

©Коллектив авторов

ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ СУБСТАНЦИЙ-ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ БАКТЕРИОХЛОРИНОВОГО РЯДА ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Е.А. Плотникова^{1*}, М.А. Грин², П.В. Островерхов², И.В. Пантюшенко², Р.И. Якубовская¹, А.Д. Каприн¹

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена,
125284, Москва, 2-ой Боткинский проезд, 3; эл. почта: plotnikovaekaterina62@gmail.com

²Московский технологический университет, Москва

Проведён первичный скрининг субстанций-фотосенсибилизаторов (ФС) бактериохлоринового ряда с аминоксидными, пропиловым и углеводными заместителями; он включал оценку спектральных характеристик данных соединений, их устойчивость при хранении в растворе в затемнённых условиях и при световом воздействии, а также изучение фотоиндуцированной активности и цитотоксичности на опухолевых клетках НЕР2. По результатам абсорбционного и флуоресцентного анализов красители с аминоксидными заместителями имеют максимум при 754±2 нм, не стабильны при хранении (в течение суток отмечали снижение интенсивности флуоресценции на 33-56%); соединения с пропиловым и углеводными заместителями поглощают в области 780-831 нм и характеризуются стабильностью при хранении и облучении. Все ФС, кроме красителя с углеводным остатком в экзотике Е, обладают фотоиндуцированной активностью при отсутствии темновой токсичности. Наиболее высокая фотоактивность зарегистрирована у соединений с аминоксидными фрагментами в макроциклическом кольце (при 2-х часовой инкубации IC₅₀ составляла от 17 нМ до 49 нМ). Учитывая совокупность физико-химических и биологических свойств, а также технологичность получения и стабильность при хранении и облучении, для дальнейших исследований с целью создания фотосенсибилизатора нового поколения для фотодинамической терапии злокачественных новообразований выбран метиловый эфир О-пропилосим-N-пропоксикарбиопурпуринида.

Ключевые слова: бактериохлорофилл *a*; бактериохлорин; фотодинамическая терапия; фотосенсибилизатор; фотоиндуцированная активность *in vitro*; первичный скрининг

DOI: 10.18097/PBMC20186403283

ВВЕДЕНИЕ

Одним из методов, показавшим в последние годы свою перспективность в лечении злокачественных новообразований различных локализаций (кожа, голова и шея, лёгкие и бронхи, толстая и тонкая кишка, пищевод, желудок, предстательная железа, мочевой пузырь, молочные железы, шейка матки и др.), является фотодинамическая терапия (ФДТ). Метод ФДТ основан на накоплении в опухолевой ткани введённого в организм фотосенсибилизатора (ФС), действие которого активируется локальным световым облучением и сопровождается генерированием активных форм кислорода, вызывающих гибель опухолевых клеток [1, 2].

Выбор потенциальных препаратов для ФДТ в России в настоящее время ограничен ФС первого и второго поколений, производными порфирина, хлорина и фталоцианина (λ_{max} 630–685 нм), применение которых ограничивает использование данной терапии, в первую очередь, при лечении крупных по размеру опухолей, имеющих глубокую инвазию в подлежащие ткани. Для дальнейшего совершенствования метода ФДТ требуется создание новых ФС, обладающих способностью к возбуждению в дальнем красном и ближнем инфракрасном (ИК) диапазонах спектра, применение которых позволит воздействовать на пораженную ткань на глубине более 15 мм и откроет возможности для лечения объёмных и глубокозалегающих опухолей [3-6].

Особое внимание уделяется субстанциям бактериохлоринового ряда, которые интенсивно поглощают в ИК-области спектра, надёжно детектируются в тканях и обладают быстрой фармакокинетикой. До конца 90-х годов прошлого века производные бактериохлорина являлись малоизученными соединениями вследствие отсутствия технологических методов синтеза. Большое количество публикаций последних двух десятилетий показали растущий интерес исследователей разных стран к разработкам и совершенствованию технологического процесса получения данных красителей, изучению их физико-химических, фото-физических и биологических свойств с целью создания на их основе потенциальных перспективных высокоэффективных ФС нового поколения для ФДТ злокачественных новообразований [7-10].

В настоящее время в Израиле и Португалии разработаны первые длинноволновые ФС Tookad soluble [11-13] и Redaphorfin [14, 15], имеющие поглощение при 763 и 750 нм, соответственно, для которых завершаются II и III фазы клинических испытаний. В России подобные препараты отсутствуют, что актуализирует поиск соединений, пригодных для создания ФС нового поколения.

Задачей данной работы являлось изучение физико-химических, фото-физических и биологических свойств новых субстанций бактериохлоринового

* - адресат для переписки

СКРИНИНГ СУБСТАНЦИЙ БАКТЕРИОХЛОРИНОВОГО РЯДА ДЛЯ ФТД РАКА

ряда природного происхождения, поглощающих в длинноволновой области спектра, с целью выбора лидерного соединения.

