

УДК 615.832.3:616-006-018-092.4

Р.И. Якубовская¹, А.Д. Плутинская¹, Е.А. Плотникова¹, М.А. Грин², А.Ф. Миронов²
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ
В СИСТЕМЕ IN VITRO. ПИРОФЕОФОРБИДЫ И ХЛОРИНЫ**

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – Филиал ФГБУ «Федерального медицинского исследовательского центра им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, Москва

²«Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова», Москва

Контактная информация

Плутинская Анна Дмитриевна, к.б.н, научный сотрудник отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии МНИОИ им. П.А. Герцена – Филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» МЗ РФ

адрес: 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, д.3, тел. +7(495)945-87-16

e-mail: anna2031@rambler.ru

Статья поступила 10.11.2014, принята к печати 09.02.2015.

Резюме

В работе оценены физико-химические и биологические свойства гликозилированных производных пиррофеофорбида *a* и хлорина *e*₆, циклоимидных производных хлорина *p*₆.

Гликозилированные производные пиррофеофорбида *a* и хлорина *e*₆ характеризовались стабильностью в растворах без воздействия светом, но при облучении подвергались фотовыцветанию.

В биологических тестах производные пиррофеофорбида *a* проявляли высокую фотоиндуцированную активность, величина ИК₅₀ варьировалась от 35±7 нМ до 82±7 нМ (в зависимости от бокового заместителя и культуры опухолевых клеток). Среди производных хлорина *e*₆ наибольшую активность проявил конъюгат с галактозным остатком в пирроле А в отношении клеток культуры НЕР2, А549 и НТ29 (ИК₅₀ – 15±8 нМ, 70±19 нМ и 34±16 нМ, соответственно), активность которого превышала в 8-10 раз неконъюгированный аналог и производные с другой модификацией в макроцикле.

Циклоимидные производные хлорина *p*₆ стабильны в растворе без облучения и относительно устойчивы при воздействии светом. В биологических тестах эти соединения проявляли высокую фотоиндуцированную активность (ИК₅₀ варьировала от 35±10 нМ до 250±30 нМ), которая в значительной степени превышала активность немодифицированных производных хлорина *p*₆.

Ключевые слова: фотодинамическое воздействие *in vitro*, производные пиррофеофорбида *a*, производные хлорина *e*₆ и хлорина *p*₆, опухолевые клетки.

R.I. Yakubovskaya¹, A.D. Plyutinskaya¹, E.A. Plotnikova¹, M.A. Grin², A.F. Mironov²

**COMPARATIVE IN VITRO STUDY OF DIFFERENT CLASSES
OF PHOTOSENSITIZERS. PYROPHEOPHORBIDES AND CHLORINES**

¹P.A. Hertsen Moscow Research Institute of Oncology, Moscow

²Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow

Abstract

The study evaluates physical, chemical and biological properties of glycosylated derivatives of pyropheophorbide-*a* and chlorine *e*₆, cycloimid derivatives of chlorine *p*₆.

Glycosylated derivatives of pyropheophorbide *a* and chlorine *e*₆ were characterized by stability in solution without light exposure, but subject to photobleaching during exposure.

Derivatives of pyropheophorbide-*a* showed high photo-induced activity in biological assay, the IC₅₀ value varied from 35±7 nM to 82±7 nM (depending on the pendent group and the tumor cell culture). Among the derivatives of chlorine *e*₆ conjugate with galactose residue in A-pyrrole showed the maximum activity towards HEP2, A549 and HT29 cells (IC₅₀ – 15±8 nM, 70±19 nM and 34±16 nM respectively), its activity 8-10 times exceeding the unconjugated counterpart and the derivatives with different macrocycle modification.

Cycloimid derivatives of chlorine *p*₆ are stable in solution without exposure and relatively stable under light exposure. These compounds showed high photo-induced activity in biological assay (IC₅₀ varied from 35±10 nM to 250±30 nM) significantly exceeding the activity of unmodified derivatives of chlorine *p*₆.

Key words: photodynamic effect *in vitro*, derivatives of pyropheophorbide-*a*, derivatives of chlorine *e*₆ and chlorine *p*₆, tumor cells.

Введение

Фотодинамическая терапия – способ лечения злокачественных новообразований, основанный на применении трех малотоксичных компонентов, а именно фотосенсибилизатора, кислорода и лазерного излучения, которые при совместном воздействии обуславливают цитотоксический эффект.

В последнее время особое внимание привлекают производные природных хлорофилла и бакте-

риохлорофилла. Выбор обусловлен рядом причин: распространенность в природе, интенсивное поглощение в красной и ближней ИК-областях спектра (650–830 нм), возможность химической модификации боковых заместителей, низкий уровень токсичности и быстрое выведение из организма.

К данному классу соединений относятся производные пиррофеофорбида *a*, хлорина *e*₆ и *p*₆, исследования которых представлено в данной работе.

Пирофеофорбиды представляют группу ФС, для которых характерно наличие в спектрах интенсивной полосы поглощения в области 660–670 нм с коэффициентом экстинкции $3,5\text{--}4,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Квантовый выход синглетного кислорода – 0,5–0,6. Соединения данного класса гидрофобны, введение спиртовых групп, аминокислот, различных углеводных заместителей в молекулу феофорбидов увеличивает гидрофильные свойства ФС и существенно их растворимость в водных растворах. Следует отметить, что конъюгирование ФС углеводными фрагментами может способствовать увеличению их направленной доставки в клетку. Ряд авторов показали высокую противоопухолевую активность производных пирофеофорбида *a* в системах *in vitro* и *in vivo* [1; 6; 7; 9].

