

Copper complexes of chlorin derivatives of chlorophyll *a* as potential photosensitizers for medical purposes

D.V. Belykh,^{a@}, A.S. Kozlov,^b Y.I. Pylina,^c I.S. Khudyaeva,^a A.S. Benditkis,^b A.A. Krasnovsky^{b@}

^a*Institute of Chemistry of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomayskaya st., 48, Syktyvkar, 167000, Russia*

^b*Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp., 33, b. 2, Moscow, 119071, Russia*

^c*Institute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Kommunisticheskaya st., 28, Syktyvkar, 167982, Russia*

@Corresponding authors E-mails: belykh-dv@mail.ru (a@), phoal@mail.ru (b@)

*The absorption and fluorescence properties, singlet oxygen photosensitization and photoinduced cytotoxic activity in the HeLa cells line were investigated for copper complexes of chlorins (methylpyropheophorbide *a* and exocycle-free 13-amide derivatives of chlorin *e*₆ dimethyl ether) obtained by chemical modification of chlorophyll *a*. The results are compared with the properties of metal-free analogs. It is shown that both copper complexes and metal free chlorins generate singlet oxygen under photoexcitation in solutions and show distinct phototoxicity in living cells. The photosensitizing effect of copper complexes is 4-13 times smaller, but remains rather high. According to the biological experiments, the activity of copper complexes is sufficient for photodynamic killing of HeLa cells. At the same time, the dark toxicity of copper complexes is lower than that of metal free chlorins. These data allow us to consider copper complexes of chlorins as a new class of photosensitizers, potentially suitable for the use in PDT.*

Keywords: copper complexes, chlorin *e*₆, pyropheophorbide *a*, chlorin *e*₆ derivatives, methylpheophorbide *a*, singlet oxygen generation, phototoxicity, *in vitro*

Медные комплексы хлоринов, производных хлорофилла *a*, как потенциальные фотосенсибилизаторы медицинского назначения

Д.В. Белых,^{a@} А.С. Козлов,^b Я.И. Пылина,^c И.С. Худяева,^a А.С. Бендикис,^b А.А. Красновский^{b@}

^a*Институт химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ул. Первомайская, 48, г. Сыктывкар, 167000, Республика Коми, Россия*

^b*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Ленинский пр. 33, стр. 2, г. Москва, 119071, Россия*

^c*Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, ул. Коммунистическая, 28, г. Сыктывкар, 167982, Республика Коми, Россия*

@Corresponding author E-mails: belykh-dv@mail.ru (a@), phoal@mail.ru (b@)

*Исследованы абсорбционные и флуоресцентные свойства медных комплексов и безметалльных аналогов некоторых хлоринов, полученных при химической модификации хлорофилла *a* (комплексы метилпирофеофорбида *a* и не содержащих экзоцикла 13-амидных производных диметилового эфира хлорина *e*₆), а также их способность генерировать синглетный кислород и фотоиндуцировать токсическую активность по отношению к клеткам линии HeLa. Установлено, что медные комплексы, как и безметалльные хлорины, генерируют синглетный кислород при фотовозбуждении в растворах и обладают выраженной фототоксичностью в клетках. Эффективность фотосенсибилизирующего действия медных комплексов хлорина в 4-13 раз меньше, но остается достаточно высокой. Согласно биологическим экспериментам, активность медных комплексов достаточна для фотодинамического уничтожения клеток HeLa. При этом темновая токсичность медных комплексов меньше, чем у безметалльных аналогов. Эти свойства позволяют рассматривать медные комплексы хлоринов как новый класс фотосенсибилизаторов, потенциально пригодный для применения в ФДТ.*

Ключевые слова: комплексы меди, хлорин e_6 , пиррофеофорбид a , производные хлорина e_6 , метилпиррофеофорбид a , генерация синглетного кислорода, фототоксичность, *in vitro*

Введение

Реакции фотосенсибилизированного порфиринами окисления биологически важных соединений (фотодинамическое действие) активно используются в медицине для лечения (фотодинамической терапии, ФДТ) онкологических и инфекционных заболеваний.^[1-16] Обычно окисление является следствием активности синглетного кислорода, который генерируется триплетными молекулами фотосенсибилизаторов. В некоторых случаях триплетные молекулы способны окислять биосубстраты непосредственно, хотя в случае порфиринов вероятность такого процесса невелика.^[1,2] Показано, что эффективными фотодинамическими фотосенсибилизаторами служат безметалльные производные хлорофилла: феофитин a и феофорбид a , хлорин e_6 , хлорин p_6 и их комплексы с некоторыми металлами. Некоторые из соединений этой группы рекомендованы для клинического применения в ФДТ (фоскан, фотодитазин, фотолон, радахлорин)^([1-16] и указанные там ссылки). Комплексы хлоринов с медью систематически не исследовались с этой точки зрения, так как известно, что время жизни триплетного состояния медь-содержащих порфиринов на порядки меньше, чем у безметалльных аналогов,^[17-19] что приводит к существенному снижению эффективности генерации синглетного кислорода.^[4,18,19] Тем не менее, имеются работы, в которых показано, что Сумезопорфирин сохраняет способность к умеренной генерации синглетного кислорода при фотовозбуждении в аэробных растворах.^[15,16] Предварительные данные о способности медного комплекса хлорина e_4 фотосенсибилизировать образование синглетного кислорода были описаны в работе.^[20] Однако приведенные в ней результаты не вполне убедительны, так как использованные авторами препараты медных комплексов, судя по спектрам поглощения и флуоресценции, содержали не менее 30% примеси безметалльных хлоринов и, возможно, их агрегированные димерные формы. Мы полагаем, что в такой системе достоверно выявить генерацию синглетного кислорода именно медными комплексами крайне трудно, тем более, что авторы работы не привели убедительных экспериментальных доказательств в пользу своего предположения^[20]. Поэтому, по нашему мнению, вопрос о фотосенсибилизирующей способности медных комплексов хлоринов по существу остался открытым.

