

УДК 547.22.04:541.14:543.426:615.277.3.015.44

С.С. Брусов¹, А.В. Ефременко^{2,3}, В.С. Лебедева¹, Е.Ю. Щепелина¹, Ф.В. Пономарев¹,
А.В. Феофанов^{2,3}, А.Ф. Миронов¹, М.А. Грин¹

**ВЛИЯНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ЗАРЯДА
В СТРУКТУРЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ХЛОРИНОВОГО РЯДА
НА ФОТОИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ**

¹Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, Москва

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

³Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Контактная информация

Грин Михаил Александрович, д.хим.н., профессор, зам. заведующего кафедрой химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского по учебной работе

адрес: 119571 Москва, проспект Вернадского, 86; тел.: +7(916)304-71-05

e-mail: michael_grin@mail.ru

Статья поступила 13.11.2015, принята в печать 27.11.2015.

Резюме

Синтезированы нейтральный фотосенсибилизатор аминобутиламид хлорина e_6 с терминальной аминогруппой (**1**) и полученный на его основе катионный фотосенсибилизатор с терминальной триметиламмониевой группой (**2**). Изучены спектральные, фотофизические и фотобиологические характеристики соединений **1** и **2**, а также дана оценка влиянию заряда в молекуле **2** на фотоиндуцированную противоопухолевую активность в экспериментах *in vitro*. Определены относительные коэффициенты внутриклеточного накопления соединений **1** и **2** в клетках аденокарциномы легкого человека А549 и глиобластомы человека U251. Показано, что значения коэффициентов внутриклеточного накопления нейтрального хлорина **1** в обоих типах клеток в 5 раз выше, чем катионного хлорина **2**, и, как следствие, он в 15 раз превосходит последний по фотоиндуцированной цитотоксичности.

Ключевые слова: хлорины, фотосенсибилизаторы, фотоцитотоксичность, фотодинамическая активность.

S.S. Brusov¹, A.V. Efremenko^{2,3}, V.S. Lebedeva¹, E.Yu. Shchepelina¹, Ph.V. Ponomarev¹,
A.V. Feofanov^{2,3}, A.F. Mironov¹, M.A. Grin¹

**INFLUENCE OF A POSITIVE CHARGE
IN THE STRUCTURE OF PHOTOSENSITIZERS
OF CHLORIN SERIES ON THE PHOTOINDUCED ANTICANCER ACTIVITY**

¹Moscow State University of Fine Chemical Technologies named after M.V. Lomonosov

²Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

³Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

Abstract

A neutral photosensitizer, aminobutylamide chlorin e_6 with a terminal amino group (**1**), and its derivative, a cationic photosensitizer with a terminal trimethylammonium group (**2**) were synthesized. Spectral, photophysical and photobiological properties of compounds **1** and **2** were studied. An impact of a charge in molecule **2** on a photoinduced antitumor activity was evaluated *in vitro*. Relative coefficients of intracellular accumulation (K_{rel}) were determined for compounds **1** and **2** in human lung adenocarcinoma A549 and human glioblastoma U251 cells. The coefficients of intracellular accumulation of neutral chlorin **1** in both cell types are fivefold higher than those of cationic chlorin **2**. As a consequence, compound 1 surpasses fifteen-fold compound 2 in photoinduced cytotoxicity.

Key words: chlorin, photosensitizer, photocytotoxicity, photodynamic activity.

Введение

В клиниках ряда стран мира (США, Германии, Израиле, Канаде, России и др.) в течение последних 20 лет в онкологии активно применяются методы ФД и ФДТ опухолей, которые основаны на фотофизических и фотохимических эффектах, возникающих при облучении введенных

в организм ФС светом определенной длины волны [2–4]. Несомненным преимуществом ФДТ перед другими консервативными методами лечения злокачественных новообразований является локальность воздействия на опухоль – это обеспечивают следующие факторы: повышенная концентрация ФС в опухолевом очаге и направленное световое воздействие.