МЕТОДИКА

Фотосенсибилизаторы

В анализ были включены 10 субстанций бактериохлоринового ряда природного происхождения с аминокетидными (Бхл 1 – 5), с пропиловым (Бхл 6) и углеводными (Бхл 7 – 10) заместителями (табл. 1), синтезированные из природного бактериохлорофилла *a*, путём его направленной химической модификации, который экстрагируют из биомассы *Rhodobacter capsulata*.

Навески ФС растирали в Cremophor EL (“BASF”, Германия) и доводили до концентрации 0,5 мг/мл 0,9% раствором хлористого натрия (“Тротекс”, Россия) (содержание Cremophor EL в конечном растворе составляло 4%). Полученный объём фильтровали через мембранный фильтр “Millipore” с размером пор 0,22 мкм. Все стадии приготовления растворов проводили при минимальном воздействии внешнего освещения.

Спектральные исследования

Спектры поглощения исследуемых ФС регистрировали на спектрофотометре Genesys 2 (“ThermoSpectronic”, США) в диапазоне длин волн от 300 до 900 нм сразу после приготовления растворов и через 24 ч в кварцевых кюветах с длиной оптического пути – 10 мм. Концентрацию ФС в растворе варьировали от 10 мкг/мл до 20 мкг/мл для различных соединений. Оценивали положения спектрального максимума, оптическую плотность и профиль спектра в выбранном временном диапазоне.

Регистрацию флуоресценции растворов ФС проводили контактным способом на лазерном спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей “ЛЭСА” (ЗАО “БИОСПЕК”, Россия). Флуоресценцию возбуждали He-Ne лазером при длине волны генерации 632,8 нм, спектральный диапазон от 300 до 900 нм, оптическое разрешение 2 нм. Измерение флуоресценции растворов красителей проводили в стеклянных пробирках *ex tempore* и через 24 ч хранения при комнатной температуре в затемненных условиях. Концентрация ФС в растворе варьировала от 2,5 мкг/мл до 20 мкг/мл для различных соединений. При проведении исследований следили за изменением положения спектрального максимума и интенсивностью флуоресценции.

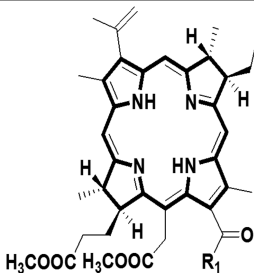
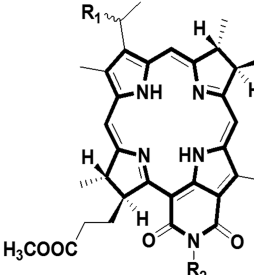
Оценка фотостабильности фотосенсибилизаторов в растворе

В лунки плоскодонного 96-луночного микропланшета (“Corning”, США) вносили по 150 мкл растворов ФС в концентрации от 5 до 20 мкг/мл. В качестве источника оптического излучения применяли галогеновую лампу мощностью 500 Вт с использованием широкополосного фильтра КС-19 ($\lambda \geq 720$ нм) и водного фильтра толщиной 5 см. Плотность мощности составляла 25,0-30,0 мВт/см², а световая доза – 5 Дж/см² и 10 Дж/см². Интенсивность флуоресценции оценивали до и после облучения. При математической обработке из регистрируемых спектров вычитали спектр фоновой флуоресценции и интегрировали в пределах от 600 нм до 900 нм.

Изучение фото- и цитотоксичности фотосенсибилизаторов в системе *in vitro*

В работе использовали культуру опухолевых клеток человека HEp2 – эпидермоидную карциному гортаноглотки. Клетки получены из Института

Таблица 1. Субстанции бактериохлоринового ряда

№ Бхл	Тип макроцикла	R ₁ , R ₂	λ _{max} , нм	ξ, М ⁻¹ см ⁻¹
Производные бактериохлорина				
1		R ₁ - OH	756	31500±110
2		R ₁ - NH-(CH ₂) ₄ -NH ₂	754	66250±150
3		R ₁ - NH-(CH ₂) ₈ -NH ₂	754	66100±130
4		R ₁ - NH-(CH ₂) ₄ -N-(CH ₃) ₂	754	64900±125
5		R ₁ - NH-(CH ₂) ₄ -N-(CH ₃) ₃	754	60050±150
Циклоимидные производные бактериохлорина				
6		R ₁ =N-O-C ₃ H ₇ ; R ₂ -O-C ₃ H ₇	800	30400±110
7		R ₁ =O; R ₂ -N-(CH ₃) ₂	822	50100±145
8		R ₁ -NH-N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac; R ₂ -N(CH ₃) ₂	777	56000±130
9		R ₁ =O; R ₂ -CH ₂ -N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac	831	60000±165
10		R ₁ -NH-N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac; R ₂ -N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac	780	54000±140

вирусологии имени Д.И. Иванковского РАН. Для культивирования клеток использовали среду Игла-МЕМ (“ПанЭко”, Россия) с добавлением L-глутамина (“ПанЭко”) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“ПанЭко”) и гентамицина (“Биохимик”, Россия).