Кроме того, следует отметить, что при выборе фотосенсибилизаторов важна не только высокая фотосенсибилизирующая активность, но и низкая темновая токсичность фотосенсибилизатора.^[2] Ранее было показано, что внедрение катиона меди в координационную сферу производных хлорофилла a – хлоринов a -ряда может заметно снижать темновую токсичность этих соединений.^[21] В связи с этим изучение медных комплексов этих хлоринов представляет интерес с точки зрения возможности их использования в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов медицинского назначения. Первичную оценку перспективности фотосенсибилизаторов можно выполнить на основе результатов изучения их способности генерировать синглетный кислород при действии света и оказывать фототоксическое действие на клетки (в культуре). Высокий выход фотогенерации синглетного кислорода означает, что фотосенсибилизатор имеет активное триплетное состояние, которое способно окислять биомолекулы, как через промежуточное участие реакционно-способного синглетного кислорода, так и в результате прямой реакции с окисляемым субстратом с образованием свободных радикалов^([1] и указанные там ссылки). Наличие фототоксичности, проявляющейся в экспериментах с культурами клеток, свидетельствует о способности соединения взаимодействовать с клеточными структурами и вызывать их повреждение. В настоящей работе исследованы спектральные свойства медных комплексов некоторых хлоринов, полученных при химической модификации хлорофилла a (рис. 1), их способность генерировать синглетный кислород, а также фотоиндуцированная токсическая активность этих соединений по отношению к клеткам линии HeLa. Как было отмечено выше, внедрение катиона меди в координационную сферу хлорина влияет на спектральные, фотохимические и биологические свойства соединения, поэтому исследование медных комплексов хлоринов (**Cu-1-Cu-3**) проведено в сравнении с соответствующими безметалльными аналогами (**1-3**). Поскольку наличие или отсутствие экзоцикла влияет на изучаемые свойства,^[15,16] для исследования были взяты соединения с экзоциклом в молекуле (метилпиррофеофорбид a (**1**) и его комплекс с медью (**Cu-1**)) и производные хлорина e_6 (**2**, **Cu-2**, **3**, **Cu-3**), не имеющие экзоцикла.

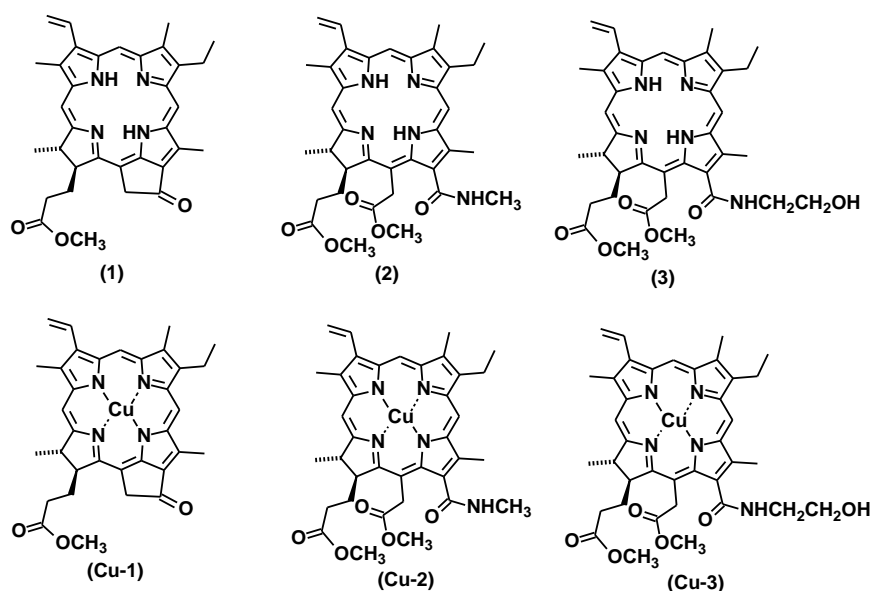


Рисунок 1. Структурные формулы исследованных соединений: (1) метилпиреофобрид *a*; (2, 3) – не содержащие экзоцикла 13-амидные производные диметилового эфира хлорина *e*₆; (Cu-1), (Cu-2) и (Cu-3) – медные комплексы этих соединений.

