

Темновая и фотоиндуцированная цитотоксичность производных хлорофилла *a* и их аналогов по отношению к клеткам HeLa: некоторые закономерности «структура-активность»

Я. И. Пылина,^a И. С. Худяева,^b Д. В. Бельх^{b@}

^aИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, 167982 Сыктывкар, Республика Коми, Россия

^bИнститут химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, 167000 Сыктывкар, Республика Коми, Россия

@E-mail: belykh-dv@chemi.komisc.ru, belykh-dv@mail.ru

*В настоящей работе систематически исследована темновая и фотоиндуцированная цитотоксичность ряда производных хлорофилла *a* (выборка 36 соединений, количественная мера токсичности – выживаемость клеток HeLa и величина IC₅₀) в экспериментах *in vitro*. Показано, что хлорины без экзоцикла, такие как, хлорин *e*₆, его 15,17-диметилловый эфир и 13-амидные производные вне зависимости от заместителя при 13-амидном атоме азота, а так же заместителей в положениях 3, 15 и 17 обладают, как правило, наибольшей цитотоксичностью (IC_{50(темн)} < 10 мкмоль/л). Установлено, что величина IC₅₀ при темновом воздействии большинства форбиновых производных более 10 мкмоль/л, а наличие на периферии макроцикла форбинового производного полярных заместителей, таких как карбоксильная группа и 1,2-дигидроксиэтильный заместитель, приводит к повышению токсичности (IC_{50(темн)} < 10 мкмоль/л). Подавляющее большинство исследованных производных хлорофилла *a* оказывают выраженное фотодинамическое действие на клетки HeLa при концентрации 1 мкмоль/л. Более подробное исследование соединений с разной темновой токсичностью показало, что высокими значениями IC_{50(темн)/IC_{50(фото)} обладают вещества как с высокой, так и с низкой темновой токсичностью, поэтому эффективность фотосенсибилизатора не связана однозначно с его низкой темновой токсичностью.}*

Ключевые слова: Хлорин *e*₆, производные хлорофилла *a*, фотосенсибилизатор, цитотоксичность, *in vitro*, клетки HeLa.

Dark and Photoinduced Cytotoxicity of Chlorophyll *a* Derivatives and Their Analogues towards HeLa Cells: Some Structure - Activity Relationships

Y. I. Pylina,^a I. S. Khudyaeva,^b and D. V. Belykh^{b@}

^aInstitute of Biology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 167982 Syktyvkar, Russian Federation

^bInstitute of Chemistry of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 167000 Syktyvkar, Russian Federation

@Corresponding author E-mail: belykh-dv@chemi.komisc.ru, belykh-dv@mail.ru

*In the present work, we have systematically studied the dark and photoinduced cytotoxicity of a series of chlorophyll *a* derivatives (a sampling of 36 compounds, the quantitative measure of toxicity is HeLa cell survival and IC₅₀ value) in experiments *in vitro*. It has been shown that chlorins without an exocycle, such as chlorin *e*₆, its 15,17-dimethyl ether and 13-amide derivatives, regardless of the substituent at the 13-amide nitrogen atom, as well as substituents in positions 3, 15 and 17, as a rule, have the highest cytotoxicity (IC_{50(dark)} < 10 μM). It has been established that the IC₅₀ value during the dark exposure is more than 10 μM for the most part of phorbins derivatives, and the presence of polar substituents, such as carboxyl group and 1,2-dihydroxyethyl substituent, on the periphery of the phorbins macrocycle leads to an increase in toxicity (IC_{50(dark)} < 10 μM). Most of the investigated*

derivatives of chlorophyll a shows an apparent photodynamic effect on HeLa cells at a concentration of 1 μM. A more detailed study of compounds with different dark toxicity showed that substances with both high and low dark toxicity have high IC_{50(dark)}/IC_{50(photo)} values, so the effectiveness of the photosensitizer is not unambiguously associated with its low dark toxicity.

Keywords: Chlorin *e₆*, chlorophyll *a* derivatives, photosensitizer, cytotoxicity, *in vitro*, HeLa cells.

Введение

В настоящее время ряд порфириновых соединений используется в клинической практике в качестве диагностических препаратов и фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний.^[1-9] Высокоактивные ФС с низкой темновой токсичностью были выявлены и среди производных хлорофилла *a*.^[1-6, 8-29] В связи с этим поиск новых ФС в этой группе соединений имеет большие шансы на успех, а изучение механизма их действия и выявление закономерностей «структура-активность» представляет интерес с точки зрения прогнозирования фотодинамической активности соединений при планировании синтеза потенциальных ФС.^[1-3,21,28-32] Варьирование химической структуры хлоринов, влияющее на заряд, гидрофобность и стерические свойства, существенно изменяет способность пигментов проникать в клетку, что может определять их фотодинамическую эффективность.^[33-34] Различное расположение одностепенных заместителей на периферии макроцикла тоже существенно влияет на фотодинамическую активность ФС.^[26,35-37] Среди направлений, в которых проводится оптимизация структуры и свойств противоопухолевых ФС на основе производных хлорофилла *a*, одним из наиболее значимых является снижение темновой токсичности потенциального ФС. Решению этой задачи может способствовать информация о влиянии природы периферических заместителей на цитотоксичность производных хлорофилла *a*. В настоящей работе выполнена оценка темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности производных хлорофилла *a* по отношению к клеткам линии HeLa в экспериментах *in vitro* и выявлен характер влияния периферических заместителей макроцикла на цитотоксичность.