В последнее время уделяется пристальное внимание классу природных хлоринов, обладающих рядом преимуществ: они биodeградируют и сравнительно быстро элиминируют из организма; в качестве исходных веществ используются пурпурные бактерии и водоросли, что значительно снижает затраты при синтезе. Хлорины – соединения с λ_{max} при 665 нм и коэффициентом экстинкции $2,5\text{--}3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Квантовый выход синглетного кислорода 0,4–0,7. Однако они имеют ограниченное применение в качестве ФС из-за низкой фотостабильности и недостаточной растворимости в биосовместимых средах, поэтому встает необходимость создания более устойчивых красителей, химическая модификация которых позволит оптимизировать гидрофильно-гидрофобный баланс заместителей в макроцикле, что улучшит их фотофизические свойства и растворимость [2; 4; 5].

В статье представлены результаты исследования производных природного хлорофилла *a*: пирофеофорбида *a*, хлорина *e*₆ и *p*₆, пурпуринимидов в системе *in vitro* с различными боковыми заместителями. Изучены их физико-химические свойства, оценена фотоиндуцированная цитотоксичность относительно опухолевых клеток человека различного эпителиального происхождения *in vitro*.

Материалы и методы

Производные пирофеофорбида *a*, хлорина *e*₆ и хлорина *p*₆

Синтезированы на кафедре химии и технологии биологически активных соединений МИТХТ им. М.В.Ломоносова под руководством проф. А.Ф. Миронова и д.х.н. М.А. Грина. Для растворения использовали 100 %-ный раствор Кремофора EL (содержание кремофора в растворе составляло 10 %). Диапазон концентраций ФС варьировали – для физико-химических исследований от 0,5 до 25 мкМ, для биологических исследований – от 5 нМ до 2 мкМ.

Для изучения биологической (противоопухолевой) активности ФС были отобраны соединения, хорошо растворимые в биосовместимых средах и характеризующиеся устойчивостью в бесклеточной среде в течение 24 часов.

Исследования *in vitro*

В работе использованы клеточные линии человека (ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова МЗ РФ): A549 (карцинома легкого), HEp2 (эпидермоидная карцинома гортаноглотки), HT29 (карцинома толстой кишки). В работе использовали клеточные линии от 3 до 18 пассажей. Клетки рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты,

инкубировали в течение 28 ч при +37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂ (стандартные условия). Посевная концентрация клеток устанавливалась для каждой культуры с таким расчетом, чтобы воздействие проходило в экспоненциальной (логарифмической) фазе роста клеток. Далее в планшеты вносили ФС в различных концентрациях (при двух- или трехкратных последовательных разведениях в дуплетах) и проводили облучение галогеновой лампой с набором фильтров, режим облучения – непрерывный. После воздействия светом клетки инкубировали в стандартных условиях 24–28 часов. Оценку выживаемости клеток проводили с использованием МТТ-теста [8]. Уровень ингибирования роста клеток вычисляют по формуле:

$$IP(\%) = \left[\frac{OD_k - OD_0}{OD_k} \right] \times 100\%, \text{ где}$$

IP – уровень ингибирования роста клеток в культуре; OD₀ и OD_k – оптическая плотность раствора формазана в опытных и контрольных лунках, соответственно.

Для расчета величины ИК₅₀ строили кривую роста зависимости ингибирования пролиферации клеточной культуры от концентрации ФС, по которой находили его концентрацию, соответствующую 50 %-ной гибели клеток.

Результаты и обсуждение

Производные пирофеофорбида *a*

Нами изучены пирофеофорбид *a* и его гидроксид-, глико- и галактозильные производные (табл. 1), являющиеся гидрофобными соединениями. По данным литературы, конъюгирование красителей углеводными фрагментами может способствовать увеличению направленной доставки ФС в клетку, а также придавать молекуле амфифильный характер, увеличивая растворимость красителей в водных растворах [1; 10].

Стабильность красителей в динамике в культуральной среде

Как видно из представленных в табл. 2 данных, в культуральной среде с содержанием 7 % ЭТС все изученные соединения характеризовались стабильностью в течение выбранного временного интервала (24 часа). За время наблюдения не отмечалось сдвига максимумов поглощения, снижения величины оптического поглощения, профиль спектра оставался неизменными в течение суток.

Оценка фотовыцветания по спектрам флуоресценции

При изучении фотовыцветания производных пирофеофорбида *a* показано, что данный класс красителей характеризовался неустойчивостью при воздействии светом (табл. 3).

Фотоиндуцированная активность производных пирофеофорбида *a* относительно опухолевых клеток в культуре

При оценке биологических свойств ФС оказалось, что соединения **5** и **7**, где углеводный остаток присоединен через атом серы, обладали темновой цитотоксичностью (от 10 до 100 нМ), что делало их перспективными для дальнейших исследований. У соединений **1–4** и **6** темновой цитотоксичности относительно клеток культуры A549 не выявлено (рис. 1).