Экспериментальная часть

Соединения (1, 2) и соответствующие медные комплексы (Cu-1, Cu-2) были синтезированы согласно.^[22,23] Производное хлорина *e*₆ (3) было синтезировано согласно.^[24]

Cu-13-N-2-гидроксиэтиламид 15, 17 диметилловый эфир хлорина e₆ К раствору 73.1 мг исходного лиганда (3) в 15 мл хлороформа добавили 365.6 мг ацетата меди, растворенного в 15 мл метилового спирта. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Образование продукта реакции контролировали методом ТСХ на пластинках Sorbfil, элюэнт – смесь ССl₄ с ацетоном 2 к 1 по объему. Реакционную смесь разбавляли хлороформом (50 мл), промывали водой от избытка ацетата меди, сушили безводным Na₂SO₄ и полученный раствор упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток после упаривания хроматографировали на силикагеле (элюэнт – смесь ССl₄ с ацетоном в объемных соотношениях от 50 к 1 до 1 к 1). Получили 47.4 мг (60%) Cu-3. ИК спектр (SpecordM-80, KBr), см⁻¹: 1734 (νC=O, сложный эфир), 1634 (“амид-I”), 1595 (“хлориновая полоса”), 1562 (“амид-II”). ЭСП см. табл. 1. (Thermo Finnigan LCQ Fleet, ESI) m/z: вычислено для M⁺ (C₃₈H₄₃CuN₅O₆): 728.3, найдено: 728.7.

В качестве растворителя при исследовании спектральных свойств и способности генерации синглетного кислорода был использован ацетон (Химмед, РФ, ОСЧ). Спектры поглощения измерены на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО Спектр, РФ) в квадратных 1 см кварцевых кюветках. Спектры флуоресценции измеряли с помощью компьютеризированного спектрофлуориметра Perkin Elmer MPF-44B, который позволяет регистрировать спектры флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции образцов.

Для исследования генерации синглетного кислорода пигментами использовали два метода. Один основан на регистрации фотосенсибилизированной хлоринами ИК флуоресценции синглетного кислорода при 1270 нм на собранном в Институте биохимии им. А.Н. Баха (ФИЦ Биотехнологии РАН) флуоресцентном спектрометре.^[25,26] Возбуждение флуоресценции осуществлялось светодиодом с максимумом полосы излучения 405 нм и полушириной этой полосы 30 нм. Частота повторения импульсов 3-10 кГц,

длительность вспышки 2 мкс. Флуоресценцию регистрировали фотоумножителем (ФЭУ-112), охлаждаемого парами жидкого азота до -30°C через набор из трех интерференционных светофильтров 1230, 1270 и 1310 нм. Сигнал фотоумножителя через предусилитель поступал на компьютерный счетчик фотонов, синхронизированный с импульсом светодиода. Спектрометр позволял оценивать спектр излучения и измерять кинетику затухания флуоресценции путем накопления сигнала после неограниченного числа возбуждающих вспышек методом многоканального счета фотонов. Обычно время накопления сигнала не превышало 30 мин. Средняя мощность возбуждающего света составляла около 8 мВт.

Другой использованный нами метод регистрации синглетного кислорода основан на измерении скорости фотосенсибилизированного окисления ловушки синглетного кислорода 1,3-дифенилизобензофурана (ДФИБФ). Модификация этого метода, примененная в настоящей работе подробно описана в работах.^[25, 27-29] Максимум спектра поглощения ДФИБФ в ацетоне лежит при 414 нм. В области 500-700 нм ДФИБФ полос поглощения не имеет. В результате реакции ДФИБФ с синглетным кислородом образуются бесцветные продукты, не имеющие полос поглощения в видимом диапазоне спектра. О скорости образования синглетного кислорода судили по убыли оптической плотности в области максимума поглощения ДФИБФ.

Квантовые выходы генерации синглетного кислорода исследуемыми соединениями определяли относительным методом. В качестве соединений-стандартов использовали феналенон при флуоресцентных измерениях и мезо-тетрафенилпорфирин (ТФП), при измерениях с ДФИБФ. Согласно литературным данным, наиболее вероятное значение квантового выхода генерации синглетного кислорода для ТФП в ацетоне составляет 0.70±0.05 для феналенона – 0.95±0.05^[25-27] и указанные там ссылки). Оба метода дали близкие результаты.

Однако при использовании флуоресцентных измерений возбуждение пигментов осуществлялось относительно широкополосным светодиодом с максимумом спектра излучения при 405 нм, который соответствовал области поглощения пигментов и стандарта, но не совпадал с максимумами спектральных полос, что затрудняло расчеты и снижало точность определения квантового выхода.

При использовании химической ловушки (ДФИБФ) растворы облучали светом ксеноновой лампы, проходящим через монохроматор флуориметра Perkin Elmer MPF-44B. Длина волны света, которым облучались пробы, соответствовала максимумам длинноволновой полосы каждого исследуемого соединения (для соединений (1-3) – 662 нм, для комплекса (Cu-1) – 650 нм, для комплексов (Cu-2, Cu-3) – 632 нм, для ТФП – 515 нм). Спектральная ширина щели монохроматора соответствовала 5 нм в опытах с соединениями (1-3) и стандартом и 15 нм в опытах с соединениями (Cu-1-Cu-3). Концентрацию ДФИБФ в пробе подбирали так, чтобы его оптическая плотность в области максимума поглощения до освещения составляла 0.9-1.1. Как указывалось, при освещении наблюдали падение плотности в максимуме поглощения ДФИБФ, тогда как оптическая плотность хлоринов за время освещения не изменялась.