Для экспериментов клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (“Costar, США”) в количестве 7×10^3 клеток на лунку. Раствор ФС в полной культуральной среде вносили в лунки через 24 ч после посева клеток в конечной концентрации от 2 нМ до 150 мкМ, в триплетах. Длительность инкубации клеток с ФС перед облучением варьировали от 30 мин до 6 ч. Световое воздействие проводили в дозе 10 Дж/см² в двух модификациях: в присутствии красителя в среде инкубации и при замене перед облучением содержимого лунок на среду, не содержащую ФС. После завершения светового воздействия планшеты с клетками помещали в СО₂-инкубатор на 24 ч. Для оценки цитотоксической активности клетки инкубировали с флуорохромами сутки в затемнённых условиях. Контролем служили клетки, не подвергавшиеся воздействию. Выживаемость клеток оценивали с использованием колориметрического МТТ-теста, по результатам которого вычисляли величины IC₅₀, концентрации ФС, при которых после воздействия наблюдается 50% гибель клеток. Количественные параметры рассчитывали по результатам трёх независимых тестов.

Статистические расчёты

Для оценки отличий между группами по количественным параметрам применяли U-критерий Манна-Уитни, расчёты проводили с использованием программы Primer of Biostatistics, 4.03. Отличия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические свойства фотосенсибилизаторов

Введение в структуру бактериохлорина аминоксидных (Бхл 2 – 5), пропильного (Бхл 6) и углеводных (Бхл 7 – 10) заместителей способствует увеличению растворимости в биосовместимых средах и тропности ФС к опухолевой ткани (табл. 1).

Производные бактериохлорина с аминоксидными заместителями

Ранее было показано, что в ряду хлорофилла эффективность фототерапии с аминоксидом хлорина е₆, содержащим в положении 13 хлоринового макроцикла остаток этилендиамин, значительно выше по сравнению с незамещённым хлорином е₆ [16]. Другим известным ФС хлоринового ряда является 15²-моноамид хлорина е₆ с ковалентно присоединённой аспарагиновой кислотой – моно L-аспартилхлорин е₆ или Талапорфин [17, 18].

Поэтому в качестве потенциальных ФС для фотодинамической терапии были синтезированы аминоксиды бактериохлорина е (2-5), полученные путём взаимодействия метилового эфира

бактериофеофорбида с диаминоалканами, имеющие различную длину углеродной цепи [19].

По результатам абсорбционного исследования установлено, что бактериоаминоамиды 2-5 и диметилловый эфир бактериохлорина е 1 имеют максимумы поглощения при 360, 522 нм и в длинноволновой области при 754±2 нм. Отличия в структуре линкера не влияют на вид спектров поглощения исследуемых соединений (рис. 1).

Максимум флуоресценции в этих условиях регистрируется при 757±3 нм. Сравнительное исследование спектров флуоресценции растворов данных красителей во времени показало, что смещения максимума флуоресценции не происходит, но отмечается значительное снижение интенсивности флуоресценции в течение суток для соединения 1 на 45%, 2 – 55%, 3 – 52%, 4 – 31% и 5 – 39% от первоначально зарегистрированного значения (рис. 2), что свидетельствует о низкой стабильности данных ФС и возможности использования растворов красителей только в течение 2 ч с момента приготовления.

При облучении красителей 1-5 не происходит сдвига максимума флуоресценции ($\lambda_{\text{max}} = 757 \pm 3$ нм), интенсивность флуоресценции при дозе 10 Дж/см² снижается не более, чем на 20% без изменений в профиле, что свидетельствует о фотостабильности ФС при данном режиме и дозе облучения (рис. 2).

Метилловый эфир О-пропилоксим N-пропокси-бактериопурпуринида имеет поглощение при 365, 420, 540 нм и в ближней ИК-области спектра при 800 нм (рис. 3). Введение имидного экзоцикла приводит к повышению устойчивости пигмента и батохромному сдвигу основной полосы поглощения до 800 нм [20].

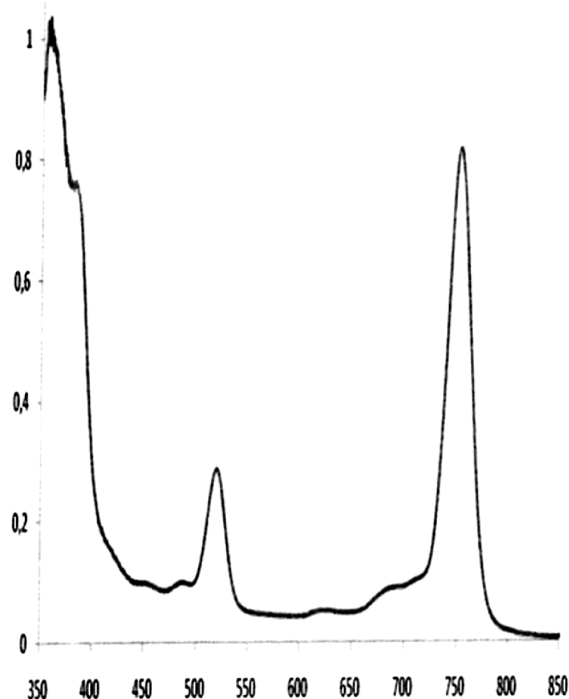


Рисунок 1. Спектр поглощения субстанций-фотосенсибилизаторов 1-5. Концентрация растворов 10 мкг/мл.

