

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРИНА E_6 И ЕГО ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Е.А. Плотникова¹, Н.Б. Морозова¹, А.Д. Плотинская¹, Р.И. Якубовская¹,
В.И. Чиссов¹, М.А. Грин², А.Ф. Миронов²

¹ ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр., 3

² ФГБОУ ВО «Московский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, просп. Вернадского, 78

Контакты: Екатерина Александровна Плотникова plotnikovaekaterina62@gmail.com

Цель исследования – сравнение эффективности фотодинамического действия триметилового эфира хлорина e_6 (3MeChl) и его производного с остатком галактозы в пирроле А (3MeChl_gal_NoAc), а также сравнительная характеристика накопления этих соединений в опухоли и их биораспределения в нормальных органах и тканях животных.

Материалы и методы. Исследования в системе *in vitro* проводили на опухолевых клетках мышинной карциномы легкого Льюиса (LLC) в мультипараметрической системе. Фотоиндуцированную противоопухолевую активность и биораспределение 3MeChl и 3MeChl_gal_NoAc изучали на мышах BDF₁ с LLC. Биораспределение и фармакокинетику оценивали методом локальной флуоресцентной спектроскопии. Облучение проводили на 7-й день роста опухоли светодиодным источником с длиной волны 661 ± 16 нм при варьировании дозы фотосенсибилизаторов от 0,5 до 7,5 мг/кг и интервале времени между введением и облучением от 5 до 120 мин и при плотности энергии 90 Дж/см².

Результаты. В экспериментах на культивируемых клетках мышинной LLC установлено, что 3MeChl_gal_NoAc обладает более высокой фотоиндуцированной цитотоксичностью, чем его незамещенный предшественник: концентрация ФС, при которой наблюдается 50 % ингибирование клеток ($ИК_{50}$), составила $25 \pm 1,5$ нмоль и $171 \pm 4,0$ нмоль соответственно. При внутривенном введении мышам с подкожной LLC уровень нормированной флуоресценции в опухоли достигал максимальных значений для 3MeChl ($18,4 \pm 0,7$ отн. ед.) в течение 60 мин, для MeChl_gal_NoAc ($34,1 \pm 6,9$ отн. ед.) в течение 15 мин. Введение 3MeChl обеспечивало более высокий флуоресцентный контраст опухоли относительно нормальной кожи и мышечной ткани (до 7,4 и 4,1 соответственно), чем введение 3MeChl_gal_NoAc (до 5,0 и 2,5 соответственно). При сходном профиле биораспределения конъюгат 3MeChl_gal_NoAc быстрее, чем 3MeChl, элиминировался из организма мышей-опухолосителей. На модели подкожной LLC у мышей при внутривенном введении 3MeChl_gal_NoAc в дозе 5,0 мг/кг и интервале между введением фотосенсибилизатора и началом светового воздействия 5 мин (длительность облучения 15 мин, доза света 90 Дж/см²) получен высокий противоопухолевый эффект фотодинамической терапии – 100 % излеченных животных. Однако стремительное выведение галактозильного производного из ткани опухоли, низкая избирательность ее фотодинамического повреждения, а также узкий интервал высокоэффективных терапевтических доз значительно ограничивают перспективность применения данной модификации триметилового эфира хлорина e_6 для фотодинамической терапии злокачественных опухолей.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, гликозилированное производное хлорина e_6 , фотоиндуцированная противоопухолевая активность, биораспределение

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-47-54

SPECIFIC PROPERTIES OF CHLORIN E_6 TRIMETHYL ESTER AND ITS GLYCOLIZED DERIVATIVE AS PHOTSENSITIZERS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

E.A. Plotnikova¹, N.B. Morozova¹, A.D. Plyutinskaya¹, R.I. Yakubovskaya¹, V.I. Chissov¹, M.A. Grin², A.F. Mironov²

¹ P. A. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Branch National Medical Radiology Research Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy proezd, Moscow, 125284, Russia

² Moscow Technological University; 78 Vernadskiy proezd, Moscow, 119454, Russia

The aim of the study was to compare the biodistribution and the photodynamic efficacy of the chlorin e_6 trimethyl ester (3MeChl) and its galactose-substituted in pyrrole A derivative (3MeChl_gal_NoAc).

Materials and methods. *In vitro* experiments were carried out on cultivated murine Lewis lung carcinoma (LLC) cells using multiparametric mode. Biodistribution and therapeutic efficacy of 3MeChl 3MeChl_gal_NoAc were studied in BDF₁ mice bearing s. c. transplanted LLC. The biodistribution study was performed using local fluorescence spectroscopy. For evaluation of the photoinduced antitu-

mor activity the photosensitizer was administered *i. v.* on day 7 of tumor growth in doses varying from 0.5 to 7.5 mg/kg. The tumors were irradiated by LED source with a wavelength of the emitted light 661+/- 16 nm, at various drug-light time interval (from 5 to 120 min), and at energy density 90 J/cm².