Результаты и обсуждение

Спектры поглощения и флуоресценции. Спектры поглощения метилпирофеофорбида *a* и других хлоринов показаны, на рис. 2,3. Положение спектральных максимумов показано на рис. 2 и 3 и в табл. 1. Из рисунков видно, что максимумы главных спектральных полос хлоринов (2, 3) смещены в коротковолновую сторону по сравнению с метилпирофеофорбидом *a* (1). Введение меди приводит к сильному длинноволновому смещению полосы Sore и коротковолновому смещению “красной” полосы по сравнению с безметалльными макроциклами.

Безметалльные макроциклы обладают сильной флуоресценцией с примерно одинаковыми квантовыми выходами и главным максимумом при 666-673 нм (рис. 2, 3), спектры возбуждения которой совпадают со спектрами поглощения соединений (не показано). В растворах медных комплексов обнаруживалась очень слабая флуоресценция, интенсивность которой при равной оптической плотности растворов в области возбуждения примерно в 1000 раз слабее, чем у безметалльных аналогов. Спектр этой флуоресценции во всех случаях совпадал со спектром флуоресценции безметалльного аналога. Оценка положения полосы Sore в спектре возбуждения показала, что она находится в области 405-410 нм, т.е. также соответствует безметалльным аналогам. Флуоресценцию, соответствующую по спектру возбуждения медным комплексам обнаружить не удалось. Из этих данных следует, что медные комплексы сами практически не флуоресцируют, но растворы этих комплексов содержат примесь около 0.1% безметалльных аналогов.

Фотосенсибилизирующее действие хлоринов. Как видно из рис. 4, при освещении растворов безметалльных макроциклов и их медных комплексов в ацетоне возникает ИК флуоресценция синглетного кислорода. Спектр этого свечения одинаков в растворах всех хлоринов. Четко выраженный максимум наблюдается в области 1270 нм (рис. 4, диаграмма 3). Кинетики затухания флуоресценции синглетного кислорода в растворах безметалльных соединений (рис.

Мощность возбуждающего света измеряли с помощью прибора ThorLabs PM-100D с сенсорной головкой S120VC (ThorLabs, USA). Расчет квантовых выходов производили, используя программу MS Excel и формулы, указанные в работах.^[27-29]

Для биологических испытаний в работе были использованы раковые клетки шейки матки линии HeLa, которые культивировали в питательной среде DMEM/F12 (PAA Laboratories GmbH, Austria), содержащей 10% сыворотки крови эмбрионов телят (FBS) (Thermo Scientific HyClone, UK), без добавления антибиотиков при 37°C и 5% CO₂. Темновая и фотоиндуцированная токсическая активность соединений была исследована согласно^[21, 30, 31].

4, кривая 1) и их медных комплексов (рис. 4, кривая 2) при возбуждении вспышками светодиода (при концентрации хлоринов – менее 5 мкМ) также одинаковы. Они хорошо аппроксимируются экспонентами со временем затухания около 50 мкс (рис. 4, кривая 4), что соответствует времени жизни синглетного кислорода в ацетоне. В растворах медных комплексов (Cu-1-Cu-3) фосфоресценция синглетного кислорода примерно на порядок слабее, чем в растворах безметалльных хлоринов (1-3). Этот факт с одной стороны, свидетельствует о снижении квантового выхода генерации синглетного кислорода в растворах медных комплексов, а с другой стороны, показывает, что наблюдаемая фосфоресценция синглетного кислорода определяется фотосенсибилизирующим действием именно медных комплексов, и не связана с примесью безметалльных соединений. Действительно, как следует из измерений флуоресценции, остаточное количество безметалльного хлорина в растворах медных комплексов, составляет только 0.1%.

Эксперименты по фотосенсиблированному окислению ловушки синглетного кислорода (ДФИБФ) (Рис. 5) подтверждают этот вывод. Как показано на рисунке, при облучении хлоринов в смеси с ДФИБФ красным светом, соответствующим по длине волны главному максимуму поглощения хлоринов, наблюдали быстрое выцветание полосы поглощения ДФИБФ при 414 нм. При этом выцветания хлоринов не наблюдали. Скорость фотовыцветания линейно зависела от интенсивности действующего света и замедлялась при добавлении тушителя синглетного кислорода α -токоферола. Фотосенсибилизирующее действие проявляли как безметалльные макроциклы, так и их комплексы с медью. В согласии с результатами фосфоресцентных измерений, применение ловушки показывает, что фотосенсибилизирующее действие медных комплексов хлоринов выражено примерно на порядок слабее. При этом генерация синглетного кислорода медными комплексами не связана с примесью безметалльных хлоринов, содержание которых примерно на два порядка меньше выхода синглетного кислорода.