Клинические испытания метода ФДТ свидетельствуют о его эффективности при тяжелых дисплазиях, на ранних стадиях поверхностно расположенных опухолей различной локализации, у онкологических больных с тяжелой сопутствующей патологией. Для дальнейшего повышения результативности метода необходим поиск новых высокоэффективных ФС и изучение их фотоиндуцированной активности *in vitro* и *in vivo* [7].

В настоящее время на экспериментальных моделях опухолей активно исследуются экзогенные ФС различных классов: производные фталоцианинов, хлоринов и бактериохлоринов [9; 10]. Повышенное внимание привлекают ФС природного происхождения, которые быстро метаболизируются и легко выводятся из организма, что существенно снижает побочные эффекты ФДТ [11; 12].

Из ФС хлоринового ряда в РФ применяются препараты «Фотодитазин» и «Радахлорин», в Республике Беларусь – «Фотолон», которые являются анионными производными хлорофилла *a*. Однако в последнее время внимание ученых привлекают катионные ФС, в том числе, содержащие первичную аминогруппу, способную в кислых средах (воспаленные и опухолевые ткани) протонироваться, придавая молекуле ФС положительный заряд. Попадая в опухолевую ткань и протонируясь, катионный ФС задерживается в ней, что обеспечивает значительно большее накопление по сравнению со здоровой тканью [14]. Ранее в ряду хлорофилла *a* была исследована фотодинамическая активность хлорина e_6 (Хл e_6) и его аминоксидного производного (ЭДА-Хл e_6), содержащего в положении 13 хлоринового макроцикла остаток этилендиамина [13]. Было показано, что эффективность фототерапии с аминоксидом хлорина e_6 значительно выше по сравнению с таковой незамещенным хлорином. В биологических испытаниях на животных-опухоленосителях коэффициент селективности накопления ЭДА-Хл e_6 в опухоли составил 20, тогда как для Хл e_6 он не превышал 3, что объясняется, по-видимому, высокой аффинностью аминоксидного производного Хл e_6 к липопротеинам низкой плотности в кровотоке и направленной доставкой подобных производных в опухолевую ткань.

Кватернизация атома азота первичной аминогруппы позволяет создать из аминоксидного производного Хл e_6 новый ФС с положительным зарядом, не зависящим от pH среды [13]. Целью настоящей работы стало синтезировать аминобутиламид хлорина e_6 с терминальной аминогруппой (1), а также его катионное производное с терминальной триметиламмониевой группой (2) и сравнить их фотодинамические свойства *in vitro*.

Материалы и методы

Синтез метилового эфира

13¹-аминобутиламида хлорина e_6

К раствору 50 мг (0,082 ммоль) метилового эфира феофорбида *a* в 2 мл хлороформа добавляли 0,36 мл (3 ммоль) диаминобутана. Реакционную смесь