Экспериментальная часть

Спектры ¹H ЯМР записывали в CDCl₃ на спектрометре «Bruker Avance III» (рабочая частота 300 МГц). Электронные спектры были записаны на спектрометре UV-1700 (PharmaSpec) фирмы SHIMADZU с диапазоном длин волн 200 – 1100 нм. Съемку образцов проводили в кварцевых кюветках толщиной 10 мм. Образец сравнения – хлороформ. Контроль за ходом реакций осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Silufol, элюент – CCl₄-ацетон 4 : 1 по объему. Для колонной хроматографии использовали силикагель производства Alfa Aesar 70/230μ.

Метилпирофеофорбид а (1), 13(1)-N-метиламид-15(2),17(3)-диметиловый эфир хлорина e₆ (14), 13(1)-N,N-диметиламид 15(2),17(3) диметиловый эфир хлорина e₆ (18) получали согласно.^[38]

13(2)-Дигексиламид метилфеофорбида а (2), 13(2)-диоктиламид метилфеофорбида а (3), 13(2)-дибутиламид метилфеофорбида а (5) получали согласно.^[39]

13(2)-Бутиламид метилфеофорбида а (4) получали согласно.^[40]

Метиловый эфир 13(2)-N,N-диметиламинофеофорбид а (6), 13(1)-N-(н-бутил)-амид 15(2),17(3) диметиловый эфир хлорина e₆ (15), 13(1)-N-(н-гексил)-амид 15(2),17(3)-диметиловый эфир хлорина e₆ (19), 13(1)-N-(н-октил)-амид 15(2),17(3)-диметиловый эфир хлорина e₆ (20), 3(1),3(2)-бис-(N,N-диметиламинометил)хлорин e₆ 13(1)-N-этиламид-15(2),17(3)-диметиловый эфир (31), 17(3)-метиловый эфир 13-N,N-диметиламинокарбонил-15-(1-метоксикарбонилвинил)хлорина e₆ (36) получали согласно.^[41]

Мезометилфеофорбид а (13) получали согласно.^[42]

Феофорбид а (7), пирофеофорбид а (8), метилфеофорбид d (12), хлорин e₆ (30) и диметиловый эфир протопорфирина IX (33) получали согласно.^[43]

3(1),3(2)-Дигидроксиэтил-3-дезвинил-метилпирофеофорбид а (10), 3(1),3(2)-дигидроксиэтил-3-дезвинил-метилфеофорбид а (11), 13(1)-дезоксозометил-пирофеофорбид а (35), 13(1)-N-морфолиниламид-15(2),17(3)-диметиловый эфир (32), мезо-13(1)-N-метиламид-15(2),17(3)-диметиловый эфир 3(1),3(2)-бис-(N,N-диметиламинометил)-хлорина e₆ (27), 13(1)-N-диметиламинометил-13(1)-N-метиламид-15(2),17(3)-диметиловый эфир мезохлорина e₆ (28) получали согласно.^[44]

13(1)-N-(2-Гидроксиэтил)амид 15(2),17(3)-диметиловый эфир хлорина e₆ (16), 13(1)-N-морфолиниламид 15(2),17(3)-диметиловый эфир хлорина e₆ (22) получали согласно.^[45]

13(1),17(3)-N,N'-(2-Гидроксиэтил)-диамид-15-метиловый эфир хлорина e₆ (25) и 13(1),15(2),17(3)-N,N',N''-(2-гидроксиэтил)триамид хлорина e₆ (26) получали согласно,^[46] *метоксим метилпирофеофорбида а (9)* - согласно.^[47]

15(2)-N,N-Дибутиламид хлорина e₆ (23) получали согласно.^[48]

13(1)-N-Метиламид 15(2)-метиловый эфир хлорина e₆ (24) получали согласно.^[49]