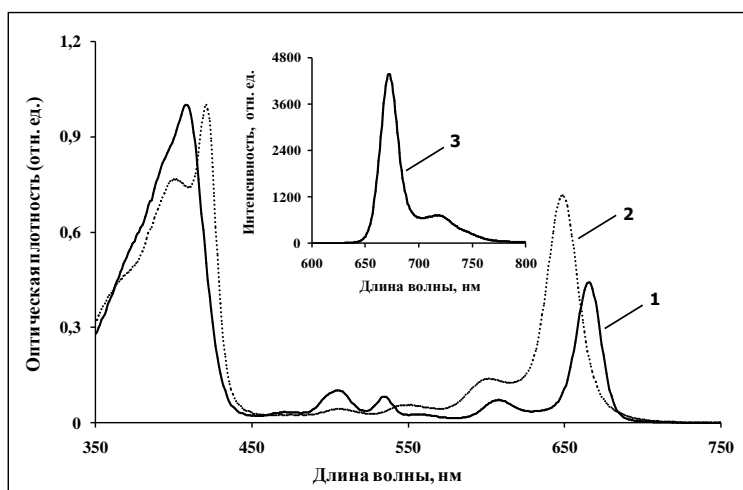


Рисунок 2. Нормированные по оптической плотности в максимумах полосы Сорэ спектры поглощения соединений (1) (кривая 1) и (Cu-1) (кривая 2) в ацетоне. Главные максимумы кривой 1 – 408 и 666 нм; главные максимумы кривой 2 – 421 и 649 нм. Кривая 3 – спектр флуоресценции соединения (1) (главный максимум – 673 нм) при длине волны возбуждения 408 нм.

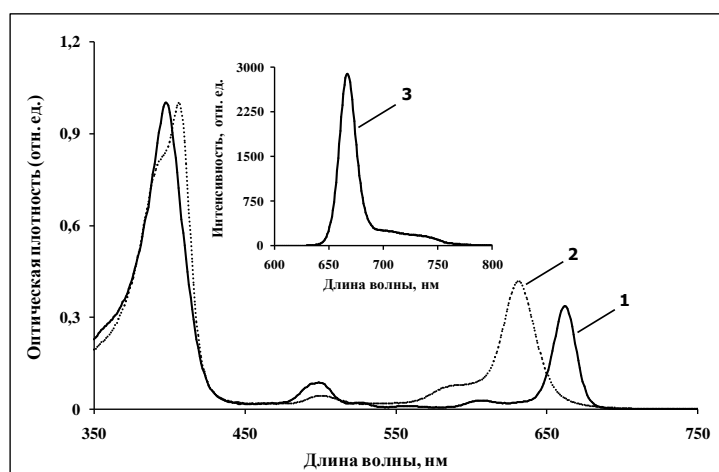


Рисунок 3. Нормированные по оптической плотности в максимумах полосы Сорэ спектры поглощения соединений (3) (кривая 1) и (Cu-3) (кривая 2) в ацетоне. Главные максимумы кривой 1 – 398 и 662 нм; главные максимумы кривой 2 – 406 и 631 нм. Кривая 3 – спектр флуоресценции соединения (3) (главный максимум – 667 нм) при длине волны возбуждения 400 нм. Аналогичные спектры поглощения и флуоресценции были получены при исследовании соединений (2) и (Cu-2) (не показаны).

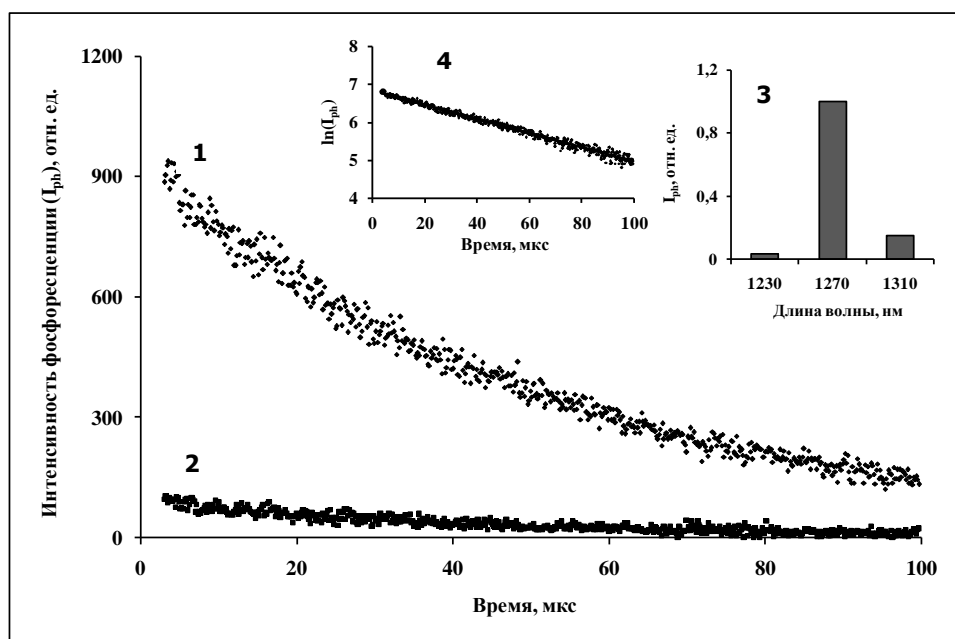


Рисунок 4. Кинетика затухания (1, 2) и спектр (3) фотосенсибилизированной флуоресценции синглетного кислорода при возбуждении импульсами светодиода растворов безметалльного хлорина (3) (кривая 1) и его комплекса с медью (Cu-3) (кривая 2) в ацетоне; (4) – кривая 1 в полулогарифмическом масштабе. Длина волны возбуждающего света 405 нм, длительность вспышки 2 мкс, частота повторения вспышек 10 кГц, средняя мощность возбуждающего света 7.6 мВт, время накопления сигнала – 30 мин. Измерено в кювете толщиной 5 мм. Оптическая плотность растворов пигментов составляла около 1.0 в максимуме излучения светодиода.