Пирофеофорбид **а** (**1**) и его гидроксипроизводное (**2**) проявляли высокую фотоиндуцированную активность в отношении опухолевых клеток А549 (ИК₅₀ составляла 160±30 нМ и 200±25 нМ). А введение углеводных остатков в пиррольное кольцо А (соединения **3**; **4** и **6**) в значительной степени повышало эффективность ФС при ФДВ (величина ИК₅₀ составляла 75±5, 40±5 и 80±10 нМ, соответственно; рис. 2).

Отмечено, что все соединения накапливались в клетках со средней скоростью, поскольку временной интервал, при котором наблюдалась максимальная активность у этого класса ФС, составлял 4 часа.

На опухолевых клетках, которые характеризовались высоким уровнем экспрессии углеводсвязывающих рецепторов (НЕР2 и НТ29), гликозилированные производные пирофеофорбида **а** (**3**; **4** и **6**) проявляли высокую фотоиндуцированную активность, сопоставимую с активностью относительно клеток культуры А549. Величина ИК₅₀ для соединений **3**; **4** и **6** составляла 82±7 нМ, 35±7 нМ и 74±8 нМ для культуры клеток НЕР2 и для 71±8 нМ, 33±5 нМ и 80±10 нМ культуры клеток НТ29, соответственно.

Производные хлорина *e*₆

В работе изучали триметиловый эфир хлорина *e*₆ и его гликозилированные производные, представленные в табл. 4.

Стабильность красителей в динамике в культуральной среде

При изучении абсорбционных и флуоресцентных спектров показано, что триметиловый эфир хлорина *e*₆ (**8**) характеризовался меньшей стабильностью в растворах, оптическая плотность и интенсивность флуоресценции соединения в течение 4 часов оставалась неизменной и незначительно снижалась через сутки инкубации при комнатной температуре.

Гликозилированные производные – стабильны в течение 24 ч инкубации (без воздействия светом). При выбранном временном диапазоне не отмечено снижения величины оптического поглощения и интенсивности флуоресценции в максимумах и изменений профиля спектров (табл. 5).

Как видно из данных, представленных на рис. 3–4, триметиловый эфир хлорина *e*₆ (**8**) и его производные с углеводным заместителем в пирроле С (**10** и **11**) неустойчивы в культуральной среде с содержанием 7 % ЭТС после светового воздействия. Так, при облучении с дозой света 5 Дж/см² интенсивность флуоресценции снижалась в 1,5–2 раза относительно показателя, детектированного до воздействием светом, с дальнейшим незначительным фотовыгоранием красителя при увеличении плотности энергии до 10 Дж/см². Выявлено, что фотовыцветание триметилового эфира хлорина *e*₆ с галактозой в пирроле А (**9**) было менее интенсивным, фотовыгорание красителя сопровождалось незначительным снижением интенсивности полосы с максимумом на 670 нм.

Фотоиндуцированная активность производных хлорина *e*₆ на опухолевых клетках в культуре

При проведении скрининга производных хлорина *e*₆ на клетках культур различного генеза (НЕР2, А549 и НТ29) при варьировании концентрации ФС, времени преинкубации до воздействия, а также при облучении с удалением красителей из среды показано, что все соединения представлен-

ного класса проявляли высокую фотоиндуцированную активность *in vitro*. Показано, что все соединения не проявляли темновой цитотоксичности *in vitro* (диапазон концентраций от 3 до 1000 нМ). Введение углеводного остатка в пиррол А (**9**) в значительной степени (в 2–25 раз, в зависимости от клеточной линии) повышало фотоиндуцированную активность ФС, а присутствие углевода в пирроле С (соединение **10**) и замещенного триазольного цикла (соединение **11**), наоборот, снижало фотоактивность красителей как по сравнению с негликозилированным производным (**8**), так и с гликоконъюгатом (**9**).

Все производные триметилового эфира хлорина *e*₆ оказались существенно активнее, чем известный официальный препарат «Радахлорин» (табл. 6).

Выявлено, что представленные производные хлорина *e*₆ проявляли максимальный эффект при ФДВ и 4-часовой инкубации относительно опухолевых клеток культур НЕР2, А549 и НТ29, с увеличением времени до 6 часов величина ИК₅₀ изменялась незначительно (рис. 3; 4).

На культуре клеток НЕР2 проведена оценка фотоиндуцированной цитотоксичности соединений в зависимости от присутствия в среде во время воздействия светом и с их удалением непосредственно перед облучением. Показано, что эффективность соединений при ФДВ не снижалась при удалении из среды, что косвенно свидетельствовало о проникновении и накоплении ФС в опухолевых клетках (табл. 7).

Производные хлорина *p*₆

Хлорин *p*₆ (**12**) является близким структурным аналогом хлорина *e*₆, отличающимся заместителем в 15 положении макроцикла. Замена винильной группы на формильную в 3-м положении макроцикла обеспечивает сдвиг максимума до 690 нм (формильное производное хлорина *p*₆ **13**), а введение дополнительного имидного экзоцикла в молекулу хлорина *p*₆ – к еще более существенному сдвигу до 710–715 нм.

При этом варьирование заместителей в пирроле А (R₁) и экзоцикле Е (R₂) позволило сместить длинноволновую полосу поглощения в область 724 – 746 нм [3]. В табл. 8 представлены изученные циклоимидные производные хлорина *p*₆ с различными заместителями в макроцикле

Стабильность красителей в динамике в культуральной среде

При проведении абсорбционного и флуоресцентного анализа показано, что все представленные соединения не подвергались деградации в культуральной среде и характеризовались стабильностью в течение выбранных временных интервалов (не отмечено появления дополнительных пиков и снижение оптической плотности в Q-полосе для всех ФС; табл. 9).