13(1)-N,N-Диметиламид 15(2),17(3)-диметиловый эфир мезохлорина e₆ (29). К раствору 60 мг (0,099 ммоль) метилмезофеофорбида *a* (13) (получен согласно^[41]) в 3 мл хлороформа добавляли 0,5 мл 33 % водного раствора диметиламина (примерно 3,3 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре до полного расходования исходного соединения (ТСХ). Реакционную смесь разбавляли 50 мл хлороформа, промывали водой (3×100 мл), полученный раствор сушили безводным Na₂SO₄ и упаривали при пониженном давлении при температуре 30–40 °С. Продукт реакции выделяли при помощи колонной хроматографии на силикагеле (элюент: смесь CCl₄ с ацетоном 10:1 по объему) и пересаждали из хлороформа с пентаном. Получили 35 мг (54 %) амида **29** в виде темного сине-зеленого кристаллического порошка. ЭСП (CHCl₃) λ нм: 652 (35%), 611 (5%), 558 (3%), 530 (7%), 504 (14%), 404 (100 %). Масс-спектр (ESI) *m/z*: для [МН⁺] (C₃₈H₄₈N₅O₅) вычислено 654,4, найдено 654,7. ¹H ЯМР (CDCl₃, 300 МГц) δн м.д. (смесь атропоизомеров 3 к 2, «/» разделены сигналы преобладающего и минорного изомера, отличающиеся по хим. сдвигу): 9.74/9.72 с (1H, 10-H), 9.53/9.50 с (1H, 5-H), 8.79/8.74 с (1H, 20-H), 15-CHN_A: 5.88 д (1H, J=19.1 Гц) / 5.72 д (1H, J=19.1 Гц); 15-CHN_B: 5.06 д (1H, J=19.1 Гц) / 5.15 д (1H, J=19.1 Гц); 4.55-4.42 м (1H, 18-H), 17-H: 4.39 уш. д (1H, J=9.5 Гц) / 4.55-4.42 м (1H), 4.01-3.76 м

(4H, 3-CH₂CH₃, 8-CH₂CH₃), 3.84/3.79 с (3H, 15-CH₂CO₂CH₃), 3.67/3.64 с (3H, 17-CH₂CH₂CO₂CH₃), 3.53/3.52 с (3H, 12-CH₃), 3.50/3.54 с (3H, 7-CH₃), 3.42/3.41 с (3H, 2-CH₃), 13-CON(CH₃)₂: 3.38/3.37 с (3H) и 2.78/3.14 с (3H); 17-CH₂CH₂CO₂CH₃: 2.67-2.47 м (1H), 2.44-2.05 м (2H), 2.03-1.88 м (2H); 1.80 т (6H, *J*=7.4 Гц, 3-CH₂CH₃, 8-CH₂CH₃), 18-CH₃: 1.69 д (3H, *J*=6.6 Гц)/1.75 д (3H, *J*=6.6 Гц), -1.71/-1.59 уш. с (1H, III-NH), -1.80/-1.63 уш. с (1H, I-NH).

Получение соединений 17, 21 и 34. Раствор 86.0 мг (0.144 ммоль) хлорина e₆ (**30**) в смеси 50 мл метанола с 2.5 мл серной кислоты (46.8 ммоль) оставляли в темноте при комнатной температуре на 12 ч. Реакционную смесь разбавляли хлороформом (100 мл), промывали водой до нейтральной реакции промывных вод, полученный раствор сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали досуха. Остаток после упаривания хроматографировали на силикагеле (элюент CCl₄:ацетон, от 50:1 до 5:1 по объему). Получили 15.1 мг (17 %) целевого продукта **17**. Кроме того, было выделено 6.6 мг (8 %) диметилового эфира изохлорина e₄ (**21**) и 2.7 мг (4 %) порфирина **34**.

Хлорин e₆ 15,17-диметилловый эфир (17) - черно-синий кристаллический порошок. ЭСП (CHCl₃) λ нм: 666 (29 %), 610 (4 %), 558 (3 %), 532 (6 %), 502 (10 %), 404 (100 %), 275 (30 %). ¹H ЯМР (CDCl₃, 300 МГц) δ_H м.д.: 9.69 с (1H, 10-H), 9.55 с (1H, 5-H), 8.75 с (1H, 20-H), 8.08 дд (1H, *J*=18.0 и 11.4 Гц, 3-CH=CH₂), 6.39 д (1H, *J*=18 Гц, 3-CH=CH_{транс}), 6.18 д (1H, *J*=11.4 Гц, 3-CH=CH_{цис}), 5.53 д (1H, *J*=18.7 Гц, 15-CH_{Н_A}), 5.29 д (1H, *J*=18.7 Гц, 15-CH_{Н_B}), 4.47 к (1H, *J*=7.0 Гц, 18-H), 4.44 уш. д (1H, *J*=9.2 Гц, 17-H), 3.86 с (3H, 15-CH₂CO₂CH₃), 3.78 к (2H, *J*=7.4 Гц, 8-CH₂CH₃), 3.67 с (3H, 17-CH₂CH₂CO₂CH₃), 3.64 с (3H, 12-CH₃), 3.49 с (3H, 7-CH₃), 3.31 с (3H, 2-CH₃), 17-CH₂CH₂CO₂CH₃: 2.69-2.52 м (2H), 2.29-2.15 м (2H), 1.82 д (3H, *J*=7.0 Гц, 18-CH₃), 1.73 т (3H, *J*=7.4 Гц, 8-CH₂CH₃), -1.03 уш. с (1H, III-NH), -1.20 уш. с (1H, I-NH).