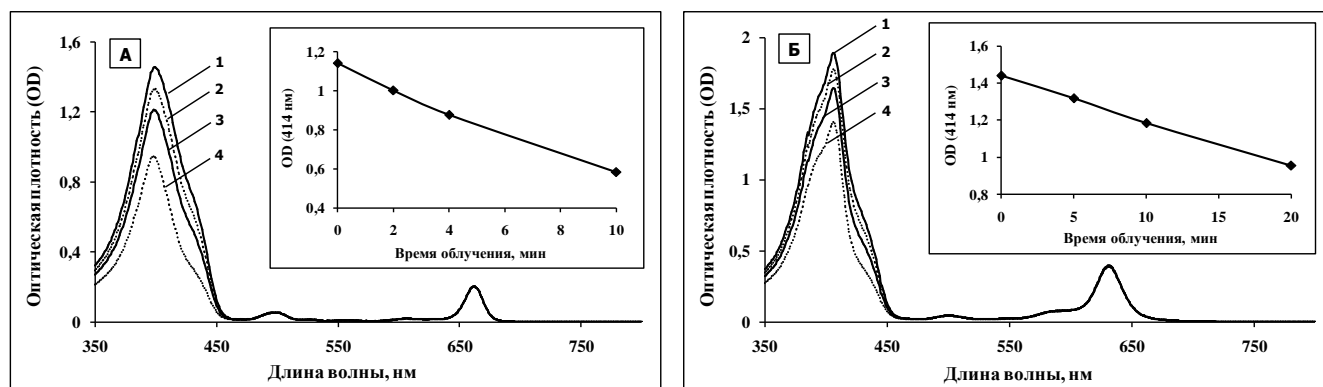


Рисунок 5. Изменение спектра поглощения ДФИБФ (кривые 1-4) в смеси соединения 3 и ДФИБФ (А) и в смеси Cu-3 и ДФИБФ (Б) в ацетоне при фотовозбуждении хлоринов. Для А – длина волны возбуждающего излучения – 662 нм, мощность – 79 мВт. Для Б – длина волны возбуждающего излучения – 632 нм, мощность – 272 мВт. Во врезке показана кинетика падения оптической плотности ДФИБФ в максимуме поглощения 414 нм.

Таблица 1. Спектральные характеристики, фотохимические свойства и биологическая активность хлоринов и комплексов меди на их основе.

Соединение	Максимумы поглощения в ацетоне, нм	Квантовые выходы генерации синглетного кислорода	IC ₅₀ , мкмоль/л при освещении (светодиоды, λ = 660±20 нм)	IC ₅₀ , мкмоль/л темновая
1	408, 506, 535, 608, 666	0.65	1.42±0.16	> 100
Cu-1	400, 421, 507, 551, 602, 649	0.17	13.32±2.07	> 100
2	398, 498, 607, 662	0.72	0.025±0.003	4.01±0.80
Cu-2	406, 502, 632	0.055	0.22±0.02	7.90±1.32
3	398, 499, 607, 662	0.74	0.047±0.002	5.63±0.49
Cu-3	406, 500, 631	0.055	0.28±0.03	13.16±1.04

Примечание. Погрешность определения квантовых выходов мы оцениваем величиной $\pm 5\%$ [24,26-28]. IC_{50} – концентрация, при которой выживает 50% клеток после темнового или фотоиндуцированного воздействия вещества.

Таким образом, эксперименты с ловушкой и фосфоресценцией синглетного кислорода убедительно показывают, что как хлорины без металла, так и соответствующие медные комплексы генерируют синглетный кислород при фотовозбуждении. Эффективность фотосенсибилизирующего действия медных комплексов хлоринов при этом гораздо меньше.

Измерение квантовых выходов генерации синглетного кислорода хлоринами. Как указано в разделе «Экспериментальная часть», квантовые выходы генерации синглетного кислорода исследуемыми соединениями определяли относительным методом. Качественно результаты обоих методов хорошо соответствовали друг другу.

Количественные измерения квантового выхода были выполнены с помощью ловушки – ДФИБФ. Расчет квантового выхода (ϕ_{Δ}) производили, используя программу MS Excel и следующую формулу:

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta St} \cdot \frac{\Delta D_{chl} \cdot t_{irrSt} \cdot I_{St} \cdot (1 - 10^{-D_{St}}) \cdot \lambda_{St}}{\Delta D_{St} \cdot t_{irrChl} \cdot I_{Chl} \cdot (1 - 10^{-D_{Chl}}) \cdot \lambda_{Chl}},$$

где $\phi_{\Delta St}$ – квантовый выход генерации синглетного кислорода соединением-стандартом; ΔD_{chl} – средняя убыль оптической плотности ДФИБФ в экспериментах с исследуемым хлорином, ΔD_{St} – средняя убыль оптической плотности ДФИБФ в экспериментах со стандартом, t_{irrchl} – длительность облучения смеси ДФИБФ с исследуемым соединением в секундах, t_{irrSt} – длительность облучения смеси ДФИБФ с соединением-стандартом (секунды), I_{chl} и I_{St} – интенсивности светового потока от ксеноновой лампы в экспериментах с исследуемым соединением и соединением-стандартом в мкВт, D_{chl} и D_{St} – оптические плотности исследуемого соединения и соединения-стандарта, соответствующие длинам волн возбуждающего света λ_{chl} и λ_{St} (в нм). Результаты суммированы в табл. 1.

