего на него было наложено по 2.7 мл разведенной крови. Далее пробы центрифугировали при 400 g в течение 30 мин. Опалесцирующее кольцо, содержащее моноклеары, было отобрано в чистые центрифужные пробирки с добавлением 10 мл фосфатно-солевого буфера. Далее пробы были центрифугированы при 300 g в течение 15 мин, после чего осадок был ресуспендирован в добавленных 5 мл фосфатно-солевого буфера. Затем пробы снова были центрифугированы при 300 g в течение 10 мин, а полученный осадок — ресуспендирован в добавленных 5 мл фосфатно-солевого буфера. После этого пробы еще раз были центрифугированы при 300 g в течение 10 мин с последующим ресуспендированием осадка в 1 мл среды RPMI 1640 (полной). Среда была приготовлена путем добавления к 500 мл среды RPMI Medium 1640 1x (GIBCO (Life Technologies (Invitrogen)), США) 50 мл инактивированной фетальной

бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США), 146 мг L-глутамин («ПанЭко», Россия), смеси 25000 ед. пенициллина и 25 мг стрептомицина («ПанЭко», Россия).

Инкубирование лимфоцитов в хлорофиллине. Полученную суспензию лимфоцитов смешивали с 600 мкМ раствором медного хлорофиллина натрия (CZY Prosperity Store, Китай) в среде RPMI 1640 (полной) в соотношении 1 : 1. В итоге лимфоциты оказывались в 300 мкМ хлорофиллине. Контрольные пробы просто были разбавлены в два раза средой RPMI 1640 (полной). Также в данной среде были приготовлены растворы хлорофиллина (300 мкМ), в которые клетки не добавлялись. Все образцы были инкубированы в течение часа в воздушном термостате MCO-15AC фирмы Sanyo (Япония) при температуре 37°C.

Анализ поступления хлорофиллина в лимфоциты. После инкубации в хлорофиллине пробы были центрифугированы в течение 20 мин при 200 g. После этого из проб было взято по 8 мкл среды, к ним добавлено 72 мкл фосфатно-солевого буфера. Далее из проб с лимфоцитами была удалена надосадочная жидкость, а лимфоциты ресуспендированы в 72 мкл фосфатно-солевого буфера. Для оценки проникновения хлорофиллина в лимфоциты определяли содержание вещества в их цитоплазме. Для лизиса клеточных мембран и перехода содержимого цитоплазмы в раствор к суспензии лимфоцитов в пробы было добавлено по 20 мкл 5%-го раствора тритона X-100 (при приготовлении данного раствора тритон X-100 (Helicon, Россия) был в 20 раз разбавлен деионизированной водой). Далее пробы были инкубированы в течение часа при 4°C.

После инкубации все пробы были смешаны в соотношении 1 : 1 с деионизированной водой. Далее на спектрофотометре Cary 60 (Agilent Technologies, США) были зарегистрированы спектры оптической плотности в диапазоне длин волн 400–800 нм. Значения оптической плотности обнуляли по пробе, содержащей 0.5%-й раствор тритона X-100 и среду RPMI 1640 (полную), разбавленную в 25 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение результатов измерений количества хлорофиллина в лизатах лимфоцитов и в среде, в которой они инкубировались, показало, что, во-первых, хлорофиллин попадает в клетки, а во-вторых, что он там накапливается: темп проникновения хлорофиллина в клетку выше, чем из нее.

Стоит отметить, что используемая в настоящем исследовании концентрация хлорофиллина в три раза выше максимальной, использованной в исследовании [12]. Это было сделано для более