перемешивали в течение 4 ч в темноте. Далее промывали водой до нейтрального значения pH. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали, растворитель упаривали досуха и полученный аминобутиламид хлорина e_6 далее очищали методом тонкослойной хроматографии на силикагеле. Элюировали смесью хлороформ-метанол 30 : 1 (по объему). Выход = 37 мг (65 %). ЭСП (CHCl₃) $\lambda_{\text{макс}}$ нм : 403,0; 502,3; 529,8; 663,2 ¹H ЯМР (CDCl₃) δ м.д.: 9,69 (1H, с, 10-H); 9,62 (1H, с, 5-H); 8,79 (1H, с, 20-H); 8,06 (1H, дд, J=15,6 Гц, J=11,4 Гц, 3(1)-H); 6,85 (1H, уш. м, 13(1)-NH (амид)); 6,33 (1H, д, J=15,6 Гц, 3(2)-H (транс)); 6,13 (1H, д, J=11,4 Гц, 3(2)-H (цис)); 5,58 и 5,32 (2H, все д, J=18,9 Гц, 15(1)-CH₂); 4,48-4,39 (2H, м, 17-H, 18-H); 3,98-3,92 (4H, м, 8(1)-CH₂); 3,81 (2H, м, CO-NHCH₂); 3,75 (3H, с, 15(3)-CH₃); 3,64 (3H, с, 12(1)-CH₃); 3,56 (3H, с, 2(1)-CH₃); 3,48 (3H, с, 7(1)-CH₃); 3,32 (3H, с, 17(3)-CH₃); 2,75 (2H, м, 7(1)-CH₂); 2,58-2,53 (2H, м, 13(2)-CH₂); 2,25 (6H, м, 13(3)-(CH₃)₂); 1,76-1,71 (8H, м, 8(2)-(CH₃)), 17(2)-CH₂, 18(1)-CH₃); 0,09 (1H, уш. с, I – NH); -1,85 (1H, с, III – NH). Масс-спектр, m/z: 694.320 [M⁺]. Для C₄₀H₅₀N₆O₅ вычислено M_r=694,384

Синтез иодида диметилового эфира

13¹-N,N,N-триметиламмонийбутиламида хлорина e_6 (2)

К раствору 30 мг (0,043 ммоль) 13¹-аминобутиламида хлорина e_6 в 1,5 мл хлороформа прибавляли 1 мл (0,016 моль) метилиодида в присутствии 0,05 мл 2,4,6-триметилпиридина. Реакцию проводили при кипячении в течение 30 мин. Реакционную смесь экстрагировали в системе дихлорметан/вода. Органический экстракт сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали на ротационном испарителе. ЭСП (CHCl₃) $\lambda_{\text{макс}}$ нм: 403,0; 502,3; 663,0. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ м.д.: 9,49 (1H, с, 10-H); 9,43 (1H, с, 5-H); 8,75 (1H, с, 20-H); 7,71 (1H, дд, J=15,8 Гц, J=11,7 Гц, 3(1)-H); 7,43 (1H, уш. м, 13(1)-NH (амид)); 6,05 (1H, д, J=15,8 Гц, 3(2)-H (транс)); 5,84 (1H, д, д, J=11,7 Гц, 3(2)-H (цис)); 4,93 (2H, м, 15(1)-CH₂); 4,46-4,29 (2H, м, 17-H, 18-H); 3,60-3,57 (6H, м, 8(1)-CH₂, 13(2)-CH₂-N(CH₃)₃, 13(3) CO-NH-CH₂); 3,26 (3H, с, 15(3)-CH₃); 3,23 (3H, с, 12(1)-CH₃); 3,10 (3H, с, 2(1)-CH₃); 2,57 (9H, с, 13(6)-N(CH₃)₃); 2,17 (2H, м, 17(2)-CH₂); 1,74-1,63 (12H, м, 8(2)-(CH₃), 18(1)-CH₃, 17(3)-CH₃, 7(1)-CH₃); -1,59 (1H, с, NH); -1,84 (1H, с, NH). Масс-спектр, m/z: 737,469 [M⁺]. Для C₄₃H₅₇N₆O₅ вычислено M_r 737,958.

Растворы соединений 1 и 2

Для биологических исследований концентрированные растворы соединений 1 и 2 (0,6 и 0,3 мМ соответственно) готовили затиранием порошка в Кремифоре EL (CrEL, Sigma, США) и последующим разбавлением 50 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7,0) до 5 % CrEL. Концентрацию соединений в растворах CrEL определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента молярной экстинкции 34000 М⁻¹×см⁻¹ на длине волны 664 нм. Спектры поглощения соединений 1 и 2 измеряли с помощью спектрофотометра СФ 103 (Аквион, Россия).

Клетки

Клетки аденокарциномы легкого человека A549 и глиобластомы человека U251 выращивали в средах Игла-МЕМ и DMEM соответственно с добавлением 8 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2 мМ глутамин. Пересевы проводили 2 раза в неделю.