Для оценки темновой и фотоиндуцированной токсичности исследуемых соединений в экспериментах на клетках линии HeLa определяли величину IC_{50} аналогично [21,30,31] (табл. 1). Было показано, что фотосенсибилизирующее действие оказывают не только безметалльные хлорины (1-3), что было ожидаемо, но и комплексы (Cu-1-Cu-3). В случае безметалльных хлоринов фотосенсибилизирующий эффект сопоставим с полученными нами ранее данными. [21,30,31] IC_{50} при инкубировании клеток в темноте превышает IC_{50} при освещении на два и более порядка. В случае комплексов (Cu-1-Cu-3) эффект несколько меньше, однако способность этих соединений оказывать фотосенсибилизирующее действие проявляется вполне отчетливо. Для (Cu-2) и (Cu-3) при освещении по сравнению с инкубированием в темноте происходит снижение IC_{50} , соответственно, в 36 и 47 раз (табл. 1) (в случае (Cu-1) подобное сравнение сделать не представляется возможным ввиду низкой темновой токсичности этого комплекса).

Поскольку, как показывают флуоресцентные измерения, примесь безметалльных хлоринов в препаратах медных комплексов (Cu-1-Cu-3) около 0.1%, можно заключить, что биологический эффект обусловлен именно комплексами меди. Обращает на себя внимание, что относительная фотодинамическая активность безметалльных и содержащих медь хлоринов на клетках HeLa и относительная активность этих соединений в фотосенсибилизации образования синглетного кислорода достаточно хорошо соответствуют друг другу (табл. 1). В обоих случаях различие составляет примерно один порядок величины. Поэтому есть основания предполагать, что именно способность генерировать синглетный кислород определяет фототоксичность медь-содержащих хлоринов в биологическом эксперименте.

Заключение

Таким образом, результаты изучения фотосенсибилизированного окисления ДФИБФ и фотоиндуцированной хлоринами ИК фосфоресценции синглетного кислорода показывают, что безметалльные хлорины (1-3) и их медные комплексы (Cu-1-Cu-3) генерируют синглетный кислород при фотовозбуждении. Эффективность фотосенсибилизирующего действия медных комплексов хлорина заметно меньше, но остается достаточно высокой. Биологические эксперименты показывают, что соединения (Cu-1-Cu-3) обладают выраженной фототоксичностью, которая достаточна для фотодинамического уничтожения клеток HeLa (IC_{50} при освещении для этих соединений более, чем на порядок ниже, чем без освещения). При этом темновая токсичность (Cu-1-Cu-3) по сравнению с безметалльными хлоринами невысока (IC_{50} повышается примерно в два раза при переходе от безметалльных хлоринов к соответствующим медным комплексам). Эти свойства медных комплексов хлоринов позволяют рассматривать их как новый класс фотосенсибилизаторов, потенциально пригодный для применения в ФДТ.

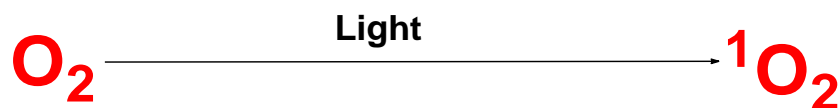
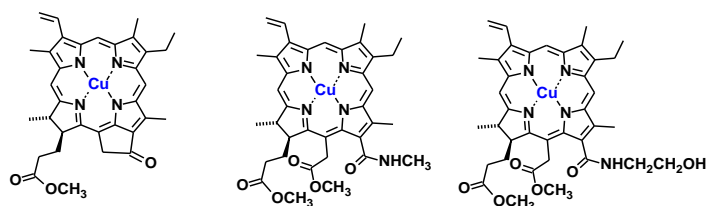
Благодарности. Работа выполнена в соответствии с госзаданием Института химии Коми научного центра Уральского отделения РАН (Сыктывкар) и ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва), а также при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-04-00331. Спектральные данные были получены при помощи оборудования ЦКП «Химия» Института химии Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар). Исследование цитотоксической активности проведено в ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар).