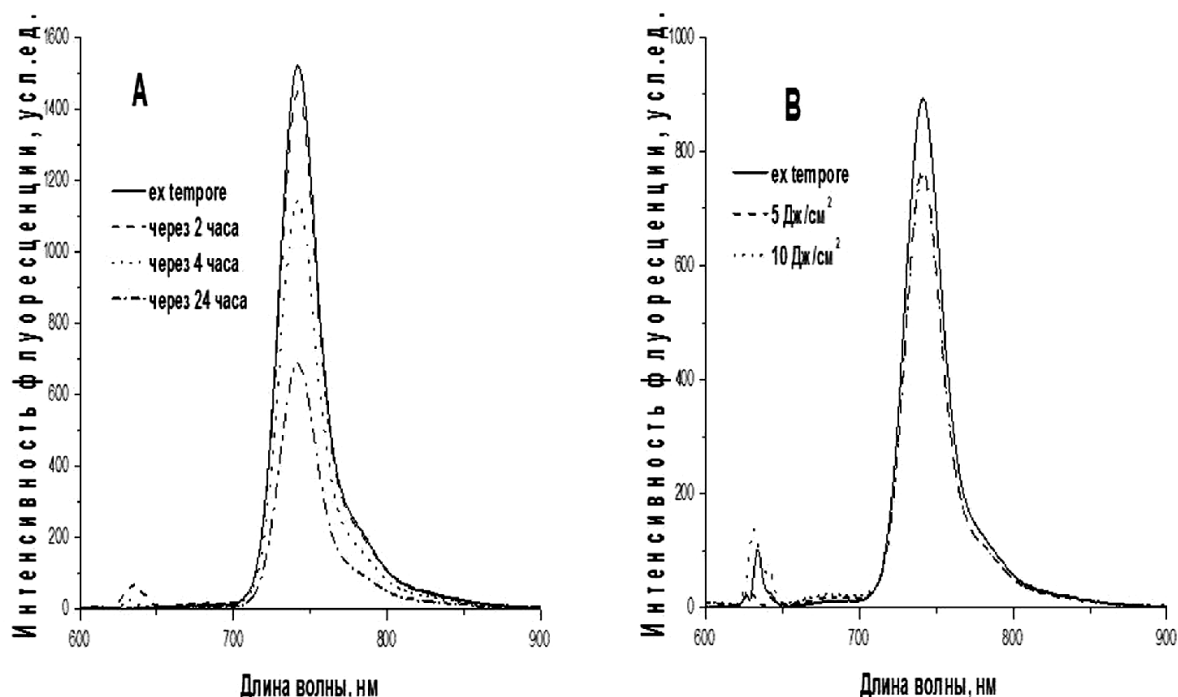


Рисунок 2. Спектры флуоресценции субстанции-фотосенсибилизатора 2: А - в процессе хранения; В - до и после облучения (плотность энергии 5 Дж/см² и 10 Дж/см²).

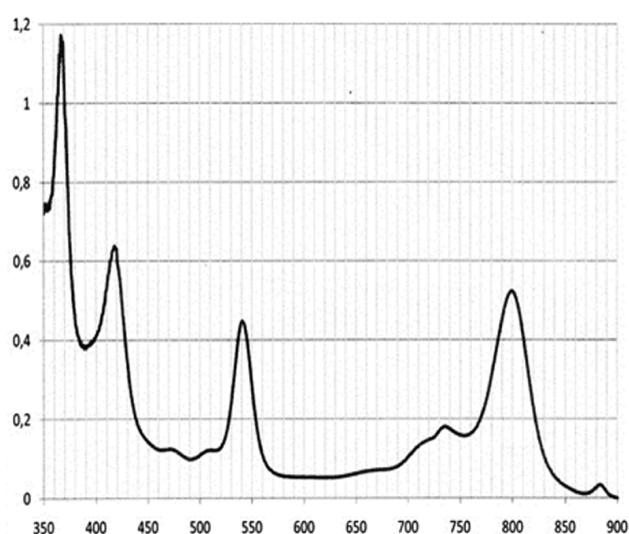


Рисунок 3. Спектр поглощения метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида 6. Концентрация раствора 20 мкг/мл.

Анализ спектров флуоресценции показал, что соединение стабильно в течение 24 ч инкубации в 0,9% растворе хлористого натрия в затемнённых условиях при комнатной температуре. Для данного ФС характерен максимум флуоресценции при 802 нм. В течение выбранного временного диапазона не отмечено изменений в профиле спектра, а зафиксировано лишь незначительное снижение интенсивности флуоресценции, которое не превышает 15% (рис. 4А), что свидетельствует о стабильности данного ФС.