Микроскопические исследования

Накопление и распределение соединений в клетках A549 и U251 были изучены методами конфокальной микроскопии и реконструкции спектральных изображений (КОМИРСИ) и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ). Для микроскопических исследований клетки в логарифмической фазе роста отсеивали на покровные стекла в 24-луночные планшеты и выращивались сутки при +37 °С, при 5 % CO₂ до образования рыхлого монослоя. Клетки инкубировали с соединениями **1** и **2** в концентрации 0,5 мкМ в течение 2 ч и помещали под микроскоп для исследования.

Конфокальные спектральные изображения клеток, а также спектры флуоресценции калибровочных растворов измеряли с помощью экспериментальной установки для микроспектрального конфокального анализа [1]. Возбуждение флуоресценции осуществляли гелий-неоновым лазером (длина волны 632 нм, 12 мВт). Измеренные спектры флуоресценции представлялись в виде суммы модельных спектров: аутофлуоресценции в клетке, базовой линии, обусловленной особенностями прибора и флуоресценции исследуемого соединения, измеренной в 1% CrEL. На основе интенсивности флуоресценции исследуемого соединения строили спектральные изображения, описывающие распределение данного соединения в клетках. По полученным спектральным изображениям определяли среднюю интенсивность флуоресценции соединения в цитоплазме клетки $I_{\text{цит}}$. Коэффициент накопления рассчитывали по формуле:

$$K = I_{\text{цит}}/I_k, \text{ где}$$

I_k – интенсивность флуоресценции калибровочного раствора исследуемого соединения в 1 %-ном CrEL при концентрации, с которой инкубировали клетки. I_k измеряли под микроскопом при тех же условиях, при которых проводили исследования клеток. В каждой выборке обрабатывалось и усреднялось 20–30 клеток.

Значение K для соединения **1** в клетках A549 принимали за 100 % и относительно него рассчитывали относительные коэффициенты внутриклеточного накопления ($K_{\text{отн}}$, %) для обоих соединений в клетках A549 и U251.

Внутриклеточное распределение соединений изучали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP2 (Leica, Германия). Флуоресценцию соединений **1** и **2** возбуждали Ar⁺-лазером (длина волны 488 нм) и регистрировали в

области спектра 630–700 нм с пространственным латеральным и аксиальным разрешением 0,3 и 0,6 мкм, соответственно.

Методика изучения темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности соединений

Для определения темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности соединений **1** и **2** клетки высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (плотность посева 5×10^4 клеток/мл). Тестируемые вещества вносили в лунки через 24 ч после посева, варьируя концентрацию от 0.005 до 16 мкМ. Для оценки фотоиндуцированной цитотоксичности через 2 ч инкубации с соединениями **1** и **2** клетки облучали 15 мин с помощью 500 Вт галогеновой лампы через водный фильтр толщиной 5 см и широкополосный фильтр КС-13 с пропусканием 630–1000 нм. Плотность мощности составляла 20–22 мВт/см². После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 3 ч, а затем окрашивали красителями Hoechst 33342 и йодистым пропидием (PI). Hoechst (6 мкМ) и PI (4 мкМ) добавляли к клеткам за 15 мин до окончания инкубации. Hoechst окрашивает ядра как живых, так и мертвых клеток. PI избирательно проникает через мембрану мертвых клеток и интенсивно флуоресцирует, связавшись с ДНК. Темновую цитотоксичность измеряли после 5 часов инкубации клеток с исследуемыми соединениями.