При оценке фотовыцветания ряда производных хлорина *p*₆ выявлено, что соединения **20** и **23** подвергались фотобличению в меньшей степени, чем соединения **17**; **19** и **22** (табл. 10).

Фотоиндуцированная активность производных хлорина *p*₆ на опухолевых клетках в культуре

Все соединения характеризовались отсутствием темновой цитотоксичности относительно клеток А549. Оценка фотоиндуцированной активности хлорина *p*₆ и его производных показала, что введение заместителей в макроцикл красителя существенным образом увеличивало эффективность производных при ФДВ.

Пирофеофорбид а и его производные

ФС	Тип макроцикла	Тип бокового заместителя (R)
1		-CH=CH ₂
2		-OH
3		-O-CH ₂ -Gal
4		-O-CH ₂ -Glu
5		-S-(CH ₂) ₂ -O-Gal
6		-O-Gal
7		-S-Glu

Стабильность пирофеофорбида *a* и его производных в среде Игла, содержащей 7%ЭТС

ФС	Время инкубации, часы					
	Ex tempore		2		24	
	Л _{max} ,НМ	OD, усл.ед.	Л _{max} ,НМ	OD, усл.ед.	Л _{max} ,НМ	OD, усл.ед.
1*	672	0,55±0,03	672	0,53±0,01	672	0,53±0,03
2*	662	0,42±0,02	662	0,40±0,01	662	0,4±0,02
3*	662	0,47±0,02	662	0,46±0,02	662	0,45±0,03
4*	660	0,56±0,01	660	0,54±0,01	660	0,55±0,02
5*	663	0,38±0,02	663	0,37±0,02	663	0,37±0,02
6*	662	0,32±0,01	662	0,32±0,01	662	0,32±0,01
7*	662	0,45±0,03	662	0,45±0,01	662	0,45±0,01
Соединение	Время инкубации, часы					
	Ex tempore		2		24	
	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.
1**	675	198,0±1,7	675	195,0±2,5	675	195,0±3,0
2**	670	139,0±1,9	670	137,0±0,8	670	136,0±0,8
3**	670	150,0±2,8	670	147,0±4,2	670	149,0±1,8
4**	670	230,0±3,5	670	227,0±4,2	670	228,0±2,7
5**	670	110,0±0,7	670	99,0±3,4	670	100,0±1,2
6**	670	83,0±4,0	670	80,0±0,9	670	82,0±2,6
7**	662	143,0±2,9	662	140,0±3,8	662	141,0±3,2

*концентрация ФС 15 мкМ;
 **концентрация ФС в растворе 2 мкМ.

Устойчивость пирофеофорбида а и его производных при воздействии светом в бесклеточной среде. Концентрация ФС в растворах 2 мкМ

ФС	Доза света, Дж/см ²					
	до облучения		5		10	
	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.
1	675	200,0±2,8	675	82,0±3,7	675	74,0±0,8
2	670	137,0±2,0	670	70,0±2,8	670	58,0±1,9
3	670	154,0±3,2	670	63,0±4,3	670	55,0±2,5
4	670	220,0±1,5	670	108,0±4,2	670	87,0±2,8
5	670	107,0±3,0	670	45,0±5,1	670	37,0±3,5
6	670	80,0±2,7	670	38,0±2,5	670	25,0±4,1
7	662	140,0±1,6	662	68,0±3,0	662	54,0±3,3

Таблица 4

Производные хлорина *e*₆

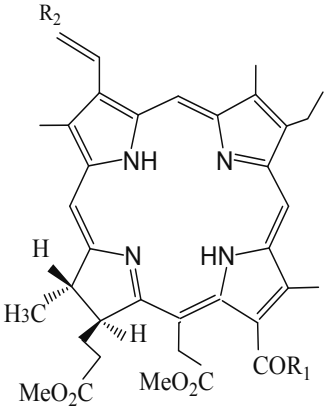
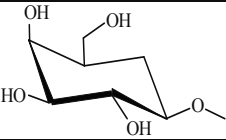
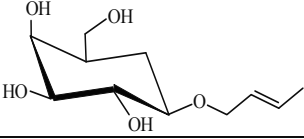
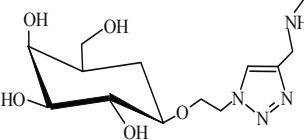
ФС	Тип макроцикла	Заместители	
		R ₁	R ₂
8		-OCH ₃	-CH ₂
9		-OCH ₃	
10			-CH ₂
11			-CH ₂

Таблица 5

Стабильность растворов гликозилированных производных хлорина *e*₆ в среде Игла, содержащей 7 %ЭТС