При облучении наблюдали снижение интенсивности флуоресценции на 19% (с 347000 усл.ед

до 280000 усл.ед) при увеличении плотности энергии без изменения характера спектра (рис. 4В).

Производные бактериохлорина с углеводными заместителями. Повышение избирательности фотодинамического действия может быть улучшено присоединением к макроциклическому кольцу полярных групп, например, остатки сахаров, для которых имеются специфические рецепторы на поверхности опухолевых клеток [21, 22]. В связи с этим нами исследованы соединения с углеводными группами в макроциклическом кольце: с лактозильным заместителем в пиррольном кольце А 8, в экзоцикле Е 9, бивалентный лактозилбактериопурпуринимид 10 и *N,N*-диметилциклоимид бактериохлорина 7. Введение углеводных остатков в различные положения макроцикла осуществляли за счёт модификации имидного экзоцикла Е и ацетильной группы пиррольного кольца А [23, 24].

Анализ спектров поглощения показал, что соединения 7-10 интенсивно поглощают свет в области 775–830 нм, введение углеводного фрагмента в пиррол А приводит к сдвигу максимума влево (777 ± 2 нм), а введение лактозы в экзоцикл Е – вправо (831 ± 2 нм).

При наблюдении за флуоресценцией красителей в растворе в течение суток не выявлено сдвигов максимумов в длинноволновой области и изменений в интенсивности флуоресценции (рис. 5). Через 24 ч на спектрах конъюгата 8 происходит значительное возрастание интенсивности флуоресценции в максимуме в коротковолновой области при 665 нм, что свидетельствует о дезагрегации красителя. Следует отметить, что гликоконъюгаты 7, 9 и 10 обладают слабой флуоресценцией.

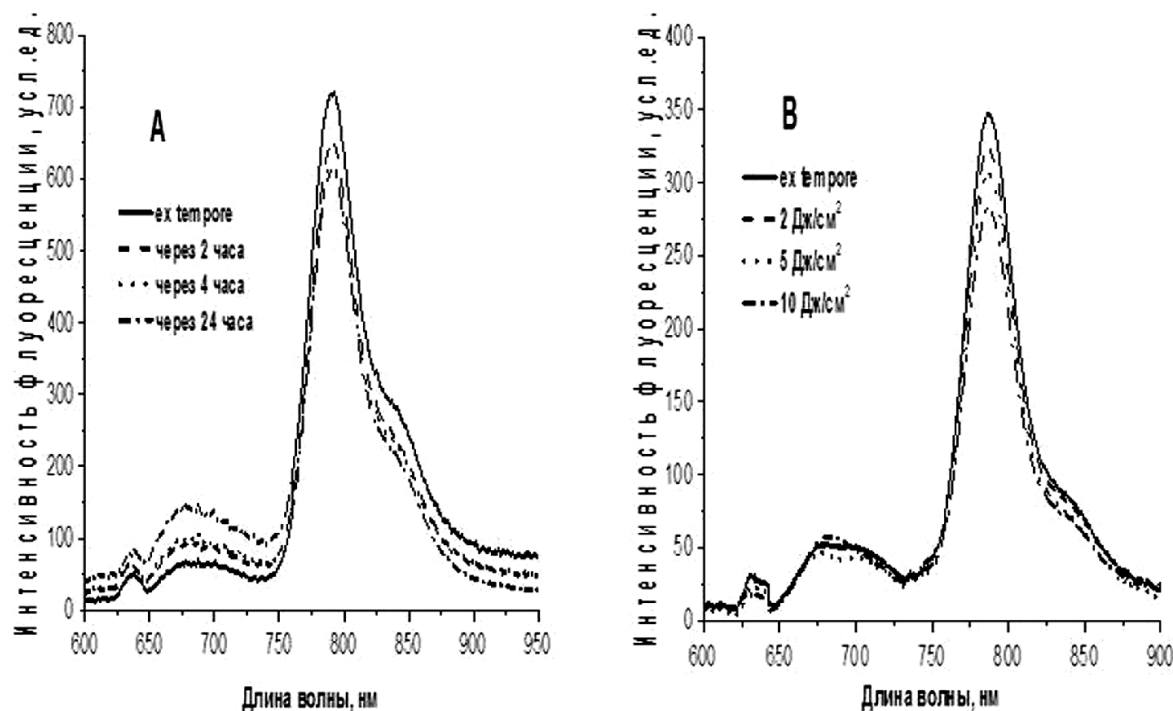


Рисунок 4. Спектры флуоресценции метилового эфира О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпинимида **6**: А - в процессе хранения; В - до и после облучения (плотность энергии 5 Дж/см² и 10 Дж/см²). Концентрация растворов 10 мкг/мл.