Цитотоксическое воздействие анализировали при помощи эпи-флуоресцентной микроскопии, используя флуоресцентный микроскоп AxioObserver (Zeiss, Германия), как описано ранее [6; 8]. Флуоресценцию Hoechst возбуждали в области 359–371 нм, а регистрировали в области длин волн >397 нм. Флуоресценцию PI возбуждали в области 530–585 нм, а регистрировали в области длин волн >615 нм. По изображениям свечения Hoechst считали общее количество клеток, а по изображениям свечения PI – количество мертвых клеток. В каждой выборке просчитывалось 200–300 клеток. Для сравнения фотоцитотоксичности соединений рассчитывали величины LD₅₀ и LD₉₀, соответствующие концентрациям соединений, при которых наблюдается 50 %-ная и 90 %-ная гибель клеток.

Результаты и обсуждение

Наиболее удобным способом синтеза хлоридов с терминальной аминогруппой и, в частности, соединения **1**, является реакция нуклеофильного раскрытия циклопентанового фрагмента в феофорбиде *a*, полученном из хлорофилла *a*, выделенного из микроводорослей *Spirulina platensis*. В качестве нуклеофила нами был использован диаминобутан. Реакцию проводили в хлороформе в течение 4 ч (рис. 1). Ход реакции контролировали хроматографически по уменьшению подвижности продукта реакции и спектрофотометрически по гипсохромному сдвигу полос $C_{\text{ор}}$ и Q_2 с 413 и 668 нм до 403 и 663 нм соответственно.

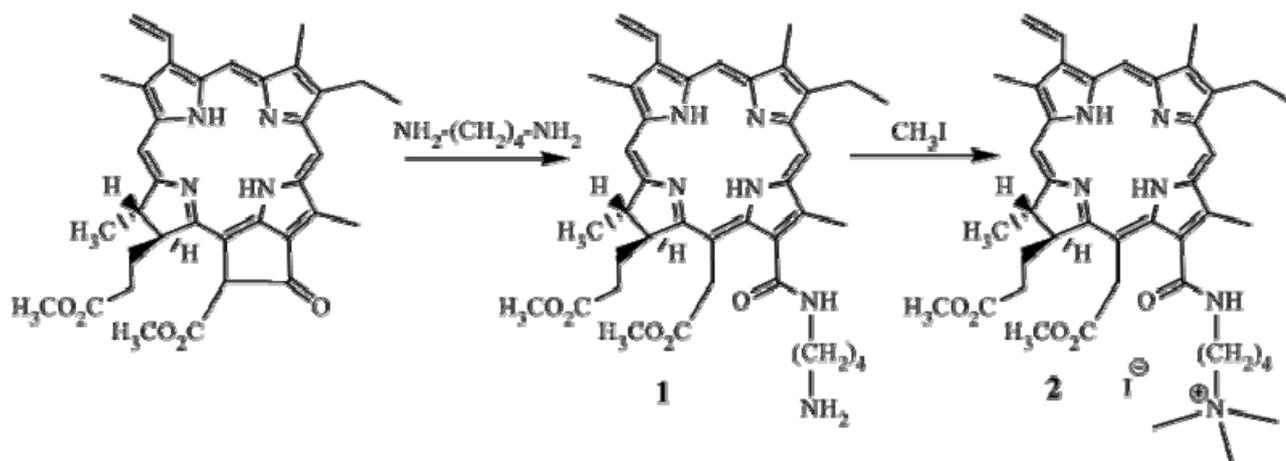


Рис. 1. Синтез катионного аминоамида хлорина e_6 .

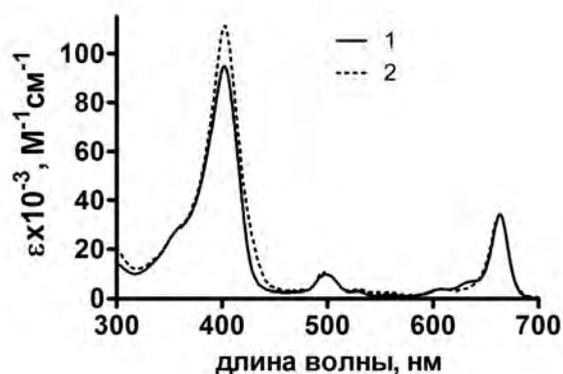


Рис. 2. Спектры поглощения соединений **1** и **2** в 1 %-ной эмульсии CrEL (50 mM Na-фосфатный буфер, pH 7).