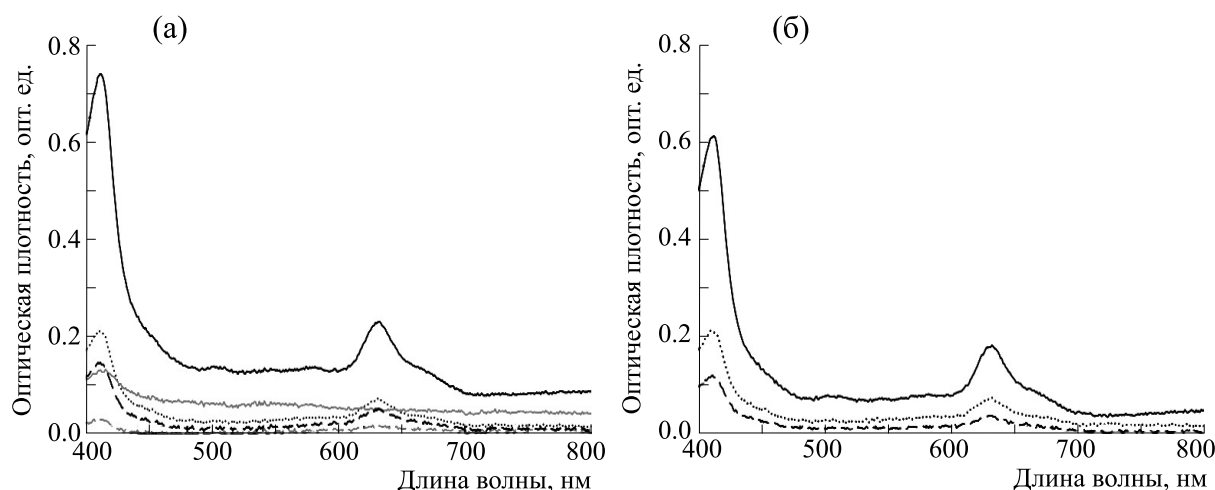


Рис. 1. Усредненные спектры оптической плотности образцов: (а) — непосредственно зарегистрированные спектры, без вычета вклада гемовых белков; (б) — спектры оптической плотности с учетом поправки на вклад гемовых групп. Сплошная черная линия — лизат лимфоцитов, инкубированных в хлорофиллине; пунктирная черная линия — среда с хлорофиллином, в которой инкубировались лимфоциты после удаления их из нее; точечная линия — раствор хлорофиллина, аналогичный тому, в котором инкубировались лимфоциты; сплошная серая линия — лизат лимфоцитов, инкубированных в среде без добавления хлорофиллина; пунктирная серая линия — среда без хлорофиллина, в которой инкубировались лимфоциты после удаления их из нее.

точного спектрофотометрического определения хлорофиллина в лизатах лимфоцитов. Однако все концентрации — и используемая в настоящей работе, и применяемые в работе [12], имеют один порядок. Поэтому концентрацию хлорофиллина, выбранную в настоящем исследовании, можно считать адекватной.

Спектры поглощения лизатов лимфоцитов, инкубированных в 300 мкМ хлорофиллине и в среде без него, среды без лимфоцитов после инкубации и среды с хлорофиллином, в которую клетки не добавлялись (контрольный раствор), представлены на рис. 1а. Изначальные растворы (среда после инкубации и контрольный раствор) в процессе подготовки пробы для измерения оптической плотности разбавлялись в 25 раз. Примерно в такое же число раз в процессе пробоподготовки была разбавлена цитоплазма лизированных лимфоцитов.

Натрий-медный хлорофиллин имеет максимумы поглощения на длинах волн 404 нм и 628 нм [18]. При интерпретации результатов представляет проблему схожесть спектров поглощения гемовых белков с таковым для хлорофиллина [19–21]. Гемовые белки, очевидно, присутствуют в составе лимфоцитов, а также могут оказаться в среде инкубации, попав в нее из плазмы крови. Наиболее выраженный максимум поглощения приходится на так называемую полосу Соре — область 402–410 нм [18, 22], соответствующую порфириновым группам, входящих в состав как хлорофиллина, так и гемовых групп.

Спектр оптической плотности пробы, таким образом, представляет собой спектр суммы оптических плотностей ее компонентов [23], главными из которых являются хлорофиллин и гемовые белки. Поэтому для того, чтобы увидеть спектры оптической плотности именно хлорофиллина, необходимо из спектров поглощения проб, содержащих хлорофиллин, вычесть спектры поглощения соответствующих проб, не содержащих его: из спектра, обозначенного на рис. 1а сплошной черной линией, был вычтен спектр, обозначенный сплошной серой линией, а из обозначенного пунктирной черной линией — обозначенный серым пунктиром. Полученные спектры оптической плотности представлены на рис. 1б.