Results. It was shown in cultured murine Lewis lung carcinoma cells that 3MeChl_gal_NoAc has higher photo-induced cytotoxicity than the unsubstituted compound (IC₅₀ value of 25 ± 1.5 nM and 171 ± 4.0 nM, respectively). When administered intravenously to mice with subcutaneous LLC a normalized fluorescence intensity of 3MeChl in tumor reached the maximum value (18.4 ± 0.7 a. u.) within 60 min, and for MeChl_gal_NoAc it reached the maximum value (34.1 ± 6.9 a. u.) within 15 min. A higher fluorescent contrast between tumor and normal skin or muscle was registered for 3MeChl (up to 7.4 and 4.1, respectively) than for 3MeChl_gal_NoAc (up to 5.0 and 2.5, respectively). Having similar biodistribution profile in normal organs and tissues of tumor-bearing mice, 3MeChl_gal_NoAc was eliminated from the body faster than 3MeChl. Intravenous administration of 3MeChl_gal_NoAc in dose of 5.0 mg/kg following 15 min light exposure (light dose 90 J/cm²) with a drug-light interval of 5 min caused a high antitumor effect, 100 % of animals were cured. However, a rapid elimination of the galactosyl derivative from the tumor tissue, a low selectivity of photodynamic damage of the tumor, as well as a narrow range of highly effective therapeutic doses considerably limit prospects for this modification of chlorin *e*₆ for photodynamic treatment of the malignant tumors.

Key words: photosensitizer, galactose-substituted chlorine *e*₆ derivative, photo-induced antitumour activity, biodistribution

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) и флуоресцентная диагностика являются современными, интенсивно развивающимися методами лечения и диагностики злокачественных новообразований. ФДТ основана на разрушении опухолевого очага активными свободнорадикальными частицами, возникающими в результате взаимодействия предварительно введенного в организм и накапливающегося в опухолевой ткани фотосенсибилизатора (ФС) с лазерным излучением определенной длины волны. В настоящее время наибольшее распространение получили ФС 2-го поколения с интенсивным поглощением в области 660 нм. К ним относятся производные на основе природного хлорина *e*₆ – радахлорин и фотодитазин (Россия), фотолон (Белоруссия), МАСЕ (Япония) и мн. др. [1]. Эти флуорохромы существенно превосходят препараты 1-го поколения – фотофрин (Канада), фотогем (Россия), но все же обладают определенными недостатками. Так, в частности, при внутривенном введении производных хлорина *e*₆ уровень их накопления в опухолевых клетках остается достаточно низким, преимущественно это происходит в сосудах стромы опухоли [2].

Для повышения избирательности накопления флуорохромов в опухолевом очаге применяют различные наноразмерные носители – мицеллы, липосомы, металлические частицы – ниосомы, дендримеры, квантовые точки и др.; в качестве средств адресной доставки используют конъюгаты ФС с липопротеидами, моноклональными антителами, а также с лигандами, способными специфически связываться с рецепторами на поверхности опухолевых клеток [3].

Известно, что клетки многих злокачественных опухолей экспрессируют белки, специфично связывающие β-галактозиды. В связи с этим особое внимание привлекает возможность включения в структуру ФС остатков галактозы из-за возможности повышать селективность накопления соединений

в клетках-мишенях [4, 5–7, 8]. Кроме того, углеводные фрагменты являются структурными модификаторами, способствующими увеличению растворимости гидрофобных ФС в водных растворах [9].

Ранее нами был описан синтез ФС на основе триметилового эфира хлорина *e*₆ с углеводными заместителями в различных положениях макроцикла (в пирролах А и С или экзоцикле Е) и с максимумом поглощения при 665 ± 10 нм, изучены их физико-химические свойства и фотоиндуцированная цитотоксичность в формате скрининга *in vitro* на ряде культур опухолевых клеток человека (A549, HEP2 и HT29) [5, 6, 10]. Показано, что наибольшей активностью характеризуется производное с остатком галактозы в пирроле А, тогда как введение углеводных остатков в пиррол С или экзоцикл Е хлорина *e*₆ уменьшало фотоактивность красителя в 5–10 раз.

Целью данной работы являлось сравнение в системах *in vitro* и *in vivo* эффективности фотодинамического действия триметилового эфира хлорина *e*₆ и его производного с остатком галактозы в пирроле А, а также сравнительная характеристика их накопления в опухоли и биораспределения в нормальных органах и тканях животных.

Материалы и методы

Фотосенсибилизатор

Производные хлорофилла *a* – триметиловый эфир хлорина *e*₆ (3MeChl) и его конъюгат с остатком галактозы в пирроле А (3MeChl_gal_NoAc) – растворяли в кремофоре EL до конечной концентрации 1,5 ммоль. Разведения концентрированного раствора перед внесением в клеточную среду или для введения животным готовили на физиологическом растворе.