Изохлорин e₄ 15,17-диметилловый эфир (21) - черно-синий кристаллический порошок. ЭСП (CHCl₃) λ нм: 659 (27 %), 604 (2 %), 553 (1 %), 526 (2 %), 501 (9 %), 402 (100 %). Масс-спектр (ESI) *m/z*: для [МН⁺] (C₃₅H₄₁N₄O₄) вычислено 581.3, найдено 581.6. ЯМР ¹H (CDCl₃, 300 МГц) δ_H м.д.: 9.76 с (1H, 10-H), 9.75 с (1H, 5-H), 8.88 с (1H, 20-H), 8.83 с (1H, 13-H), 8.19 дд (1H, *J*=18.0 и 11.4 Гц, 3-CH=CH₂), 6.40 д (1H, *J*=18 Гц, 3-CH=CH_{транс}), 6.18 д (1H, *J*=11.4 Гц, 3-CH=CH_{цис}), 5.49 д (1H, *J*=16.6 Гц, 15-CH_{Н_A}), 5.36 д (1H, *J*=16.6 Гц, 15-CH_{Н_B}), 4.68 дд (1H, *J*=9.5 и 1.9 Гц, 17-H), 4.56 к (1H, *J*=7.3 Гц, 18-H), 3.87 к (2H, *J*=7.3 Гц, 8-CH₂CH₃), 3.76 с (3H, 15-CH₂CO₂CH₃), 3.66 с (3H, 17-CH₂CH₂CO₂CH₃), 3.65 с (3H, 12-CH₃), 3.56 с (3H, 7-CH₃), 3.39 с (3H, 2-CH₃), 17-CH₂CH₂CO₂CH₃: 2.70-2.55 м (1H), 2.53-2.39 м (1H), 2.26-2.13 м (1H), 2.09-1.93 м (1H), 1.78 т (3H, *J*=7.3 Гц, 8-CH₂CH₃), 1.77 д (3H, *J*=7.3 Гц, 18-CH₃), -1.96 уш. с (1H, III-NH), -2.08 уш. с (1H, I-NH).

Метилловый эфир филлопорфирина XV (34) - черно-фиолетовый кристаллический порошок. ЭСП (CHCl₃) λ нм: 663 (5 %), 635 (4 %), 582 (7 %), 565 (9 %), 523 (6 %), 415 (0.933 100 %), 275 (23 %). ЯМР ¹H (CDCl₃, 300 МГц) δ_H м.д.: 9.96, 9.86 и 9.82 (все с 1H, 5-H, 10-H и 20-H), 8.28 с (1H, 13-H), 8.12 дд (1H, *J*=18.0 и 12.1 Гц, 3-CH=CH₂), 6.29 д (1H, *J*=18 Гц, 3-CH=CH_{транс}), 6.18 д (1H, *J*=12.1 Гц, 3-CH=CH_{цис}), 4.43-4.15 м (1H, 17-CH₂CH₂CO₂CH₃), 4.13 с (3H, 17-CH₂CH₂CO₂CH₃), 4.02 к (2H, *J*=7.7 Гц, 8-CH₂CH₃), 4.01 с (3H), 3.92 с (3H), 3.60 с (3H), 3.56 с (6H: 2-CH₃, 7-CH₃, 12-CH₃, 15-CH₃, 18-CH₃); 3.20-3.10 м (2H, 17-CH₂CH₂CO₂CH₃), 1.83 т (3H, *J*=7.7 Гц, 8-CH₂CH₃), -4.05, -4.13 оба уш. с (1H, I-NH, III-NH).

Темновая цитотоксичность. Стоковые растворы тестируемых веществ получали путём растворения в ДМСО (Amresco, USA) в разных концентрациях. По 1 мкл стокового раствора соответствующей концентрации вносили в 199 мкл питательной среды, содержащей 5000 клеток HeLa в лунки стерильного культурального планшета. Конечные концентрации веществ составляли от 0.01 до 100 мкмоль/л (для скрининговых исследований концентрации 0.01, 0.1, 1.0, 10 и 100 мкмоль/л, при необходимости дополнительно определяли выживаемость