ФС	Время инкубации, часы							
	ex tempore		2		4		24	
	λ, нм	OD, усл.ед	λ, нм	OD, усл.ед	λ, нм	OD, усл.ед	λ, нм	OD, усл.ед
8*	665	0,75±0,03	665	0,75±0,04	665	0,72±0,03	664	0,57±0,04
9*	667	0,88±0,03	667	0,86±0,04	667	0,84±0,03	667	0,77±0,02
10*	667	0,37±0,02	667	0,36±0,02	667	0,37±0,03	667	0,38±0,02
11*	667	0,85±0,03	667	0,82±0,03	667	0,81±0,04	667	0,78±0,04
ФС	Время инкубации, часы							
	ex tempore		2		4		24	
	λ, нм	IFЧ10 ³ , усл.ед	λ, нм	IFЧ10 ³ , усл.ед	λ, нм	IFЧ10 ³ , усл.ед	λ, нм	IFЧ10 ³ , усл.ед
8**	670	116,0±10,8	670	110,0±13,8	670	99±2,9	670	89±3,4
9**	670	222,0±8,2	670	224,0±3,5	670	221,0±2,1	670	219,0±1,7
10**	660	80,0±2,1	660	75,0±1,4	660	71,0±1,9	660	76,0±0,7
11**	670	168,0±4,2	670	156,0±4,3	670	156,0±1,7	670	160,0±4,2

*концентрация ФС в растворе 25 мкМ; **концентрация ФС в растворе 0,5 мкМ.

Таблица 6

Сравнительная фотоиндуцированная активность Радахлорина, триметилового эфира хлорина *e*₆ и его производных

ФС	ИК ₅₀ , нМ		
	HEp2	A549	HT29
Радахлорин	5500±300	6100±450	7500±550
Триметилловый эфир хлорина <i>e</i> ₆ (8)	200±25	150±48	400±43
Триметилловый эфир хлорина <i>e</i> ₆ с галактозой в пирроле А (9)	15±8	70±19	34±16
Триметилловый эфир хлорина <i>e</i> ₆ с галактозой в пирроле С (10)	200±55	700±47	400±27
Триметилловый эфир хлорина <i>e</i> ₆ с галактозой и триазолом в пирроле С (11)	400±35	700±41	600±38

Таблица 7

Фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов в зависимости от их присутствия в среде во время облучения

ФС	Облучение в присутствии ФС	Облучение без ФС в среде инкубации
	ИК ₅₀ , нМ	
Триметилловый эфир хлорина <i>e</i> ₆ (8)	240±50	260±32
Триметилловый эфир хлорина <i>e</i> ₆ с галактозой в пирроле А (9)	27±7	29±13
Триметилловый эфир хлорина <i>e</i> ₆ с галактозой в пирроле С (10)	290±25	320±20
Триметилловый эфирс галактозой и триазолом в пирроле С (11)	450±32	550±41

Таблица 8

Хлорина *p*₆ и его производные

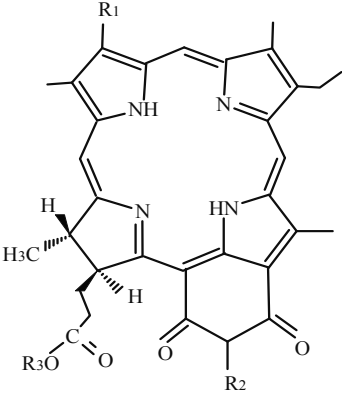
ФС	Тип макроцикла	Заместители		
		R ₁	R ₂	R ₃
14		-CH=CH ₂	-(CH ₂) ₃ OH	H
15		-CH=CH ₂	-(CH ₂) ₂ OH	H
16		-CH=CH ₂	-OCOCH ₃	H
17		-CH=CH ₂	-OH	CH ₃
18		-CH=CH ₂	-CH ₂ COOH	CH ₃
19		-CH=CH ₂	-(CH ₂) ₂ COOH	CH ₃
20		-CHO	-(CH ₂) ₃ OH	H
21		-CH=CH ₂	-OCH ₃	CH ₃
22		-CH=NOH	-OCH ₃	CH ₃
23		-CHO	-OCH ₃	CH ₃

Таблица 9

Стабильность хлорина *p*₆ и его производных в среде Игла, содержащей 7%ЭТС. Концентрация ФС в растворе 15 мкМ

ФС	Время инкубации, часы					
	Ex tempore		2		24	
	Л _{max} ,НМ	OD, усл.ед.	Л _{max} ,НМ	OD, усл.ед.	Л _{max} ,НМ	OD, усл.ед.
1	2	3	4	5	6	7
12*	665	0,34±0,03	665	0,32±0,04	665	0,30±0,03
13*	665	0,29±0,02	665	0,25±0,01	665	0,22±0,01
14*	716	0,37±0,02	716	0,36±0,01	716	0,35±0,02
15*	712	0,41±0,02	712	0,42±0,02	712	0,4±0,02
16*	712	0,45±0,02	712	0,47±0,02	712	0,46±0,02
17*	715	0,62±0,02	715	0,63±0,03	715	0,61±0,01
18*	708	0,33±0,02	708	0,32±0,01	708	0,33±0,01
19*	708	0,35±0,01	708	0,36±0,02	708	0,35±0,01
1	2	3	4	5	6	7
20*	746	0,31±0,02	746	0,32±0,03	746	0,31±0,02
21*	710	0,41±0,02	710	0,43±0,03	710	0,42±0,01
22*	720	0,37±0,02	720	0,36±0,01	720	0,35±0,02
23*	740	0,26±0,02	740	0,25±0,04	740	0,22±0,03
	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	Л _{max} ,НМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.
12**	670	150,0±5,8	670	145,0±5,1	670	144,0±2,8
13**	670	145,0±4,7	670	140,0±6,1	670	142,0±2,1
17**	720	182±3	720	174,0±5,5	720	175,0±4,1
19**	725	210,0±2,9	725	200,0±4,7	725	201,0±4,5
20**	755	190,0±5,1	755	187,0±2,2	755	188,0±2,4
22**	730	192,0±2,3	730	189,0±1,8	730	188,0±3,3
23**	750	187,0±3,9	750	179,0±2,0	750	180,0±5,1

*концентрация ФС 15 мкМ;
**концентрация ФС 1 мкМ.