На основании проиллюстрированной рис. 1б информации можно говорить о том, что по сравнению с контрольным, не содержащим клетки, раствором хлорофиллина, концентрация данного вещества в среде после инкубации лимфоцитов снизилась. В то же время в лизатах этих лимфоцитов содержание хлорофиллина было выше, чем в контрольном растворе.

Мы вычислили значения концентраций хлорофиллина в этих пробах, используя значение коэффициента молярной экстинкции, равное 11100 л/моль·см (приведено в работе авторов [18]). Данные результаты иллюстрирует рис. 2.

Статистический анализ результатов, представленных на рис. 2, с использованием критерия Манна–Уитни показал достоверные отличия между всеми пробами.

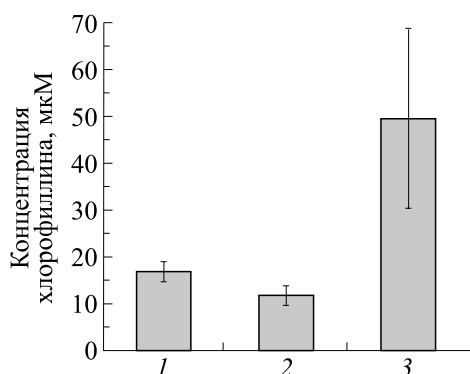


Рис. 2. Сравнение концентрации хлорофиллина в среде после инкубации лимфоцитов (2), лизате лимфоцитов (3) и в среде с добавлением хлорофиллина, аналогичной той, в которой проводили инкубацию (1). Так как объем выделенных лимфоцитов составлял примерно 8 мкл, для проб 1 и 2 отбирали по 8 мкл раствора. Далее к образцам добавляли 72 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего — 20 мкл 5%-го раствора тритона X-100 в фосфатно-солевом буфере.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Описанное выше наличие хлорофиллина в лизатах лимфоцитов свидетельствует о том, что он мог находиться в их цитоплазме, а возможно, и в ядре. Очевидно, что попасть туда он мог только из среды инкубации. Таким образом, хлорофиллин имеет способность каким-то образом проникать через клеточную мембрану в цитоплазму лимфоцитов.

Вещество может проникать в клетку из среды путем простой либо облегченной диффузии или же с помощью различных видов активного транспорта. Хлорофилл за счет остатка фитола имеет некоторое сродство с липидными мембранами, собственно, именно за счет него он закрепляется за мембрану тилакоида хлоропластов [24]. Хлорофиллин, использованный в исследовании [12], — водорастворимая молекула, а потому неспособная диффундировать через липидный бислой. В случае диффузного попадания вещества в клетку его концентрация в цитоплазме не может превышать таковую в межклеточной среде. А поскольку содержание хлорофиллина в лизате лимфоцитов достоверно выше, чем в среде, в которой они были инкубированы (рис. 2), то можно предположить, что в нее он проник путем активного транспорта. При этом темп его поступления внутрь был выше, чем обратно в межклеточную среду.

В этом случае в цитоплазматической мембране лимфоцитов должна существовать система переноса порфиринов, которая способна также осуществлять транспорт хлорофиллина.

В литературе имеют место сообщения об обнаружении трансмембранных переносчиков порфиринов. Так, около 20 лет назад в качестве

трансмембранного переносчика гема был описан белок-продукт экспрессии гена SLC46A1 [25]. Однако несколько позже было сказано, что он — переносчик фолиевой кислоты [26] (впрочем, здесь, к примеру, остается открытым вопрос, почему экспрессия этого переносчика увеличивается в условиях гипоксии [27]). При этом продолжают поступать новые сведения о способности данного белка, называемого «heme carrier protein 1», переносить через мембрану гемовые группы [28].