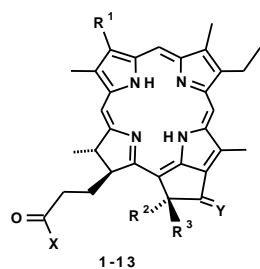
при концентрациях, близких к IC₅₀), а концентрация ДМСО 0.5 % (v/v). В контрольную суспензию добавляли чистый ДМСО в той же концентрации. Клетки с тестируемыми веществами инкубировали 72 ч в темноте при 37 °С, 100 % влажности в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Затем удаляли питательную среду, промывали монослойную культуру 200 мкл раствора PBS. Добавляли 100 мкл раствора диацетата флуоресцеина (Sigma, USA) и инкубировали при 37 °С / 5 % CO₂ в течение 40 мин, после чего производили измерения интенсивности флуоресценции на анализаторе жидкости «Флюорат-02-Панорама» (ООО «Льюмэкс», Санкт-Петербург) при длине волны 485 (возбуждение) / 520 (регистрация) нм. Выживаемость клеток рассчитана, как отношение интенсивности флуоресценции клеток в лунке с веществом к интенсивности флуоресценции клеток в контрольной лунке (содержащей чистый ДМСО), выраженное в %. Эксперименты проводили в девятикратной повторности. IC₅₀ рассчитывали из уравнения зависимости концентрации соединения от выживаемости клеток, полученного в программе Microsoft Excel 2007; SE – стандартная ошибка. Выборки проверяли на наличие артефактов с помощью критерия Граббса. Факторный анализ осуществляли при помощи критерия Краскела-Уоллиса в программе R 4.03.

Фотоиндуцированную цитотоксичность соединений определяли аналогично.^[26] По 1 мкл стокового раствора соответствующей концентрации вносили в 199 мкл питательной среды, содержащей 5000 клеток HeLa в лунки стерильного культурального планшета. Конечные концентрации веществ составляли от 0.01 до 10 мкмоль/л, а концентрация ДМСО 0.5 % (v/v). Клетки с тестируемыми веществами инкубировали в течение 2 ч в темноте. Далее клетки подвергались действию света длиной волны 660 нм (источник света – светодиоды, λ=660 нм, величина световой экспозиции 12 Дж/см²) в течение 20 мин. Затем клетки снова инкубировали в темноте 69 ч 40 мин при 37 °С, 100 % влажности в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Далее как описано выше. Эксперименты проводили в девятикратной повторности.

Результаты и обсуждение

Для поиска новых потенциальных ФС для ФДТ онкологических заболеваний в настоящей работе исследована темновая цитотоксичность ряда производных хлорофилла *a* **1-36**, отличающихся следующими структурными параметрами: наличие/отсутствие экзоцикла в макроциклической молекуле (соответственно, макроциклы с форбиновым скелетом и аналоги хлорина e₆); вне зависимости от наличия экзоцикла – природа заместителей в положении 3; при наличии экзоцикла – природа заместителей в положениях 13(1) и 13(2) форбинового скелета; для аналогов хлорина e₆ (хлоринов без экзоцикла) – заместители в положениях 13, 15 и 17 (Схема 1, соединения **1-36**). Получение соединений **1-16**, **18-20**, **22-28**, **31-33** и **35**, **36** выполнено согласно методикам, описанным в литературе.^[38-50]

Для дополнения исследуемого ряда соединений были синтезированы соединения **17**, **21** и **34** (Схема 2). Для синтеза хлорина **17**, в положении 13 макроцикла которого вместо амидной находится карбоксильная группа, проводили этерификацию хлорина e₆ **30** действием метанола (катализатор – H₂SO₄). Как известно из литературы,^[50] карбоксильная группа в положении 13 макроцикла хлорина e₆ **30** в этих условиях не этерифицируется, что и позволило получить искомым продукт **17**. Помимо целевого продукта **17** из реакционной смеси колоночной хроматографией были выделены диметилловый эфир изохлорина e₄ **21** и порфирин **34** (Схема 2), которые в дальнейшем тоже были исследованы.



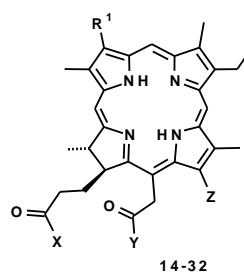
- $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = \text{OCH}_3$, $Y = \text{O}$
 1: $R^2 = R^3 = \text{H}$
 2: $R^2 = \text{CON}(\text{C}_6\text{H}_{13})_2$, $R^3 = \text{H}$
 3: $R^2 = \text{CON}(\text{C}_8\text{H}_{17})_2$, $R^3 = \text{H}$
 4: $R^2 = \text{CONHC}_4\text{H}_9$, $R^3 = \text{H}$
 5: $R^2 = \text{CON}(\text{C}_4\text{H}_9)_2$, $R^3 = \text{H}$
 6: $R^2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R^3 = \text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

- $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = \text{OH}$, $Y = \text{O}$
 7: $R^2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R^3 = \text{H}$
 8: $R^2 = R^3 = \text{H}$
 9: $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = \text{OCH}_3$, $Y = \text{NOCH}_3$,
 $R^2 = R^3 = \text{H}$

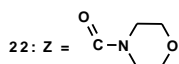
- $R^1 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$, $X = \text{OCH}_3$, $Y = \text{O}$
 10: $R^2 = R^3 = \text{H}$
 11: $R^2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R^3 = \text{H}$

- 12: $R^1 = \text{CHO}$, $X = \text{OCH}_3$, $Y = \text{O}$,
 $R^2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R^3 = \text{H}$