Таблица 10
Устойчивость циклоимидных производных хлорина *p*₆ при воздействии светом в культуральной среде. Концентрация ФС в растворах 1 мкМ.

ФС	Доза света, Дж/см ²					
	до облучения		5		10	
	<i>L</i> _{max} , нМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	<i>L</i> _{max} , нМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.	<i>L</i> _{max} , нМ	IFЧ10 ³ , усл.ед.
17	720	179,0±3,4	720	79,0±1,5	720	65,0±0,7
19	725	199,0±3,5	725	94,0±2,8	725	85,0±2,8
20	755	187,0±4,1	755	120,0±3,5	755	100,0±2,2
22	730	181,0±1,8	730	87,0±3,4	730	75,0±3,3
23	750	190,0±2,3	750	130,0±2,4	750	108,0±1,8

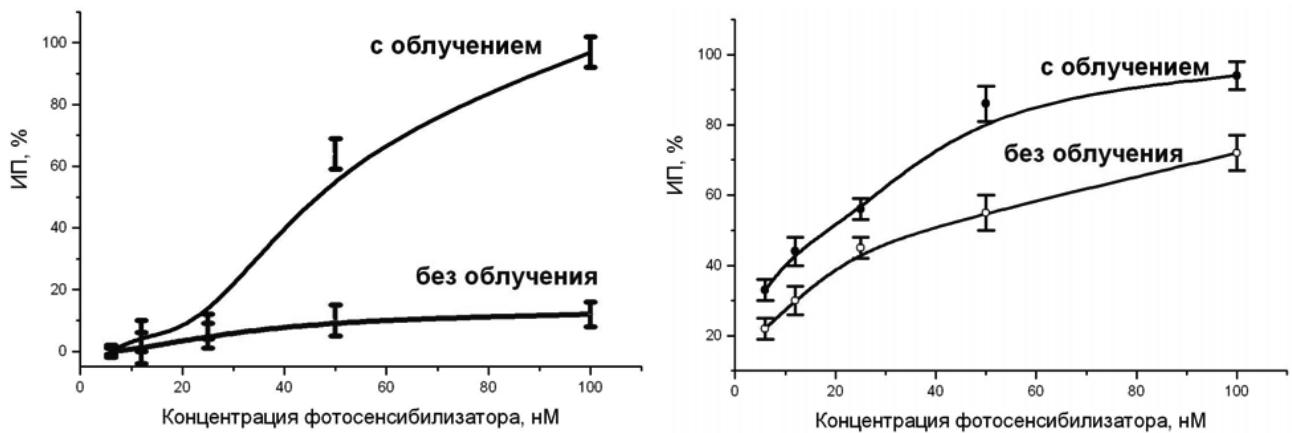


Рис. 1. Фото- и цитотоксичность гликозильного (4, 1) и галактозильного производного пиррофеофорбида *a* (7, 2).

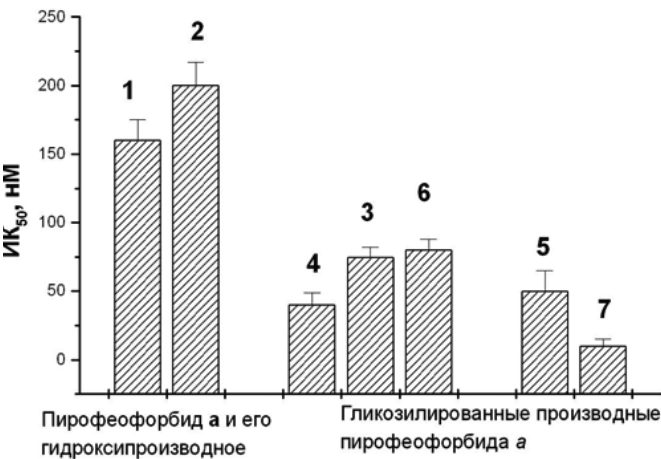


Рис. 2. Фотоиндуцированная активность пиррофеофорбида *a* и его производных. Культура клеток A549. Время инкубации 4 часа.