В целом же известно, что белки, связывающие гем, присутствуют почти во всех клеточных компартментах, однако молекулярные механизмы, регулирующие транспорт гема внутри клетки, остаются по сей день малоизученными [29]. Вопрос о том, есть ли какие-либо переносчики порфиринов и их производных в ядерной мембране, остается открытым. Поэтому вполне вероятно, что и в плазмалемме лимфоцитов имеется система для переноса металлопорфиринов из межклеточной среды в цитоплазму, и именно она способна через мембрану транспортировать хлорофиллин.

Таким образом, с учетом вышесказанного, можно утверждать, что хлорофиллин способен проникать через плазмалемму внутрь клеток. Но тогда встает вопрос, как трактовать результаты исследования [12] о невлинии хлорофиллина на степень повреждения ДНК лимфоцитов, облученных рентгеновским излучением.

Самым банальным ответом на данный вопрос будет предположение о неспособности хлорофиллина проникать в ядро клетки из ее цитоплазмы. Тогда становится понятно, почему хлорофиллин не защитил ДНК лимфоцитов от радиационно-индуцированного окислительного стресса. В обзоре [30], посвященном анализу работ о свойствах хлорофилла и его производных внутри организма, большое внимание уделяется различным химическим превращениям упомянутых веществ в процессе метаболизма. И при этом указывается, что данные свойства у хлорофилла и многочисленных его производных сильно различаются.

Если говорить о превращениях хлорофиллина в пищеварительной системе, то здесь нужно вспомнить, что в кислой среде он имеет тенденцию к образованию хлоринов — хлорина e_6 , который впоследствии может перейти в хлорин e_4 . При этом интересно, что хлорин e_6 не усваивается в кишечнике, выходя с фекалиями, а хлорин e_4 попадает в кровь [17, 30].

На рис. 3 представлены структурные формулы медного хлорофиллина и хлоринов — его производных.

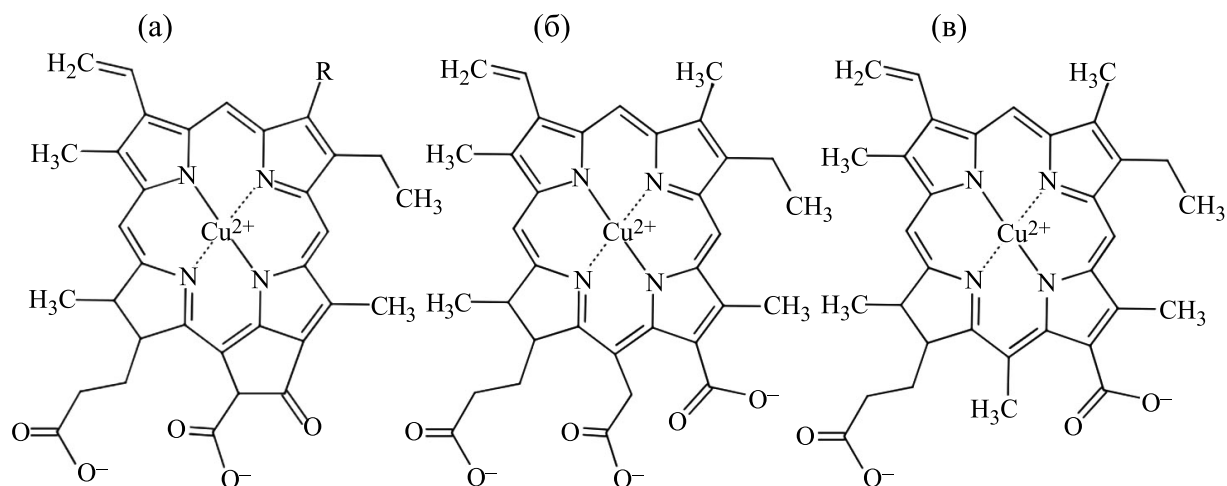


Рис. 3. (а) — Медный хлорофиллин, R — метильная группа в хлорофиллине-а, альдегидная группа в хлорофиллине-б; (б) — медный комплекс хлорина e_6 ; (в) — медный комплекс хлорина e_4 .