- 13: $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $X = \text{OCH}_3$, $Y = \text{O}$,
 $R^2 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $R^3 = \text{H}$



- $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = Y = \text{OCH}_3$
 14: $Z = \text{CONHC}_4\text{H}_9$, 15: $Z = \text{CONHC}_4\text{H}_9$,
 16: $Z = \text{CONHC}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 17: $Z = \text{COOH}$,
 18: $Z = \text{CON}(\text{CH}_3)_2$, 19: $Z = \text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$,
 20: $Z = \text{CONH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$, 21: $Z = \text{H}$,



- 23: $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = \text{OH}$, $Y = \text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_2$, $Z = \text{COOH}$
 24: $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = \text{OH}$, $Y = \text{OCH}_3$, $Z = \text{CONHC}_3$
 25: $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $Y = \text{OCH}_3$,
 $Z = \text{CONHC}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 26: $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = Y = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $Z = \text{CONHC}_2\text{CH}_2\text{OH}$

- $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $X = Y = \text{OCH}_3$
 27: $Z = \text{CONHC}_3$, 28: $Z = \text{CON}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$,
 29: $Z = \text{CON}(\text{CH}_3)_2$

- 30: $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $X = Y = \text{OH}$, $Z = \text{COOH}$

- $R^1 = \text{C}(\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)=\text{CH}(\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)$, $X = Y = \text{OCH}_3$

- 31: $Z = \text{CONHC}_2\text{CH}_3$, 32: $Z =$

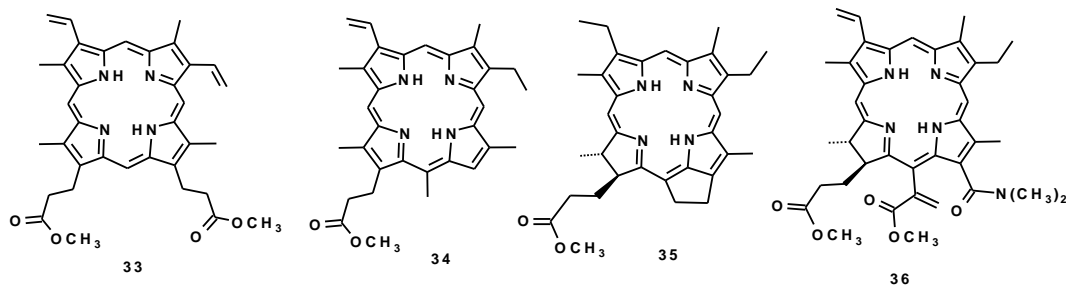


Схема 1.

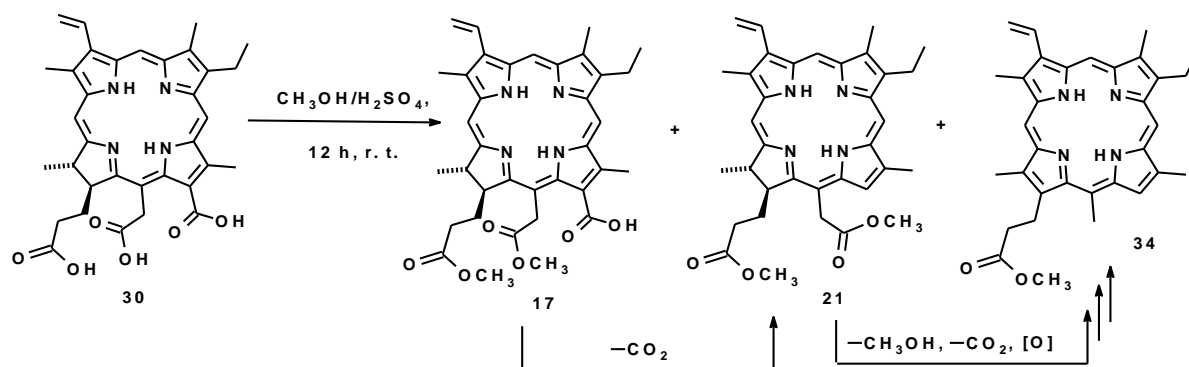


Схема 2.