Литература

1. Красновский А.А. Синглетный кислород и первичные механизмы фотодинамической и лазерной терапии. В монографии: *Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии*. Под редакцией А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова, Москва: Издательство «Макс Пресс», 2015. т. 1. С. 173-217, ISBN 978-5-317-04920-1.
2. Странадко Е.Ф. *Фотодинамическая терапия*. В монографии: *Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии*. Под редакцией А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова, Москва: Издательство «Макс Пресс», 2015. т. 1. С. 218-263. ISBN 978-5-317-04920-1.
3. Красновский А.А., *Биофизика*, 1977, 22(5), 927-928.
4. Венедиктов Е.А., Красновский А.А., *Журнал прикладной спектроскопии* 1982, 36(1), 152-154.
5. Krasnovsky A.A., Jr., Neverov K.V., Egorov S.Yu., Roeder B., Levald T. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 1990, 5(2), 245-254.
6. Кочубеев Г.А., Фролов А.Л., Гуринович Г.П. *Химическая физика* 1989, 8, 1184-1190.
7. Frolov A.A., Zenkevich E.I., Gurinovich G.P. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 1990, 7(1), 43-56.
8. Zenkevich E., Sagun E., Knyukshto V., Mironov A., Efremova O., Bonnet R., Songca S.P., Kassem M. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 1996, 33, 171-180.
9. Bonnett R., Charlesworth P., Djelal B. D., Foley S., McGarvey D. J., Truscott T. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1999, 2, 325-328.
10. Parkhats M. V., Lapina V. A., Butorina D. N., Sobchuk A. N., Lepeshkevich S. V., Petrov P.T., Krasnovskii A. A., Dzhagarov B. M. *Opt. spektr.* 2005, 98, (5) 517-425.
11. Feofanov A., Sharonov G., Grichin A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Ruziyev R., Yakubovskaya R., Mironov A., Refregier M., Maurizot J-P, Vigny P. *Photochem. Photobiol.* 2004, 79, 172-188.
12. Mojzisoва H., Bonneau S., Maillard P., Berg K., Brault D. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2009, 8, 778-787.
13. M. V. Parkhats, V. A. Galievskii, E. S. Zharnikova E.S., Knyukshto V.N., Lepeshkevich S.V., Stasheuskii A.S., Trukhacheva T.V., Dzhagarov B.M. *J. Appl. Spectrosc. (Minsk)* 2011, 78, 299-306.
14. Belik V.P., Gadzhiev I.M., Semenova I.V., Vasyutinskii O.S. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2017, 178, 181-184.
15. Ormond A. B., Freeman H. S. *Materials* 2013, 6, 817-840.
16. Dąbrowski J. M., Arnaut L. G. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015, 14, 1765-1780.
17. Dongbo K., Holten D., Gouterman M. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 2793-2798.
18. Джагаров Б.М., Салохиддинов К.И. *Опт. Спектр.* 1981, 51, 841-847.
19. Джагаров Б.М., Гуринович Г.П. *Механизмы релаксационных процессов в молекулах хлорофилла и родственных соединений*. В кн. *Возбужденные молекулы. Кинетика превращений*. Ленинград: Издательство «Наука», 1982. С. 59-74.
20. Simaremare E.S., Djalil A.D., Tjahjono H.D. *Indonesian J. Pharm.* 2015, 26(1), 29-36.
21. Pylina Y. I., Shadrin D. M., Shevchenko O. G., Khudyaeva I. S., Belykh D. V., Velegzhaninov I. O. *Macroheterocycles* 2017, 10(3), 279-288.
22. Mazaletskaia L.I., Sheludchenko N.I., Tarabukina I.S., Belykh D.V. *Petroleum Chemistry* 2014, 54, 309-315.
23. Тарабукина И.С., Пылина Я.И., Велегжанинов И.О., Старцева О.М., Шадрин Д.М., Белых Д.В. *Бутлеровские сообщения* 2015, 43(7), 18-23.
24. Белых Д.В., Карманова Л.П., Спирихин Л.В., Кучин А.В. *Журнал органической химии* 2007, 43(1), 120-128.
25. Krasnovsky A.A., Kozlov A.S. *Journal of Biomedical Photonics and Engineering* 2017, 3(1), 010302: 1-10 (DOI: 10.18287/JBPE17.03.010302).
26. Красновский А.А., Бендикис А.С., Козлов А.С., *Биохимия* 2019, 84, 240-251.
27. Krasnovsky A.A., Jr., Kozlov A.S., Roumbal Ya.V., *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012, 11(6), 988-997 (DOI: 10.1039/c2pp05350k)
28. Красновский А.А., Козлов А.С. *Биофизика*, 2014, 59(2), 250-257.
29. Krasnovsky A.A., Jr., Kozlov A.S. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 2016, 329, 167-174.(DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.06.026>)
30. Mal'shakova M. V., Pylina Y. I., Frolova L. L., Alekseev J. H., Patov S. A., Shadrin D. M., Kuchin A. V., Velegzhaninov I. O., Belykh D.V. *Macroheterocycles* 2016, 9(3), 238-243.
31. Pylina Y. I., Shadrin D. M., Shevchenko O. G., Startseva O. M., Velegzhaninov I. O., Belykh D. V., Velegzhaninov I. O. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(1), 103 (DOI: 10.3390/ijms18010103).

Graphical abstract and Summary for Content

It is shown that copper complexes of chlorins obtained by chemical modification of chlorophyll *a*, generate singlet oxygen upon photoexcitation and cause photodamage of HeLa cells.



Показано, что медные комплексы хлоринов, полученных путем химической модификации хлорофилла *a*, при фотовозбуждении генерируют синглетный кислород и вызывают фотоповреждение клеток линии HeLa.

D.V. Belykh, A.S. Kozlov, Y.I. Pylina, I. S. Khudyaeva, A.S. Benditkis, A. A. Krasnovsky

Copper complexes of chlorin derivatives of chlorophyll *a* as potential photosensitizers for medical purposes

◆

Д.В. Белых, А.С. Козлов, Я.И. Пылина, И.С. Худяева, А.С. Бендиткис, А.А. Красновский

Медные комплексы хлоринов, производных хлорофилла *a*, как потенциальные фотосенсибилизаторы медицинского назначения