Не исключено, что хлорин e_4 легче проникает через мембраны за счет меньшего, по сравнению с хлорином e_6 , числа карбоксильных групп, увеличивающих отрицательный заряд молекулы.

Анализируя информацию из обзора [30], необходимо помнить, что в нем речь идет о хлорофилле и его производных, поступающих в организм через желудочно-кишечный тракт и претерпевающих в нем изменения. Главным образом, здесь речь идет о превращении хлорофиллина в кислой среде в хлорины. Однако в настоящем исследовании хлорофиллин не подвергался кислотному воздействию. Поэтому, если в составе используемого препарата не было хлорина e_4 , данные, приведенные в разделе «Результаты», относятся именно к натрий-медному хлорофиллину. К слову, в обзоре [30] имеются сведения об обнаружении хлорофиллина в сыворотке крови человека, употреблявшего его. В этом случае вещество без изменений дошло до его кишечника, где попало в энтероцит, а оттуда — в кровяное русло, таким образом, дважды проникнув через плазмалемму.

Детально рассуждать о возможных метаболических путях хлорофиллина, употребленного перорально, в настоящей статье нет необходимости, так как целью исследования было установить, проникает ли хлорофиллин в клетки из межклеточной среды. На основании информации, проиллюстрированной на рис. 1 и 2, можно утверждать, что проникает. Но при этом он вряд ли проникает в ядро клетки, поэтому в работе [12] не было обнаружено никакого его влияния на степень повреждений ДНК лимфоцитов, суспензия которых подверглась воздействию рентгеновского излучения.

Но при этом в работах [7, 8] приводятся данные о защитном действии хлорофиллина на гене-

тический аппарат облученных животных: хлорофиллин уменьшил у них число сестринских хроматидных обменов. Раскрывая полученный парадокс, необходимо обратить внимание даже не на то, что в работах [7, 8] использовалась большая, чем в работе [12], доза препарата хлорофиллина, а на то, что в исследовании [12] влияние хлорофиллина изучалось на суспензии лимфоцитов. Данные клетки в процессе исследования не делились, а потому их ядерная мембрана (которая, скорее всего, хлорофиллин не пропускает) оставалась целой.

В работах [7, 8] исследовались изъятые у облученных мышей быстроделющиеся клетки: клетки костного мозга [8] и спермогонии [7]; то есть исследуемые клетки проходили через митоз. Однако общеизвестно, что в начале митоза ядерная мембрана разрушается, а цитоплазма и кариоплазма смешиваются [31–33]. Следовательно, хлорофиллин (или хлорин e_4 , в который он превратился в организме мышей [30]), попавший в цитоплазму клетки, после митоза оказывался и внутри ее ядра, где мог уже ингибировать радиационно-индуцированный окислительный стресс.

Таким образом, сопоставляя результаты настоящего исследования и работ [7, 8, 12], можно прийти к выводу, что хлорофиллин попадает из межклеточного вещества в цитоплазму, причем скорее всего по механизму активного транспорта. Однако через ядерную мембрану в кариоплазму он либо не проходит, либо проходит очень плохо. Поэтому полноценно попасть в ядро он может лишь во время деления клеток. По этой причине хлорофиллин и хлорины в отношении тканей с быстроделющимися клетками должны обладать большим радиозащитным эффектом, чем в отношении более дифференцированных тканей с не-

делящимися или медленно делящимися клетками. Собственно, еще с начала прошлого века известно, что именно недифференцированные ткани с быстро делящимися клетками являются наиболее радиочувствительными [34]. Поэтому их защита поможет уменьшить степень проявления многих синдромов лучевой болезни.

Было бы правильным высказать еще одно возможное объяснение того, почему в лизатах лимфоцитов, инкубированных в среде с хлорофиллином, он был обнаружен. Хлорофиллин мог «налипнуть» на клетки сверху и оставаться связанным с их поверхностью при отмывании клеток от среды инкубации. Но данное явление нельзя считать высоковероятным ввиду того, что за счет отсутствия фитолового «хвоста», который имеет место в молекуле хлорофилла, у хлорофиллина он не может закориваться в липидном бислое мембраны.