Исследования *in vitro*

Изучение фотоиндуцированной активности проводили на клетках мышинной карциномы легкого Льюиса (LLC), выделенных из солидной опухоли

и адаптированных нами для роста в культуре *in vitro*. Для культивирования клеток использовали среду «Игла-МЕМ» с добавлением L-глутамина и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (все – производства «ПанЭко», Россия).

Методика проведения фотодинамического воздействия *in vitro* подробно описана в предыдущей работе [10]. Фотоиндуцированную цитотоксичность оценивали, варьируя концентрацию ФС (от 9 нмоль до 15 мкмоль) и время инкубации клеток с ФС (от 15 мин до 6 ч). Световое воздействие проводили в дозе 10 Дж/см² в 2 модификациях: в присутствии красителя в среде инкубации и при замене перед облучением содержимого лунок на среду, не содержащую ФС. Выживаемость клеток после воздействия оценивали визуально под инвертированным световым микроскопом и с использованием колориметрического теста (МГТ-теста) [11].

Исследования *in vivo*

Животные. В работе использовали мышей-гибридов BDF₁, самок весом 18–22 г в возрасте 8–9 нед. LLC поддерживали в виде штамма на самцах мышей C57BL/6. Для экспериментов опухолевый материал прививали подкожно в область икроножной мышцы с внешней стороны бедра, по 10 мг измельченной опухолевой ткани на мышь в 0,05 мл физиологического раствора.

Изучение биораспределения ФС в органах и тканях животных. Проводилось методом локальной флуоресцентной спектроскопии контактным способом на лазерном спектральном анализаторе «ЛЭСА-6» («БИОСПЕК», Москва) [12]. ФС вводили внутривенно в дозе 5,0 мг/кг. Животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков сразу после введения ФС и через различные промежутки времени (5 и 15 мин; 1, 2, 4, 24, 48 и 72 ч). Флуоресценцию измеряли *ex vivo* в опухоли, печени, почках, селезенке, жировой ткани, коже и скелетной мышце. Исследовали материал, полученный от 3 животных на каждый срок наблюдения. Накопление ФС в тканях оценивали по максимальным значениям нормированной флуоресценции (ФН) при длине волны, соответствующей максимуму флуоресценции соединений. Флуоресцентный контраст (ФК) рассчитывали как отношение ФН в опухоли к ФН в коже или мышечной ткани.

Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности. ФДТ у мышей проводили на 7-й день роста опухоли. К моменту выполнения ФДТ объем опухоли составлял 120 ÷ 150 мм³. Экспериментальные группы включали по 6 животных. Облучение проводили светодиодным источником с длиной волны 661 ± 16 нм (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Россия) по мультипараметрической системе: варьировали дозу красителей (0,5 ÷ 7,5 мг/кг) и интервал времени

между введением ФС и началом светового воздействия (интервал $\Delta_t = 5 \div 120$ мин). Варианты режима ФДТ изложены в разделе «Результаты». Плотность энергии составляла 90 Дж/см² при плотности мощности 100 мВт/см². В качестве анестезии применяли раствор дроперидола в дозе 0,25 мг/мышь внутривентально за 15 мин до сеанса ФДТ.

Оценку влияния ФДТ на рост опухолей проводили по общепринятым в экспериментальной онкологии критериям (в %): торможению роста опухоли (ТРО), увеличению продолжительности жизни (УПЖ) и критерию излеченности (КИ) [3]. Биологически значимым терапевтическим эффектом считали ТРО ≥ 70 %; УПЖ ≥ 50 %; КИ ≥ 25 %. Для статистической оценки различий между группами применяли U-критерий Манна–Уитни, расчеты проводили с использованием программы “Primer of Biostatistics” версии 4.03. Отличия считали достоверными при уровне значимости *p* менее 0,05.

Результаты и обсуждение

Исследования *in vitro*

При облучении клеток LLC в среде инкубации, содержащей ФС, максимальная фотоиндуцированная цитотоксичность 3MeChI зарегистрирована через 2 ч взаимодействия клеток и красителя (ИК₅₀ = 171 ± 4 нмоль), а для конъюгата 3MeChI_{gal}_NoAc – уже через 1 ч инкубации красителя с клетками (ИК₅₀ = 25 ± 1,5 нмоль). Дальнейшее увеличение до 6 ч времени инкубации ФС с клетками не влияло на выраженность фототоксического эффекта (рис. 1).