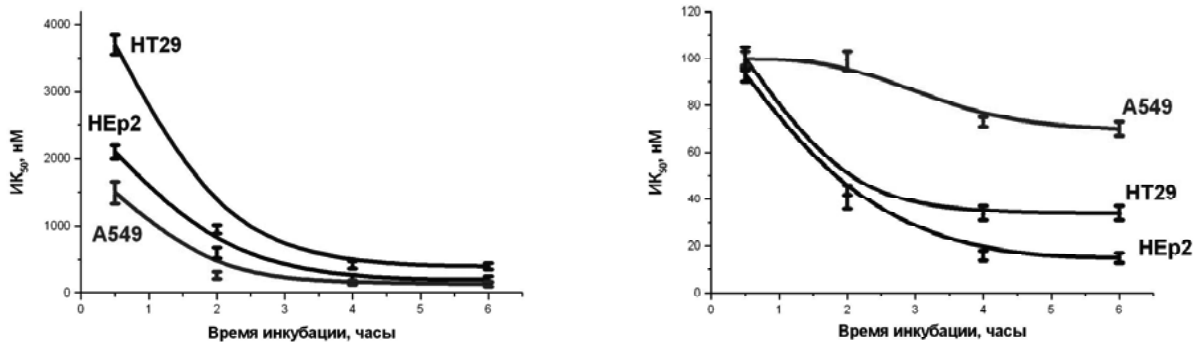


Рис. 3. Фотоиндуцированная активность триметилowego эфира хлорина *e*₆ (8, 1) гликоконъюгата с галактозой в пирроле А (9, 2) в зависимости от времени инкубации

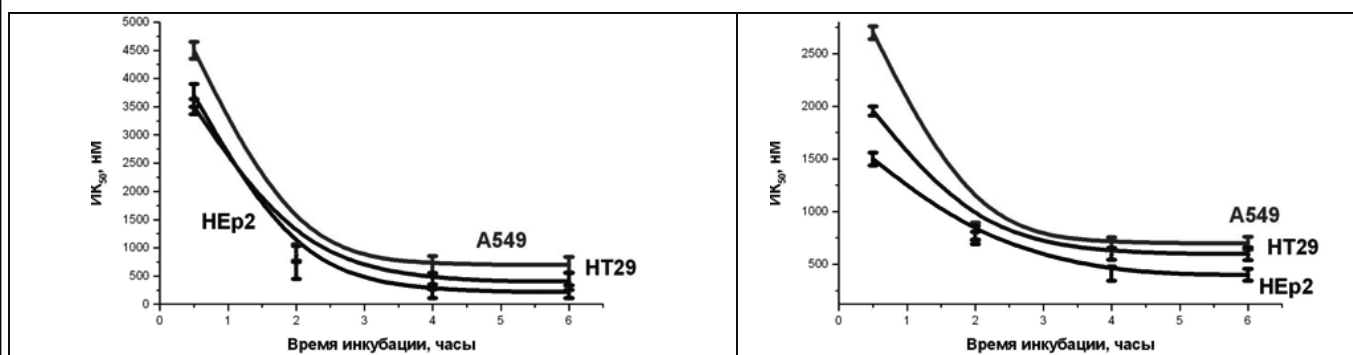


Рис. 4. Фотоиндуцированная активность гликоконъюгата с галактозой в пирроле С (10, 1) и с галактозой и триазолом в пирроле С (11, 2) в зависимости от времени инкубации.

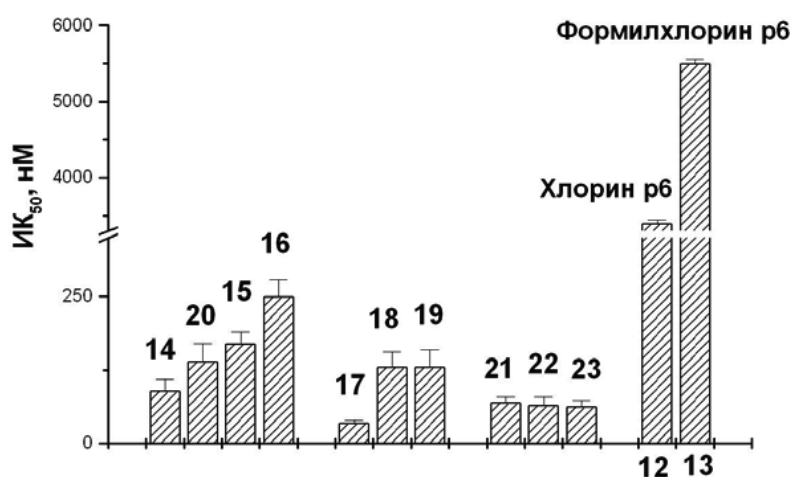


Рис. 5. Фотоиндуцированная активность хлорина p_6 и его циклоимидных производных. Время инкубации 2 часа. 12 – 3400 ± 45 нМ; 13 – 5500 ± 55 нМ; 14 – 90 ± 20 нМ; 15 – 170 ± 20 нМ; 16 – 250 ± 30 нМ; 17 – 35 ± 10 нМ; 18 – 130 ± 26 нМ; 19 – 130 ± 30 нМ; 20 – 140 ± 30 нМ; 21 – 70 ± 10 нМ; 22 – 65 ± 15 нМ; 23 – 63 ± 10 нМ.

Как видно из данных, представленных на рис. 5, наибольшая активность выявлена у ФС с гидроксильной группой в экзоцикле (17; величина IK_{50} составляла 35 ± 10 нМ); удлинение углеводородной цепи в этом положении (соединения 18 и 19) существенно снижало фотоиндуцированную активность (IK_{50} – 130 ± 26 нМ и 127 ± 30 нМ соответственно). Соединения с ярко выраженными липофильными свойствами (21–23), характеризовались более высокой активностью: величина IK_{50} в среднем составляла 67 ± 15 нМ. В ряду соединений 14–16 активность, напротив, убывала с укорочением алкильного радикала в экзоцикле Е (величина IK_{50} – 90 ± 15 нМ, 170 ± 18 нМ и 250 ± 23 нМ соответственно). Полученные результаты показывают, что, варьируя структуру боковых заместителей и их положение в макроцикле, можно в значительной степени влиять на эффективность ФС при ФДВ. Отмечено, что временной интервал, при котором соединения проявляли максимальную фотоиндуцированную цитотоксичность, составлял 2 ч, все красители проникали в клетки и накапливались в них.