ВЫВОДЫ

Настоящим исследованием было обнаружено наличие хлорофиллина в лизате лимфоцитов, инкубированных в содержащей его среде. На основании этого сделан вывод о том, что хлорофиллин способен проникать в цитоплазму клеток через плазмалемму, причем, скорее всего, по механизму активного транспорта. Однако, на основании ранее проведенных исследований и анализа литературы, был сделан вывод, что через ядерную мембрану хлорофиллин не проходит или проходит очень плохо. Поэтому эффективное генозащитное действие он может проявлять только в тканях, состоящих из быстро делящихся клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор настоящей статьи выражает благодарность и признательность А. А. Ларенкову, заведующему Лабораторией технологии и методов контроля радиофармпрепаратов, и В. Б. Бубенчикову, инженеру Циклотронной лаборатории ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна ФМБА России, за предоставленную возможность проведения измерений на спектрофотометре.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00383, <https://rscf.ru/project/23-24-00383>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор настоящей статьи заявляет, что не имеет конфликта интересов касательно материалов, представленных в работе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с использованием животных в качестве экспериментальных объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. M. Ong, W. Z. Whong, J. Stewart, and H. E. Brockman, *Mutation Res.*, **173** (2), 111 (1986). DOI: 10.1016/0165-7992(86)90086-2
2. M. Ozcan, D. Aydemir, M. Bacanli, et al., *Biol. Trace Element Res.*, **199** (12), 4475 (2021). DOI: 10.1007/s12011-021-02585-6
3. J. P. Kamat, K. K. Boloor, and T. P. Devasagayam, *Biochim. Biophys. Acta*, **1487** (2-3), 113 (2000). DOI: 10.1016/s1388-1981(00)00088-3
4. А. В. Поздеев и В. П. Гугало, *Вестн. Курской гос. с.-х. академии*, № 2, 107 (2012).
5. А. В. Поздеев и Н. П. Лысенко, *Изв. Междунар. академии аграрного образования*, **42** (2), 60 (2018).
6. А. В. Поздеев, В. К. Промоненков и Н. П. Лысенко, *Ветеринар. медицина*, № 1, 42 (2010).
7. P. Morales-Ramirez and M. T. Mendiola-Cruz, *Mutation Res.*, **344** (1-2), 73 (1995). DOI: 10.1016/0165-1218(95)90041-1
8. P. Morales-Ramirez and M. C. Garcia-Rodriguez, *Mutation Res.*, **320** (4), 329 (1994). DOI: 10.1016/0165-1218(94)90085-x
9. S. S. Kumar, B. Shankar, and K. B. Sainis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1672** (2), 100 (2004). DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.03.002
10. S. Zimmering, O. Olvera, M. E. Hernandez, et al., *Mutation Res.*, **245** (1), 47 (1990). DOI: 10.1016/0165-7992(90)90024-e
11. S. K. Abraham, L. Sarma, and P. C. Kesavan, *Mutation Res.*, **322** (3), 209 (1994). DOI: 10.1016/0165-1218(94)90008-6
12. Л. А. Ромодин и М. А. Игнатов, *Радиационная биология. Радиоэкология*, **63**, (2023). DOI:
13. A. N. Osipov, N. M. Smetanina, M. V. Pustovalova, et al., *Free Radic. Biol. Med.*, **73**, 34 (2014). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.027
14. I. B. Korzenewa, S. V. Kostuyk, L. S. Ershova, et al., *Mutation Res.*, **779**, 1 (2015). DOI: 10.1016/j.mrfmm.2015.05.004
15. P. L. Olive, J. P. Banath, and R. E. Durand, *Radiation Res.*, **122** (1), 86 (1990).
16. K. D. Walsh and T. A. Kato, *Methods Mol. Biol.*, **2519**, 65 (2023). DOI: 10.1007/978-1-0716-2433-3_7
17. B. B. Gomes, S. B. Barros, E. R. Andrade-Wartha, et al., *J. Sci. Food Agriculture*, **89**, 2003 (2009). DOI: 10.1002/jsfa.3681
18. L. F. Sciuti, L. H. Z. Cocca, A. R. L. Caires, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **706**, 652 (2018). DOI: 10.1016/j.cplett.2018.07.016
19. A. G. Favinha, D. S. Barreiro, J. N. Martins, et al., *Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectrosc.*