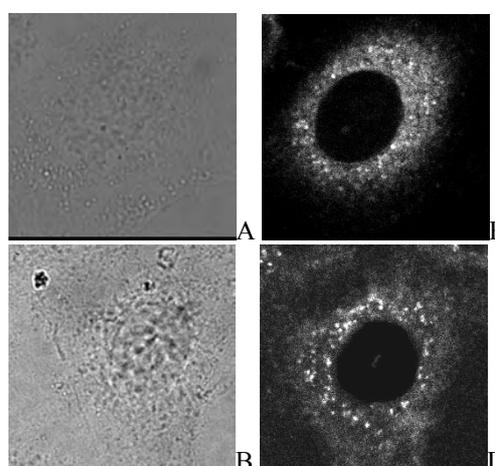


Рис. 3. Распределения соединений **1** (А, Б) и **2** (В, Г) в клетках A549:

А, В – изображения клеток в проходящем свете; Б, Г – внутриклеточное распределение исследуемых соединений, измеренное методом ЛСКМ.

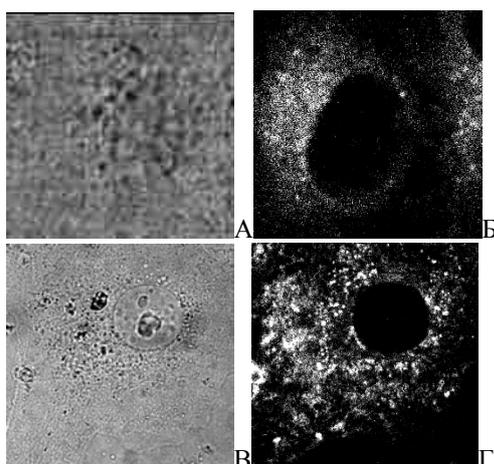


Рис. 4. Распределения соединений **1** (А, Б) и **2** (В, Г) в клетках U251:

А, В – изображения клеток в проходящем свете;

Б, Г – внутриклеточное распределение исследуемых соединений, измеренное методом ЛСКМ.

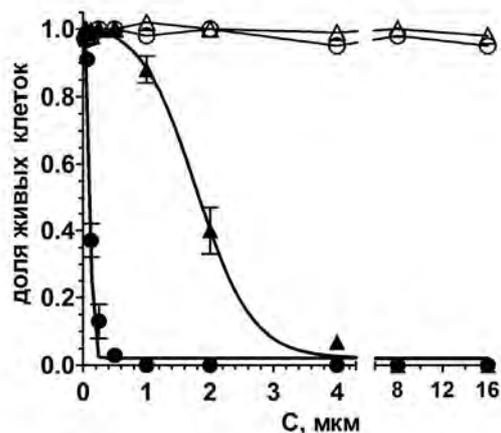


Рис. 5. Темновая (незакрашенные символы) и фотоиндуцированная (закрашенные символы) цитотоксичность соединений **1** (кружки) и **2** (треугольники).

Таблица

Фотофизические и фотобиологические характеристики соединений 1 и 2

Соединение	λ_Q , нм	$\lambda_{фл}$, нм	$K_{отн}$, %		LD ₅₀ , мкМ	LD ₉₀ , мкМ
			A549	U251		
1	664	670	100	98	0,11±0,01	0,17±0,01
2	664	670	19	18	1,8±0,1	2,8±0,1

λ_Q – максимум Q-полосы поглощения в 1% CrEL;

$\varepsilon(\lambda_Q)$ – коэффициент молярной экстинкции на длине волны λ_Q ;

$\lambda_{фл}$ – максимум спектра флуоресценции в 1% CrEL;

LD₉₀ и LD₅₀ – концентрации соединений, соответствующие 90 и 50% уровню фотоцитотоксичности для клеток A549;

$K_{отн}$ – относительный коэффициент внутриклеточного накопления соединений 1 и 2

Катионный ФС 2 получали метилированием терминальной аминогруппы при кипячении в течение 10-30 мин хлорина 1 в избытке йодистого метила с небольшим количеством лутидина. Триметиламмониевое производное хлорина 2 является значительно более гидрофильным соединением по сравнению с исходным хлорином 1.