В тестах *in vitro* замена перед облучением культуральной среды на свежую, не содержащую ФС, позволяет косвенно оценить вклад фотоиндуцированного повреждения, обусловленного красителем, накопившимся внутри клеток. Облучение в свежей среде клеток, прединкубированных с 3MeChI в течение 2 ч и более, в 1,5 раза достоверно снижало фототоксический эффект красителя (рис. 1). В случае конъюгата 3MeChI_{gal}_NoAc в подобных условиях эксперимента снижения эффективности ФДВ после инкубации клеток с красителем в течение 1 ч и более не наблюдалось, т. е. фотоиндуцированная цитотоксичность галактозильного производного хлорина *e*₆ преимущественно реализуется за счет фотоактивации внутриклеточного ФС.

В отсутствие светового воздействия 24-часовая инкубация клеток с 3MeChI или 3MeChI_{gal}_NoAc в концентрациях до 15 мкмоль не оказывала цитотоксического действия на клетки.

Таким образом, хлорин *e*₆ с остатком галактозы в пирроле А эффективнее накапливается в культивируемых клетках LLC и обладает более высокой фотоиндуцированной активностью по сравнению с незамещенным красителем, что согласуется с дан-

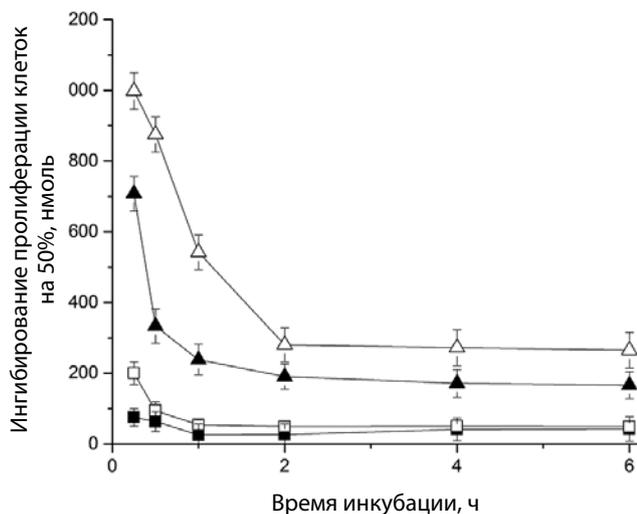


Рис. 1. Фотоиндуцированная цитотоксичность 3MeChI (треугольные символы) и конъюгата 3MeChI_gal_NoAc (квадратные символы) *in vitro* в зависимости от длительности инкубации клеток LLC с красителями. Темные символы (■ и ▲) – облучение в присутствии красителя в среде, светлые символы (□ и △) – облучение после предварительной замены среды, содержащей краситель, на свежую

ными, полученными ранее на других клеточных культурах [3].

Исследования *in vivo*

Биораспределение ФС в органах и тканях животных. Уровень флуоресценции ФС в тканях, как правило, коррелирует с содержанием в них мономерной формы красителя, способной инициировать повреждающие фотохимические реакции в процессе облучения. Таким образом, исследование нормированной флуоресценции ФС позволяет оценить особенности распределения фотоактивной формы соединения в организме.

При анализе спектров флуоресценции, полученных *ex vivo* после внутривенного введения мышам 3MeChI или 3MeChI_gal_NoAc, установлено, что максимум флуоресценции для обоих красителей в органах и тканях животных регистрируется при 671 ± 2 нм.

Оба исследованных производных хлорина e_6 при внутривенном введении сравнительно быстро поступают в ткань опухоли, а также во внутренние органы и ткани животных.

Для 3MeChI уровень ФН в LLC достигает максимального значения через 60 мин после введения красителя и в среднем составляет $18,4 \pm 0,7$ отн. ед. Для конъюгата 3MeChI_gal_NoAc максимальное значение ФН в опухоли регистрируется уже через 15 мин после инъекции раствора ФС и в среднем составляет $34,1 \pm 6,9$ отн. ед. Таким образом, максимальный зарегистрированный показатель ФН в опухоли для галактозильного производного в 1,8 раза превышает соответствующую величину для незамещенного соединения.

Через 72 ч средний уровень ФН в опухоли составляет 36,9 % от максимального зарегистрированного значения для 3MeChI и снижается до 2,9 % от максимального значения для 3MeChI_gal_NoAc. Характер динамики изменения показателей ФН свидетельствует о более длительном удержании незамещенного 3MeChI в опухолевой ткани (рис. 2).

Среди нормальных органов и тканей повышенное накопление 3MeChI зарегистрировано в печени, почках и селезенке, а 3MeChI_gal_NoAc – в печени и почках.