- ру, **241**, 118644 (2020). DOI: 10.1016/j.saa.2020.118644
20. К. Р. Григорян и А. А. Шиладжян, Биоорганич. химия, **43** (3), 257 (2017). DOI: 10.7868/S0132342317020038
 21. Г. Б. Постникова и Е. А. Шеховцова, Биохимия, **83** (2), 269 (2018). DOI: 10.1134/S0006297918020098
 22. Y. Yao, B. Zhang, H. Pang, et al., Food Chem., **398**, 133875 (2023). DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133875
 23. A. M. A. al Alamein, H. M. Elwy, and S. H. S. El-Din, Spectrochim. Acta. Part A – Mol. Biomol. Spectroscopy, **206**, 37 (2019). DOI: 10.1016/j.saa.2018.07.073
 24. М. Б. Березин и О. И. Койфман, Рос. химич. журн., **61** (4), 42 (2017).
 25. M. Shayeghi, G. O. Latunde-Dada, J. S. Oakhill, et al., Cell, **122** (5), 789 (2005). DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.025
 26. A. Qiu, M. Jansen, A. Sakaris, et al., Cell, **127** (5), 917 (2006). DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.041
 27. N. C. Andrews, Cell Metabolism, **5** (1), (2007). DOI: 10.1016/j.cmet.2006.12.004
 28. M. Sakiyama, H. Matsuo, Y. Toyoda, et al., Human Cell, **34** (4), 1082 (2021). DOI: 10.1007/s13577-021-00534-y
 29. F. Sun, Z. Zhao, M. M. Willoughby, et al., Nature, **610** (7933), 768 (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-05347-z
 30. M. Hayes and M. G. Ferruzzi, Nutrition Res., **81**, 19 (2020). DOI: 10.1016/j.nutres.2020.06.010
 31. U. Kutay and M. W. Hetzer, Curr. Opin. Cell Biol., **20** (6), 669 (2008). DOI: 10.1016/j.ceb.2008.09.010
 32. V. Archambault, J. Li, V. Emond-Fraser, and M. Larouche, Front. Cell Devel. Biol., **10**, 1012768 (2022). DOI: 10.3389/fcell.2022.1012768
 33. S. Y. van der Zanden, M. L. M. Jongsma, A. C. M. Neeffjes, et al., Trends Cell Biol., **33**, 18 (2022). DOI: 10.1016/j.tcb.2022.06.002
 34. J. Bergonie and L. Tribondeau, Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Science. **143**, 983 (1906).

Spectrophotometric Determination of Sodium-Copper Chlorophyllin Level in Lymphocytes

L.A. Romodin*, **

*State Scientific Center of the Russian Federation – A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the Federal Medical Biological Agency of Russia, ul. Marshala Novikova 23, Moscow, 123098 Russia

**Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Volokolamskoe shosse 11, Moscow, 125080 Russia

This study raises the question of whether it is possible to determine the appearance of sodium-copper chlorophyllin in lymphocytes. To answer this question, the content of chlorophyllin was determined in lymphocyte lysate previously incubated in a medium containing 300 μM of copper chlorophyllin. Significant amounts of chlorophyllin were observed in the lysate, thus, suggesting that chlorophyllin is able to enter cells. However, the question remains as to whether chlorophyllin can pass through the nuclear membrane. Based on our own data and information obtained from the scientific literature, it can be concluded that the passage of chlorophyllin through the nuclear membrane happens at a much slower rate than through the plasmalemma.

Keywords: lymphocytes, chlorophyllin, radioprotectors, spectrophotometry, transmembrane transport