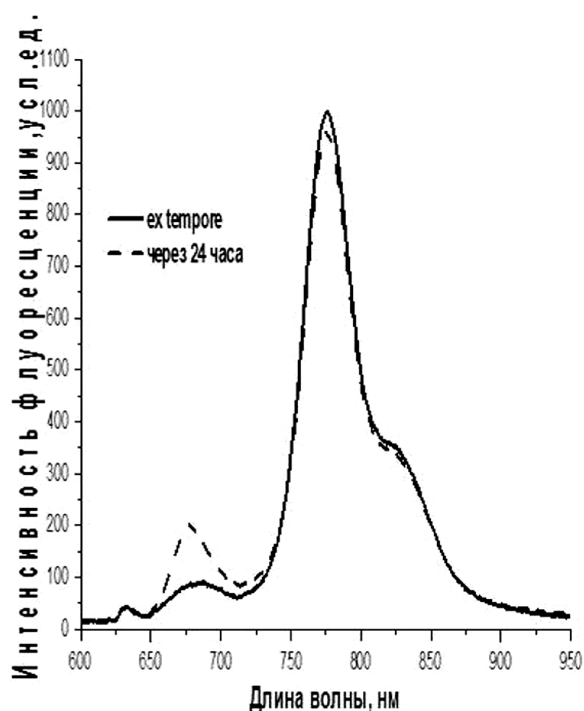


Рисунок 5. Спектры флуоресценции субстанции-фотосенсибилизатора **8**. Концентрация раствора 10 мкг/мл.

Фотоиндуцированная активность фотосенсибилизаторов в системе in vitro

ФС с аминоксидными, пропиловым и углеводными заместителями, кроме красителя **9**, обладают фотоиндуцированной активностью в отношении клеток эпидермоидной карциномы гортаноглотки человека HEp2 при отсутствии темновой токсичности (табл. 2).

Величина IC_{50} бактериоамидаминов достигала своего минимального значения к 4 ч инкубации с клетками и составляла 330 ± 9 нМ для соединения **1**, 32 ± 3 нМ для **2**, 43 ± 5 нМ для **3**, 19 ± 2 нМ для **4** и 44 ± 3 нМ для соединения **5**. Замена перед облучением среды инкубации, содержащей флуорохромы, на свежую среду, практически не влияла на эффективность фотодинамического воздействия. Данная постановка эксперимента позволяет косвенно оценить вклад фотоиндуцированного повреждения, обусловленного красителем, накопившимся внутри клеток.

Таким образом, введение аминоксидных заместителей в макроциклическое кольцо приводило к увеличению фотоактивности красителей **2-5** в 8-17 раз по сравнению с незамещённым диметилловым эфиром бактериохлорина **1**.

Максимальная фотоиндуцированная активность метилового эфира О-пропилоксим-N-пропокси-бактериопурпинимида была зарегистрирована к 6 ч инкубации ФС с клетками HEp2 и составляла 580 ± 12 нМ, что выше в 13-30 раз, чем у бактериоамидаминов (табл. 2). Удаление красителя из среды инкубации перед облучением не влияло на фотоактивность, что свидетельствует о реализации фотодинамического эффекта, за счёт ФС, накопившегося в клетках ($IC_{50} = 591 \pm 17$ нМ).

Инкубация клеток с ФС **6** в концентрациях до 15 мкМ в отсутствии светового воздействия в течение 24 ч не влияла на рост опухолевых клеток HEp2.

Изучение фотоцитотоксичности красителей с углеводными заместителями показало, что наибольшую активность проявил фотосенсибилизатор с дисахаридным остатком в пирроле А **8**, величина IC_{50}

СКРИНИНГ СУБСТАНЦИЙ БАКТЕРИОХЛОРИНОВОГО РЯДА ДЛЯ ФТД РАКА

Таблица 2. Фотоиндуцированная активность производных бактериохлорина в зависимости от времени инкубации (опухолевые клетки эпидермоидной карциномы гортаноглотки HEp2)

№ Бхл	Облучение в присутствии ФС в среде инкубации и с удалением ФС	ИК50, нМ Время инкубации ФС с клетками			
		0,5 часа	2 часа	4 часа	6 часов
1	Без удаления ФС	370±13	330±8	330±9	340±12
	С удалением ФС	680±11	340±10	339±11	340±8
2	Без удаления ФС	51±4	41±5	32±3	43±4
	С удалением ФС	62±5	46±4	34±3	43±4
3	Без удаления ФС	54±3	49±4	43±5	39±2
	С удалением ФС	63±5	51±3	48±3	46±4
4	Без удаления ФС	28±2	17±2	19±2	19±2
	С удалением ФС	31±3	21±3	20±2	21±2
5	Без удаления ФС	60±3	48±3	44±3	43±2
	С удалением ФС	68±4	54±5	50±4	50±2
6	Без удаления ФС	800±25	620±15	603±16	580±12
	С удалением ФС	960±37	791±26	640±25	591±17
7	Без удаления ФС	4000±244	1200±111	1300±131	1300±112
	С удалением ФС	4900±285	2500±134	2800±169	3900±236
8	Без удаления ФС	100±11	100±12	100±9	100±6
	С удалением ФС	1200±56	900±33	400±28	400±42
9	Без удаления ФС С удалением ФС	Темновая токсичность			
10	Без удаления ФС С удалением ФС	4300±235 >>10000	1900±132 >>10000	1500±204 >>10000	1500±116 >>10000