Уже в 1-е сут содержание обоих ФС во внутренних органах достигает минимальных значений, однако скорость выведения из внутренних органов 3MeChI_gal_NoAc и незамещенного красителя существенно различается (рис. 3). Так, уже через 4 ч после внутривенного введения красителей уровень ФН для 3MeChI в печени и почках снижается на 44 и 26 %

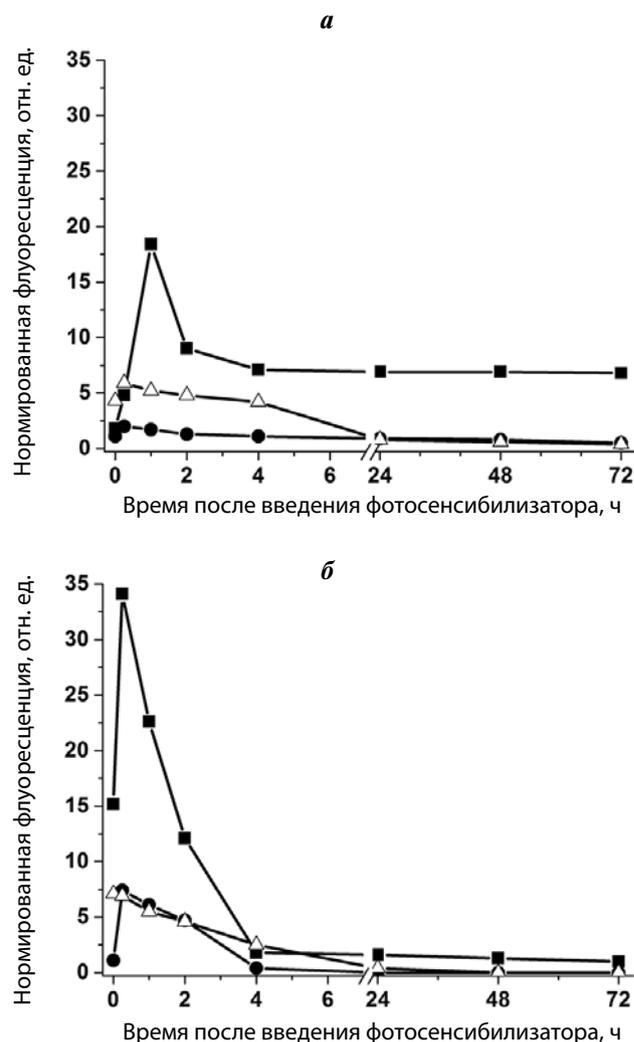


Рис. 2. Уровни нормированной флуоресценции 3MeChI (а) и 3MeChI_gal_NoAc (б) в коже (●), мышце (△) и опухоли (■) у мышей с подкожно привитой LLC на различные сроки после внутривенного введения красителей

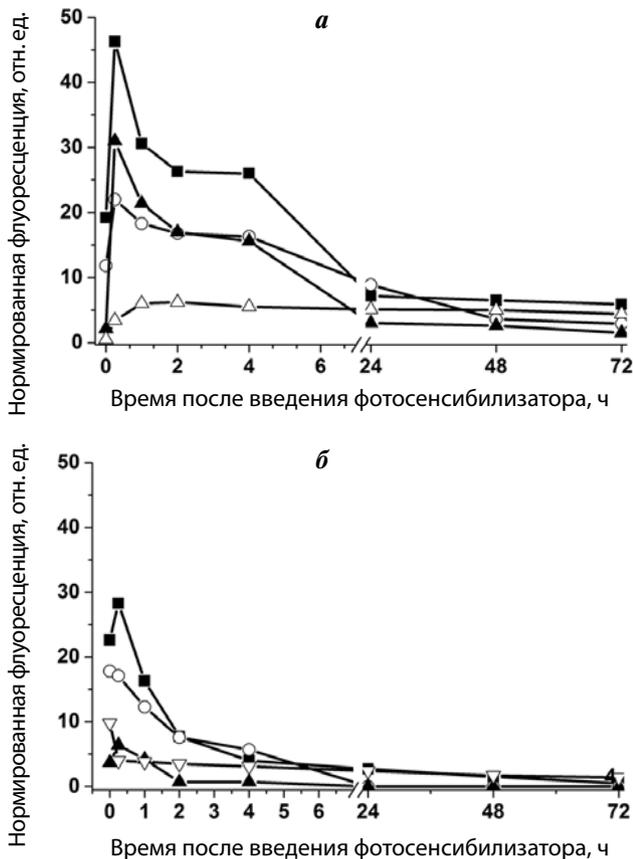


Рис. 3. Уровни нормированной флуоресценции 3MeChl (а) и 3MeChl_gal_NoAc (б) в почках (○), печени (■), селезенке (▲) и жировой ткани (△) у мышей с подкожно привитой LLC на различных сроках после внутривенного введения красителей

от максимального значения соответственно, для 3MeChl_gal_NoAc — на 85 % и 68 % соответственно.

В почках через 24 ч после введения 3MeChl показатель ФН красителя снижается на 60 % от максимального значения, через 72 ч — на 87 %. Для конъюгата 3MeChl_gal_NoAc снижение уровня ФН в почках через 24 ч составляет 87 % от максимального значения, а через 72 ч его флуоресценция в почках не определяется.