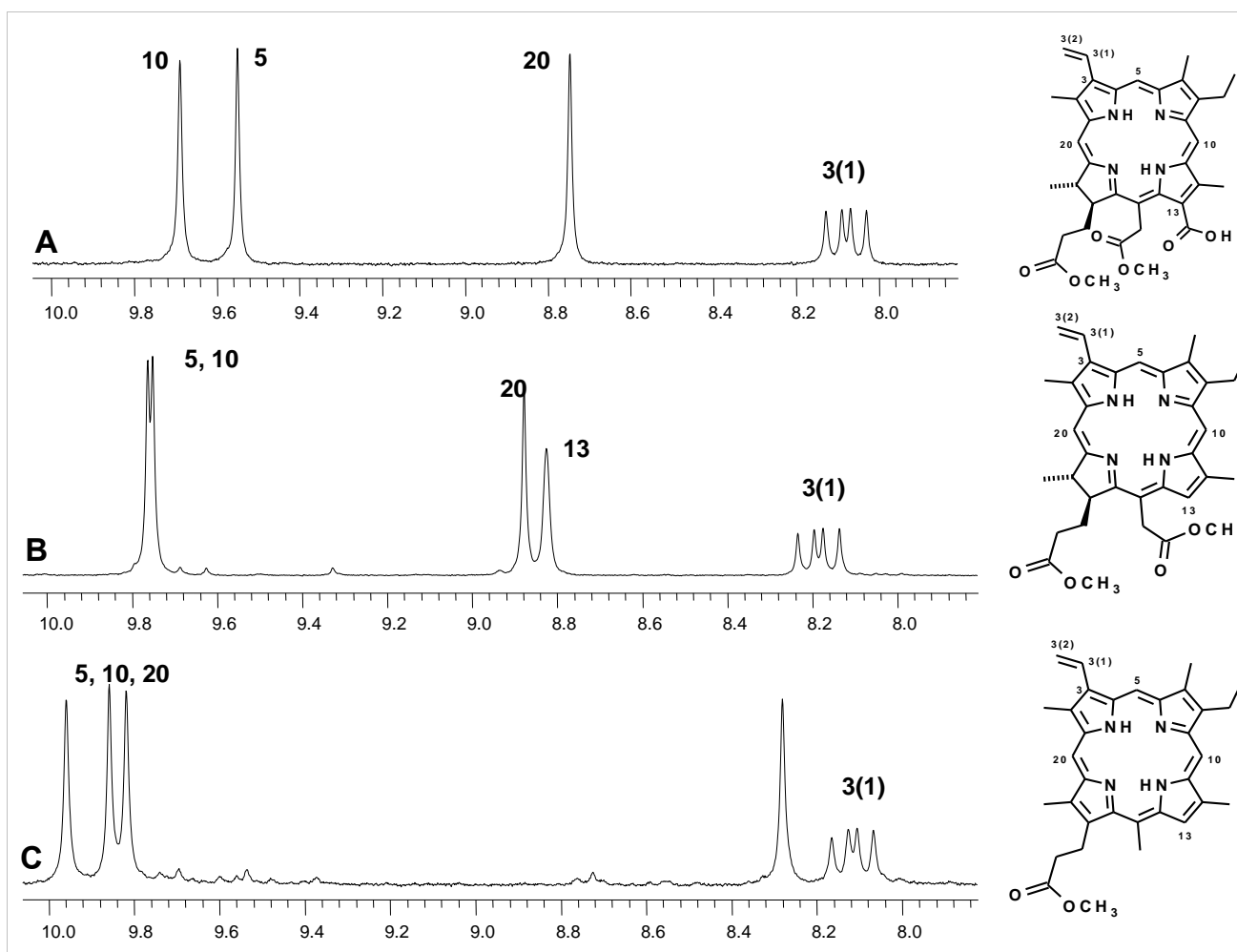


Рисунок 1. Спектры ^1H ЯМР порфиринов **17** (A), **21** (B) и **34** (C) (CDCl_3 , 300 МГц, область сигналов мезо-протонов).

Строение соединений **17**, **21** и **34** подтверждено данными ЯМР и электронной спектроскопии, а также масс-спектрометрии. Спектр ^1H ЯМР целевого продукта **17** полностью соответствует структуре 15,17-диметилового эфира хлорина e_6 (см. Экспериментальную часть). В спектре ^1H ЯМР соединения **21** наблюдается сигнал β -протона в положении 13, которое становится незамещенным после декарбоксилирования хлорина **17** (Рисунок 1). Остальные сигналы в спектре ^1H ЯМР **21** аналогичны сигналам в спектре соединения **17**. В спектре ^1H ЯМР порфирина **34** отсутствуют сигналы протонов в положениях 17 и 18, что свидетельствует об окислении хлоринового макроцикла в порфириновый. Об этом же свидетельствует и смещение сигналов внутрициклических протонов из области около -2 м.д. в сильное поле (-4.05 и -4.13 м.д.), а также смещение в слабое поле сигналов мезо-протонов, особенно сигнала протона в положении 20, окружение которого значительно меняется при переходе от хлоринового макроцикла к порфириновому (см. Рисунок 1). Образование диметилового эфира изохлорина e_4 **21** происходит при декарбоксилировании целевого продукта в условиях реакции.

Порфирин **34** образуется в небольших количествах, по всей видимости, из диметилового эфира изохлорина e_4 **21** при его декарбоксилировании и окислении.

В настоящей работе на темновую цитотоксичность на опухолевых клетках линии HeLa были протестированы производные хлорофилла a **1-36**, которые на периферии макроцикла содержат различные заместители. В качестве количественной меры цитотоксичности использовали выживаемость клеток и величину IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования роста клеток) (Таблица 1). При скрининговом исследовании темновой цитотоксичности исследовали действие соединений при концентрациях 0.01, 0.1, 1, 10, 100 мкмоль/л, что позволяет оценить токсичность при темновом воздействии ($\text{IC}_{50(\text{темн})}$) и разбить соединения на группы по темновой токсичности.