Для него (2) характерна лучшая растворимость в водно-спиртовых растворах, что делает соединение 2 удобным для биологического применения.

Для дальнейших экспериментов на клетках соединения 1 и 2 были растворены в 5 %-ной водной эмульсии CrEL, являющегося оптимальным солюбилизатором для растворения гидрофобных порфиринов и способствующего их мономеризации [1; 5; 6; 8].

Спектры поглощения соединений 1 и 2 в 1 %-ной эмульсии CrEL практически совпадают в области длин волн 450–700 нм (рис. 2) и типичны для мономерной формы производных хлорина e_6 , у которых боковые заместители не влияют на спектральные свойства самого хромофора. Спектры флуоресценции соединений 1 и 2 полностью совпадают по форме и имеют одинаковый максимум 670 нм (см. табл.).

Накопление и распределение соединений 1 и 2 в клетках A549 и U251

Методом ЛСКМ установлено, что соединения 1 и 2 проникают в клетки A549 и накапливаются в цитоплазматической области. Для обоих соединений наблюдается сходное внутриклеточное распределение: концентрирование в везикулярных клеточных структурах субмикронного размера, а также диффузное окрашивание цитоплазмы (рис.3). Соединения 1 и 2 в ядро клетки не проникают и не накапливаются в плазматической мембране. Для того, чтобы оценить, зависит ли внутриклеточное накопление и распределение соединений 1 и 2 от гистогенеза опухолевых клеток, было исследовано взаимодействие этих соединений с клетками глиобластомы человека U251. Обнаружено, что соединения 1 и 2 проникают в клетки U251 и для них характерно внутриклеточное распределение аналогичное клеткам A549 (рис. 4).

Согласно результатам микроспектральных исследований, внутриклеточные спектры флуорес-

ценции соединений 1 и 2 одинаковы по форме и максимуму во всех участках цитоплазмы клеток A549 и U251 и совпадают со спектрами флуоресценции в 1 %-ном CrEL. Это позволяет предположить, что данные соединения накапливаются в клетках в липидоподобном окружении. Нами были определены относительные коэффициенты внутриклеточного накопления ($K_{отн}$) соединений 1 и 2 в клетках A549 и U251. Отношение внутриклеточной концентрации соединения 1 в клетках A549 к его концентрации в инкубационной среде было принято за 100 % ($K_{отн}=100\%$). Обнаружено, что для соединений 1 и 2 нет зависимости накопления от гистогенеза раковых клеток. Они в одинаковой степени проникают в клетки A549 и U251 (см. табл.). При этом относительный коэффициент внутриклеточного накопления для соединения 1 в 5 раз больше, чем для соединения 2 (см. табл.). Таким образом, введение положительного заряда существенно снизило способность соединения 2 проникать и накапливаться в раковых клетках.

Темновая и фотоиндуцированная цитотоксичность соединений 1 и 2 в отношении клеток A549

Установлено, что без облучения светом хлорины 1 и 2 не токсичны для клеток A549 при концентрации соединения в среде меньше 16 мкМ и времени инкубации 5 ч (рис. 5). Дальнейшее увеличение концентрации соединений в среде ограничено собственной цитотоксичностью CrEL.

Для соединений 1 и 2 было проведено исследование их фотоиндуцированной цитотоксичности. Световая доза в этих экспериментах соответствовала «стандартной» дозе, которая использовалась нами ранее для сравнения активности различных фотосенсибилизаторов [1; 5; 6; 8].