В печени через 24 ч после введения 3MeChl наблюдается снижение показателя ФН красителя на 84 %, однако через 72 ч показатель ФН сохраняется почти на том же уровне (87 %). Флуоресценция 3MeChl_gal_NoAc в печени через 24 ч снижается на 90 %, а через 72 ч — на 98 % от максимального значения.

Показатель ФН в мышечной и жировой тканях для 3MeChl, по сравнению с максимально зарегистрированным значением, через 3 сут снижается на 93 и 29 % соответственно. Флуоресценция 3MeChl_gal_NoAc в этих тканях не определяется уже через 48 ч (рис. 2 и 3).

Полученные данные свидетельствуют о более быстрой элиминации 3MeChl_gal_NoAc из организмов мышей, по сравнению с незамещенным 3MeChl,

и о преимущественном выведении обоих соединений через выделительные системы почек и печени.

Важной характеристикой ФС в аспекте его потенциального клинического применения является величина ФК опухоли относительно прилежащих к опухоли нормальных тканей.

ФК опухоли LLC относительно нормальной кожи (ФК₁) для незамещенного 3MeChl резко возрастает в течение первого часа после внутривенного введения красителя до величины $7,8 \pm 0,3$, затем несколько снижается и в интервале от 24 до 72 ч наблюдения варьирует в диапазоне 5,0–7,4. Сходные изменения для 3MeChl претерпевает величина ФК опухоли относительно скелетной мышцы (ФК₂) с той разницей, что в интервале от 24 до 72 ч после введения красителя наблюдается тенденция к увеличению ФК₂ до 3,6–4,1 (рис. 4, а).

Для 3MeChl_gal_NoAc максимальная величина ФК₁ регистрируется сразу после введения флуорохрома и составляет $8,5 \pm 0,3$, затем ФК₁ существенно снижается до 3,1–5,0 и сохраняется на этом уровне в течение 72 ч. Значение ФК₂ для 3MeChl_gal_NoAc кратковременно увеличивается через 15 мин после введения красителя до $4,2 \pm 0,2$ и в течение 72 ч наблюдения сохраняется на уровне величин 1,5–2,5 (рис. 4, б).

Фотоиндуцированная противоопухолевая активность ФС у мышей с LLC. Для корректного сравнения в системе *in vivo* фотоиндуцированного противоопухолевого эффекта, обусловленного незамещенным 3MeChl или его гликозилированным производным, эксперименты проводили по мультипараметрической системе, варьируя дозы красителей и интервал Δ_t .

Наилучшие результаты ФДТ с использованием 3MeChl на модели подкожной LLC получены при начале облучения опухоли через 15 мин после внутривенного введения красителя. Уменьшение интервала Δ_t до 5 мин или его увеличение до 1 или 2 ч при фиксированной дозе 3MeChl достоверно снижало эффективность ФДТ.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, высокий противоопухолевый эффект воздействия достигается при использовании 3MeChl в дозах 2,5 мг/кг и выше: ТРО составляет 100 % и сохраняется на этом уровне до 19 сут наблюдения после начала лечения, величина УПЖ достигает 86–120 %. Однако высокий показатель излеченности животных (КИ = 100 % при наблюдении за животными 120 сут после лечения) зафиксирован только в группах мышей, получавших 3MeChl в дозах 5,0 и 7,5 мг/кг.

При всех исследованных режимах ФДТ с 3MeChl не зафиксировано гибели животных в ранние или отдаленные сроки после лечебной процедуры.

Наибольший противоопухолевый эффект ФДВ с галактозильным производным на модели подкожной LLC достигается при использовании