составила 100±3 нМ. Удаление флуорохрома **8** из среды приводило к снижению фототоксичности в 9 раз после 2 ч инкубации и в 4 раза после 4 ч инкубации. Неконъюгированное циклоимидное производное бактериохлорина **7** характеризовалось величиной IC₅₀ равной 1200±22 нМ, что в 12 раз ниже активности гликоконъюгата **8**. Введение двух лактозильных остатков в макроциклическое кольцо не приводило к увеличению фотоиндуцированной активности фотосенсибилизатора **10** (IC₅₀=1500±68 нМ), а удаление конъюгата из среды инкубации перед облучением значительно снижало его активность (IC₅₀>>10000 нМ), что свидетельствует о реализации фотозффекта только за счёт внеклеточного красителя (табл. 2).

Таким образом, полученные данные показывают, что изменение структуры фотосенсибилизатора позволяет влиять как на фотоиндуцированную активность фотосенсибилизаторов, так и на их физико-химические свойства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования показали, что все изученные субстанции-фотосенсибилизаторы бактериохлоринового ряда обладают интенсивной полосой поглощения в длинноволновой области спектра ($\lambda_{\text{max}}=754-831$ нм). Соединения бактериохлоринового ряда с аминоксидными заместителями в макроциклическом кольце **2-5** устойчивы при облучении световой дозой 10 Дж/см², обладают высокой фотоиндуцированной активностью в отношении клеток карциномы гортаноглотки человека HEp2, однако стабильны

в растворе в затемнённых условиях в течение только 2-х ч, что не позволяет в настоящее время использовать ФС данной группы для дальнейшего углублённого изучения.

Красители с углеводными заместителями **7, 9** и **10** оказались стабильными в течение суток инкубации в затемнённых условиях, у ФС **8** зарегистрирован рост интенсивности флуоресценции в максимуме при 665 нм. Наиболее активным в системе *in vitro* среди полученных соединений был краситель с углеводным фрагментом в пирроле **А 8**. Увеличение количества сахарных остатков не влияет на фототоксичность, но придаёт ФС **10** амфифильный характер и улучшает его растворимость в водном растворе, а введение углеводного остатка в экзоцикл приводит к темновой токсичности красителя **9**.

Несмотря на высокую фотоактивность отдельных представителей этого подкласса ФС, совокупность физико-химических и биологических свойств, а также сложность и трудоёмкость химического синтеза исследованных производных бактериохлоринового ряда, делают дальнейшее исследование данной группы флуорохромов нецелесообразным.

Метилловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринида характеризовался стабильностью при хранении, устойчивостью при облучении, технологичностью получения и достаточно высокой фотоиндуцированной активностью в системе *in vitro* в отсутствии темновой токсичности. Всё это позволяет отнести метилловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропокси-бактериопурпуринида к перспективным ФС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abrahamse H., Hamblin M.R. (2016) *Biochem J.*, **473**(4), 347-364.
2. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D. et al. (2011) *CA Cancer J. Clin.*, **61**(4), 250-281.
3. Трухачева Т.В., Шляхтин С.В., Исаков Г.А., Истомин Ю.П. (2015) Фотолон – современный фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии, Парадокс, Минск, 103 с.
4. Меерович И.Г., Меерович Г.А., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. (2006) Российский биотерапевтический журнал, **5**(3), 93-97.
5. Ethirajan M., Chen Y., Joshi P., Pandey R. (2011) *Chem. Soc. Rev.*, **40**(1), 340-362.
6. Mogissi K., Dixon K., Gibbins S. (2015) *Surgery J.*, **1**, 1-15.
7. Huang Y.-Y., Luo D., Hamblin M.R. (2015) *Curr. Org. Chem.*, **19**, 948-957.
8. Kozyrev A., Ethirajan M., Chen P., Ohkubo K., Robinson B.C., Barkigia K.M., Fukuzumi S., Kadish K.M., Pandey R.K. (2012) *J. Org. Chem.*, **77**(22), 10260-10271.
9. Patel N., Pera P., Joshi P., Dukh M., Tabaczynski W.A., Sifers K.E., Kryman M., Cheruku R.R., Durrani F., Missert J.R. et al. (2016) *J. Med. Chem.*, **59** (21), 9774-9787.
10. Zhang L.J., O'Shea D., Zhang C.Y., Yan Y.J., Wang L., Chen Z.L. (2015) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **141**(11), 1921-1930.
11. Kawczyk-Krupka A., Wawrzyniec K., Musiol S.K., Potempa M., Bugaj A.M., Sieroń A. (2015) *Photodiagnosis Photodynamic Ther.*, **12**(4), 567-574.
12. Taneja S.S., Bennett J., Coleman J., Grubb R., Andriole G., Reiter R.E., Marks L., Azzouzi A.R., Emberton M. (2016) *J. Urol.*, **196** (4), 1096-1104.
13. Palma P., Benzaghoul F., Lay R.R., Zeggara L., Azzouzi A., Rivera A.R. (2015) *Photodiagnosis Photodynamic Ther.*, **12**, 325-375.
14. Pucelik B., Arnaut L.G., Stochel G., Drbrowski J.M. (2016) *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **8**, 22039-22055.
15. Arnaut L.G., Pereira M.M., Simoes S., Dabrowski J.D., Schaberle F.A. (2017) *Photodiagnosis Photodynamic Ther.*, **17**, 4-78.
16. Hargus J.A. (2005) Naturally-derives porphyrin and chlorine photosensitizers for photodynamic therapy. A Thesis. Louisiana State University.
17. Пономарев Г.В., Каплан М.А., Поспелов В.И., Круглов И.Ю., Ахлебинин М.Ю. (2011) Бюл. №11. Фотосенсибилизатор и способ его получения. Патент РФ №2416614.
18. Gomi S., Nishizuka T., Ushiroda O., Takahashi H., Sumi S. (1998) *Heterocycles.*, **48**, 2231-2243.
19. Grin M.A., Reshetnikov R.I., Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsigankov A.A., Efremenko A.V., Ermakova D.E., Feofanov A.V., Mironov A.F. (2014) *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **18**, 129-138.
20. Пантюшенко И.В., Грин М.А., Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Цыганков А.А., Миронов А.Ф. (2014) Вестник МИТХТ, **9**(3), 3-10.
21. Pereira P.M., Silva S., Ramalho J.S., Gomes C.M., Girão H., Cavaleiro J.A., Ribeiro C.A., Tomé J.P., Fernandes R. (2016) *Eur. J. Cancer*, **68**, 60-69.
22. Zheng X., Morgan J., Pandey S.K., Chen Y., Tracy E., Baumann H., Missert J.R., Batt C., Jackson J., Bellnier D.A., Henderson B.W., Pandey R.K. (2009) *J. Med. Chem.*, **52**(14), 4306-4318.
23. Grin M.A., Lonin I.S., Lakhina A.A., Kononikhin A.S., Kuzmin V.A., Mironov A.F. (2009) *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **13**, 336-345.
24. Grin M.A., Lonin I.S., Makarov A.I., Lakhina A.A., Toukach F.V., Kachala V.V., Orlova A.V., Mironov A.F. (2008) *Mendeleev Commun.*, **18**(3), 135-137.

Поступила: 26. 01. 2018.
Принята к печати: 20. 03. 2018.

PRIMARY SCREENING OF SUBSTANCES-PHOTOSENSIBILIZERS OF THE BACTERIOCHLORIN RANGE FOR PHOTODYNAMIC THERAPY OF MALIGNANT NEOPLASMS

E.A. Plotnikova¹, M.A. Grin², P.V. Ostroverkhov², I.V. Pantushenko², R.I. Yakubovskaya¹, A.D. Kaprin¹

¹Hertsen Moscow Institute of Oncology,
3, 2nd Botkinsky Proezd, Moscow, 125284 Russia; e-mail: plotnikovaekaterina62@gmail.com
²Moscow Technological University, Moscow, Russia

This paper presents a primary screening of bacteriochlorin-type compounds with aminoamide, propyl and carbohydrate substituents aimed for development a new generation photosensitizers (PS) for photodynamic therapy of malignant tumors. Absorption and fluorescence spectral characteristics of the compounds, their storage stability in solutions under dark conditions and light exposure, photo-induced and dark cytotoxicity against human HEP2 tumor cells have been studied. It has been shown that the dyes with aminoamide substituents have an absorbtion maximum at 754±2 nm in the long wavelength region and they are not stable during storage (the specific fluorescence intensity decreased by 33-56% during 24 hours). The long wavelength region absorption of the propyl and carbohydrate substituted compounds varied in the range 780-831 nm, they were stable in solutions during storage and under light irradiation. Except the dye with a carbohydrate residue in the exocycle E, all PS exhibited the high photo-induced activity and low level of the dark cytotoxicity. The highest photo-induced cytotoxicity was observed for compounds with aminoamide substituents in the macrocyclic ring (IC₅₀ values ranged from 17 nM to 49 nM after 2 hour incubation with PS followed by exposure to the 10 J/cm² dose of red light). Taking into account the totality of the physico-chemical and biological properties, as well as manufacturability of production, *O*-propyloxime-*N*-propoxybacteriopurine dimethyl ester was chosen as the most promising candidate compound for further investigations.

Key words: bacteriochlorophyll *a*; bacteriochlorin; photodynamic therapy; photosensitizers; photo-induced activity *in vitro*; primary screening