Обнаружено, что соединения 1 и 2 вызывают фотоиндуцированную концентрационно-зависимую гибель клеток (рис. 5). По параметрам LD₅₀ и LD₉₀ (концентрации, вызывающие гибель 50 и 90% клеток, см. табл.) соединение 2 уступает более высокоактивному фотосенсибилизатору 1 в 15 раз.

Наиболее вероятной причиной слабой фотоиндуцированной цитотоксичности соединения 2 является его пониженная способность накапливаться в раковых клетках.

Заключение

В нашей работе показано влияние периферических заместителей в хлориновом макроцикле на реализацию фотоиндуцированной противоопухолевой активности. Установлено, что введение положительно заряда снижает внутриклеточное накоп-

-ление ФС и фотоиндуцированный цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток различного генеза.

Работа поддержана грантами РФФИ №13-03-00577, 13-04-00670, 14-03-00503 и 15-03-02988.

Литература

1. *Игнатова А.А., Маслова А.С., Кирпичников М.П., Феофанов А.В.* Взаимодействия фотосенсибилизатора 13,15-N-(3-гидроксипропил) циклоимида хлорина р6 с нормальными и раковыми клетками крови // *Биоорг. хим.* – 2009. – 35(6) – С. 830–6.
2. *Странадоко, Е.Ф.* Исторический очерк развития фотодинамической терапии // *Лазерная медицина.* – 2002. – №4. – С. 4–8.
3. *Bonnett R.* Photodynamic therapy in historical perspective // *Rev. Contemp. Pharmacother.* – 1999. – 10(1). – P. 1–17.
4. *Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W. et al.* Photodynamic therapy // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1998. – 90. – P. 889–905.
5. *Feofanov A., Grichine A., Karmakova T. et al.* Near-infrared photosensitizer based on a cycloimide derivative of chlorin p6: 13,15-N-(3'-hydroxypropyl)cycloimide chlorin p6 // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – 75 – P. 633–43.
6. *Grin M.A., Bregadze V.I., Sivaev I.B. et al.* Cobalt bis(dicarbollide) versus closo-dodecaborate in boronated chlorin e(6) conjugates: implications for photodynamic and boron-neutron capture therapy // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2012. – 11 – P. 645–52.
7. *Grin M.A., Mironov A.F., Shtil AA.* Anti-Cancer Agents // *Med. Chem.* – 2008. – 8. –P. 683–97.
8. *Grin M.A., Refregiers M., Yakubovskaya R.I. et al.* Cycloimide bacteriochlorin p derivatives: photodynamic properties and cellular and tissue distribution // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – 40. – P. 407–19.
9. *Moan J., Peng Q., Iani V. et al.* Biodistribution, pharmacokinetic and *in vivo* fluorescence spectroscopic studies of photosensitizers // *SPIE* – 1995. – 2625. – P. 234–8.
10. *Moser J.G.* Definitions and General Properties of 2nd and 3rd Generation Photosensitizers // *Photodynamic Tumor Therapy* – London: Harwood Academic Publishers. – 1997. – P. 3–8.
11. *Pandey R.K., Chitgupi U., Lakhminarayanan V.J.* Porphyrins Phthalocyanines. – 2012. –16 – P. 1055–8.
12. *Pandey R.K., Zheng G.* The Porphyrin Handbook / Kadish KM, Smith KM and Guillard R. (Eds.) – Elsevier, 2000. – P. 157–230.
13. *Ponomarev G.V., Kaplan M.A., Pospelov V.I. et al.* Photosensitizer and its' Obtaining Method. RF Patent Application. – 2011. – №2416614.
14. *Sharma S.K., Krayner M., Sperandio F.F. et al.* Porphyrins Phthalocyanines. – 2013. – 73 – P. 17–85.