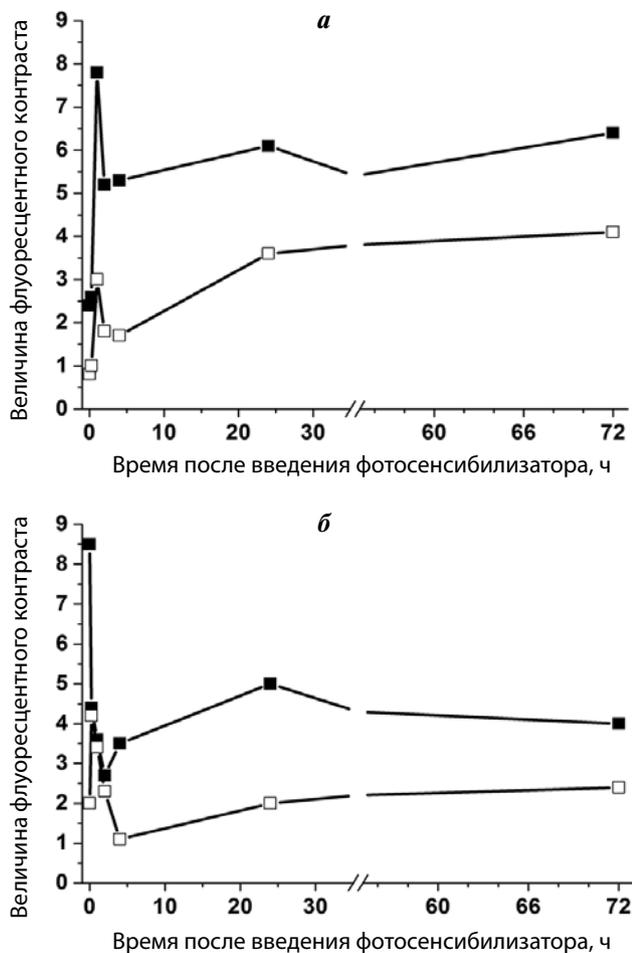


Рис. 4. Величина флуоресцентного контраста опухоли относительно кожных покровов (■) и мышечной ткани (□) для 3MeChl (а) и 3MeChl_gal_NoAc (б) на различных сроках после внутривенного введения красителей мышам с подкожно привитой LLC

3MeChl_gal_NoAc в дозе 5,0 мг/кг с интервалом $\Delta t = 5$ мин: УПЖ = 100 %, УПЖ = 100 %, КИ = 100 % (табл. 2). При этом отмечено, что фотоиндуцированное

повреждение тканей не ограничивается опухолевым узлом и практически совпадает с размером светового пятна. Это указывает на низкую избирательность ФДТ в данном режиме воздействия.

При фиксированном интервале Δt (5 мин) отмечена выраженная зависимость фотодинамических эффектов от дозы галактозильного производного хлорина e_6 (табл. 2). Так, в отличие от незамещенного 3MeChl, снижение дозы 3MeChl_gal_No до 2,5 мг/кг приводит к заметному снижению противоопухолевой эффективности ФДТ, а при увеличении дозы 3MeChl_gal_NoAc до 7,5 мг/кг наблюдается гибель животных сразу после проведения сеанса ФДТ.

Увеличение интервала времени до 15 и 120 мин приводило к резкому снижению величины ТРО до биологически незначимых величин (рис. 5). Кроме того, при интервале Δt , равном 15 или 120 мин, не зафиксировано излеченности животных в экспериментальных группах.

Заключение

Таким образом, в сравнительном исследовании выявлены как общие свойства, так и существенные отличия триметилового эфира хлорина e_6 и его галактозильного производного.

На культивируемых клетках мышинной LLC установлено, что включение в пиррольное кольцо А остатка галактозы существенно увеличивает фотоиндуцированную цитотоксичность 3MeChl в системе *in vitro*, предположительно, за счет более эффективного проникновения красителя в клетки.

На модели подкожной LLC у мышей показано, что как 3MeChl, так и 3MeChl_gal_NoAc после внутривенного введения практически мгновенно регистрируются в опухоли и основных внутренних органах животных. При этом показатели ФН в опухоли достигают максимальных значений в течение 60 мин для 3MeChl и 15 мин

Таблица 1. Противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии с 3MeChl у мышей с карциномой легкого Льюиса в зависимости от дозы фотосенсибилизатора*

Доза ФС, мг/кг	Торможение роста опухоли, %					УПЖ, %	КИ, %
	Время наблюдения за животными после ФДТ, сут						
	7	10	14	17	19		
0,5	50,5	45,2	33,4	17,8	10,4	2,1	0
1,0	52,3	51,6	48,5	34,2	22,7	13,4	0
2,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	86,0	25,0
5,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	120,0	100,0
7,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	120,0	100,0

*Интервал между введением красителя и облучением — 15 мин, доза света — 90 Дж/см². Сокращения (здесь и в табл. 2): ФС — фотосенсибилизатор, ФДТ — фотодинамическая терапия, УПЖ — увеличение продолжительности жизни, КИ — критерий излеченности.

Таблица 2. Противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии с 3MeChI_gal_NoAc у мышей с карциномой легкого Льюиса в зависимости от дозы фотосенсибилизатора*

Доза ФС, мг/кг	Торможение роста опухоли, %					УПЖ, %	КИ, %
	Время наблюдения за животными после ФДТ, сут						
	7	10	14	17	19		
0,5	53,0	30,9	36,2	38,2	34,7	2,8	0
1,0	57,1	41,6	20,5	13,2	12,4	4,5	0
2,5	72,4	69,2	60,1	64,2	55,9	25,0	25,0
5,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	120,0	100,0
7,5	Гибель животных в течение 2 сут после ФДТ						

*Интервал между введением красителя и облучением – 5 мин, доза света – 90 Дж/см².