Заключение

Таким образом, при оценке физико-химических и фотофизических свойств производных пиррофеофорбида а показано, что соединения характеризовались стабильностью в растворах без воздействия светом, но оказались неустойчивыми при облучении. Пиррофеофорбид а (1) и его гидроксипроизводное (2) имели высокую фотоиндуцированную активность относительно опухолевых клеток в культуре (величина IK_{50} составляла 160 ± 30 нМ и 200 ± 25 нМ, соответственно).

Присоединение углеводного фрагмента к пиррольному кольцу А увеличивало эффективность соединений 3; 4 и 6 в 2-5 раз по сравнению как с исходным пиррофеофорбидом (1), так и с его гидроксильным производным (2). Однако, несмотря на высокую активность большинства соединений, ФС данного класса не были отобраны для дальнейшего изучения. К недостаткам гликоконъюгатов следует отнести трудоемкий и дорогостоящий синтез, а также наличие максимума поглощения при $\lambda_{max} = 660 - 665$ нм.

Оценка физико-химических и фотофизических свойств производных хлорина e_6 (8-11) показала, что все представленные ФС стабильны в растворах без облучения и подвергались фотовыцветанию при воздействии светом.

При оценке фотоиндуцированной противоопухолевой активности отмечено, что эффективность триметилового эфира хлорина e_6 превышала активность Радахлорина в 20–40 раз. Введение заместителей в пиррол С приводило к снижению активности красителей, как по сравнению с неконъюгированным аналогом (8), так и с гликоконъюгатом (9). А введение галактозного остатка в пиррол А макроцикла значительно повышало эффективность производных хлорина e_6 , по сравнению с пиррофеофорбидом а (величина IK_{50} составляла 15 ± 8 нМ и 200 ± 25 нМ, соответственно). Однако, несмотря на положительные результаты в биологических тестах *in vitro*, наличие у этих соединений максимума поглощения при 665 нм, где отсутствует глубокое проникновение света в ткани, а также сложность и трудоемкость их химического синтеза делают дальнейшее изучение данной группы ФС нецелесообразным.

При изучении физико-химических свойств хлорина p_6 и его производных показано, что все ФС характеризовались стабильностью в растворах и относительной устойчивостью при воздействии светом. Внутримолекулярная циклизация и введение ряда электроноакцепторных заместителей в макроцикл хлорина p_6 ($\lambda_{\max}=660$ нм) в значительной степени смещала максимум поглощения его модифицированных производных в более длинноволно-

вую область спектра ($\lambda_{\max}=710-740$ нм) и увеличивала фотоиндуцированную активность ФС по сравнению с хлорином p_6 и его формильным производным. Так, эффективность хлорина p_6 и его формильного производного была в 100-150 раз ниже, чем у наиболее активного циклоимидного производных хлорина p_6 (величина IK_{50} составляла 35 ± 10 нМ), который был выбран для дальнейшего изучения в системе *in vivo*.

Литература

1. Аксенов А.А., Себякин Ю.Л., Миронов А.Ф. Синтез и изучение свойств О- и S- гликозилированных производных пиррофеофорбида *a* // Биоорганическая химия. – 2001. – 27(2). – Р. 145–50.
2. Назарова А.И., Феофанов А.В., Кармакова Т.А. и др. Влияние заместителей на фотохимические и биологические свойства 13,15-N-циклоимидных производных хлорина p_6 // Биоорганическая химия. – 2005. – 31(5). – С. 535–48.
3. Рузиев Р.Д. Синтез и изучение свойств гидроксилсодержащих циклоимидных производных хлорина p_6 . Дисс. ...к.х.н. – М., 2005.
4. Feofanov A., Sharonov G., Grichine A. et. al. Comparative study of photodynamic properties of 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p_6 // Photochem. Photobiol. – 2004. – 79(2). – Р. 172–88.
5. Grin M.A., Lonin I.S., Makarov A.I. et.al. Synthesis of chlorin-carbohydrate conjugates by «click chemistry» // Mendeleev Commun. – 2008. – 3(18). – Р. 135–7.
6. Hajri A, Wack S, Meyer C. et. al. In vitro and in vivo efficacy of photofrin and pheophorbide a, a bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colonic cancer cells // Photochem Photobiol. – 2002. – 75(2). – Р. 140–8.
7. Luo T., Wilson B.C., Lu Q.B. Evaluation of one- and two-photon activated photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human cervical, lung and ovarian cancer cells // J. Photochem Photobiol B. – 2014. – 5(132). – Р. 102–10.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assay // Journal of Immunological Methods. – 1983. – 65. – Р. 55–63.
9. Wu D., Liu Z., Fu Y., Zhang Y. et al. Efficacy of 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a in photodynamic therapy of human esophageal squamous cancer cells // Oncol Lett. – 2013. – 6(4). – Р. 1111–9.
10. Zhang M., Zhang Z., Blessington D. et al. Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters // Bioconjugate Chem. – 2003. – 14(4). – Р. 709–14.