Рис. 5. Противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии с 3MeChI_gal_NoAc в дозе 2,5 мг/кг (а) или 5 мг/кг (б) на модели подкожной LLC у мышей в зависимости от интервала времени между внутривенным введением красителя и облучением (■ – 5 мин, □ – 15 мин, ▲ – 120 мин)

для 3MeChI_gal_NoAc. Незамещенный 3MeChI в остаточных количествах задерживается в организме животных до 72 ч, в то время как конъюгат 3MeChI_gal_NoAc к этому времени практически полностью элиминируется из организма мышей-опухоленосителей.

Как незамещенный 3MeChI, так и его производное с галактозой в пирроле А позволяют достичь высокого противоопухолевого эффекта на модели подкожной LLC при оптимально подобранных режимах проведения ФДТ. При этом стоит отметить, что в случае использования 3MeChI, даже с учетом длительности накопления необходимой дозы света, световое воздействие приходилось на интервал времени, в котором показатель ФН для данного красителя в опухолевой ткани еще не достиг своего максимума. Наиболее вероятно, что первичной мишенью фотодинамического действия 3MeChI на данной модели является система кровеносных сосудов, эндотелий которых в ранние сроки после внутривенного введения ФС более доступен для взаимодействия с красителем, чем клетки солидного опухолевого образования. Максимум противоопухолевого эффекта ФДТ с 3MeChI_gal_NoAc по времени соответствовал зарегистрированному пику накопления его мономерной формы в опухоли. Кратковременность периода максимального накопления 3MeChI_gal_NoAc в опухоли делает затруднительным в этом случае предположение о потенциальной структурной мишени в опухолевой ткани.

Более долгое удержание в ткани незамещенного 3MeChI создает условия для проведения адекватного сеанса облучения, в то время как стремительное выведение конъюгата 3MeChI_gal_NoAc оставляет лишь короткое время для светового воздействия на опухоль после введения красителя, что технически осложняет проведение сеанса ФДТ. Кроме того, сравнительно низкий ФК опухоли, зарегистрированный для галактозильного производного, который приводит к повреждению окружающих нормальных тканей при облучении опухоли, а также узкий интервал высокоэффективных терапевтических доз значительно ограничивают перспективы применения данной модификации триметилового эфира хлорина е₆ для ФДТ злокачественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Якубовская Р.И., Морозова Н.Б., Панкратов А.А. и др. Экспериментальная фотодинамическая терапия: 15 лет развития метода. Российский химический журнал 2013;2:10–30.
2. Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Plutinskaya A.D. et al. Photophysical properties and *in vitro* and *in vivo* photoinduced antitumor activity of cationic salts of meso-tetra(N-alkyl-3-pyridyl) bacteriochlorin. J Photochem Photobiol B. 2014;130:109–14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.10.017. Epub 2013 Nov 17.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: Ч. 1. М.: Гриф и К., 2012:657–71.
4. Назарова А.И., Феофанов А.В., Кармакова Т.А. и др. Влияние заместителей на фотохимические и биологические свойства 13,15-N-циклоимидных производных хлорина е6. Биоорганическая химия 2005;31(5):535–48.
5. Grin M.A., Lonin I.S., Lakhina A.A. et al. 1,3 – dipolar cycloaddition in the synthesis of glycoconjugates of natural chlorins and bacteriochlorins. J Porphyrins Phthalocyanines 2009;13:336–45.
6. Grin M.A., Lonin I.S., Makarov A.I. et al. Synthesis of chlorin-carbohydrate conjugates by «click chemistry». Mendeleev Commun 2008;18(3):135–7.
7. Park Y.K., Bold B., Cui B.C. et al. Binding Affinities of Carbohydrate-Conjugated Chlorins for Galectin-3. Bull Korean Chem Soc 2008;29(1):130–4.
8. Zhang M., Zhang Z., Blessington D. et al. Porphyrinophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters. Bioconjugate Chem 2003;14(4):709–14. PMID: 12862422.
9. Ahmed S., Davoust E., Savoie H., Boa A.N., Boyle R.W. Thioglycosylated cationic porphyrins – convenient synthesis and photodynamic activity *in vitro*. Tetrahedron Letters 2004;45(31):6045–7.
10. Якубовская Р.И., Плютинская А.Д., Плотникова Е.А. и др. Эффективность в системе *in vitro* гликозилированных производных триметилового эфира хлорина е₆ в зависимости от положения углеводного фрагмента в макроцикле. Фотодинамическая терапия и фотодиагностика 2014;2:3–7.
11. Carmichael J., De Graft W.G., Gazdar A.E. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987;47:936–42. PMID:3802100.
12. Морозова Н.Б. Экспериментальное изучение нового фотосенсибилизатора «Фталосенс» для фотодинамической терапии злокачественных новообразований. Дис. ... канд. биол. наук. М. 2007.