Полученные значения $\text{IC}_{50(\text{темн})}$ позволяют разделить все исследованные соединения на три группы: вещества с высокой ($\text{IC}_{50(\text{темн})} < 10$ мкмоль/л), средней ($\text{IC}_{50(\text{темн})}$ от 10 до 100 мкмоль/л) и низкой ($\text{IC}_{50(\text{темн})} > 100$ мкмоль/л) цитотоксичностью. Величина $\text{IC}_{50(\text{темн})}$ большинства порфириновых производных более 10 мкмоль/л.

Таблица 1. Значения $IC_{50(темн)} \pm SE$ (мкмоль/л) при темновом воздействии исследуемых соединений **1-36** на клетки линии HeLa.

Соединение	$IC_{50(темн)} \pm SE$, мкмоль/л*	Соединение	$IC_{50(темн)} \pm SE$, мкмоль/л
1	> 100 (58.86±2.01 %)	19	2.30±0.60
2	> 100 (79.72±5.10 %)	20	2.37±0.70
3	> 100 (96.44±5.73 %)	21	63.01±13.50
4	46.32±19.38	22	3.03±1.34
5	24.56±10.56	23	23.22±2.98
6	16.17±5.45	24	8.12±5.25
7	2.36±1.27	25	1.89±0.22
8	3.82±0.17	26	11.56±1.44
9	68.78±34.93	27	1.53±0.31
10	0.99±0.16	28	2.82±0.42
11	2.33±0.48	29	4.77±0.66
12	> 100 (57.76±1.86 %)	30	3.20±0.34
13	35.95±17.58	31	6.18±0.62
14	4.01±0.80	32	6.00±0.43
15	3.03±1.21	33	38.02±25.26
16	5.63±0.49	34	7.95±4.27
17	9.11±3.15	35	17.16±8.61
18	0.80±0.30	36	2.25±0.26

*При $IC_{50} > 100$ мкмоль/л в скобках указана доля выживших клеток при концентрации соединения 100 мкмоль/л.

Малотоксичными являются метилпирофеофорбид **1**, метилфеофорбид **12**, 13(2)-дигексил- и 13(2)-дио ктил амиды метилфеофорбида **2**, **3**). Повышение токсичности ($IC_{50(темн)} < 10$ мкмоль/л) наблюдается при наличии на периферии макроцикла форбинового производного полярных заместителей, таких как карбоксильная группа (**7**, **8**) и 1,2-дигидроксиэтильный заместитель (**10**, **11**). Повышение токсичности можно объяснить амфифильностью перечисленных производных при наличии на периферии гидрофобного форбинового макроцикла полярной группы. Хлорины без экзоцикла, такие как, хлорин **6** (**30**), его 15,17-диметиловый эфиры и 13-амидные производные вне зависимости от заместителя при 13-амидном атоме азота, а также заместителей в положениях 3 (этильная или аминотетилированная винильная группа вместо винильной), 15 и 17 (амидные группы) обладают, как правило, наибольшей цитотоксичностью ($IC_{50(темн)} < 10$ мкмоль/л). Исключение составляют 15-дibuтиламид хлорина **6** (**23**) с карбоксильной группой в положении 13 и диметиловый эфир изохлорина **4** (**21**), не содержащий заместителя в положении 13. Наличие экзоцикла в молекулах исследуемых соединений статистически значимо влияет на цитотоксичность ($p = 0.01422$).

Фотоиндуцированную цитотоксичность исследовали на клетках линии HeLa при концентрации производных хлорофилла **1** мкмоль/л. При этой концентрации исследуемые соединения практически не оказывают темнового цитотоксического действия. Подавляющее большинство исследованных в настоящей работе производных хлорофилла **1** дают достаточно выраженную фотоиндуцированную цитотоксическую активность (Таблица 2).

Соотношение $IC_{50(темн.)}/IC_{50(фото)}$ является информативной характеристикой, позволяющей оценить перспективность ФС для дальнейших исследований. Для определения этого соотношения были более подробно изучены некоторые соединения, отнесенные в разные группы по токсичности (низкотоксичные хлорины **1** и **12**, соединения **5** и **26** со средней токсичностью, и высокотоксичные производные **14**, **16** и **25**). Оказалось, что высокие значения $IC_{50(темн.)}/IC_{50(фото)}$ наблюдаются не только для низкотоксичных соединений **1** и **12**, но и для высокотоксичных веществ **14** и **16** (Таблица 3). Таким образом, высокие значения $IC_{50(темн.)}/IC_{50(фото)}$ не связаны однозначно с низкой темновой токсичностью соединения.

Таблица 2. Выживаемость клеток линии HeLa (при концентрации исследуемых соединений 1 мкмоль/л) при фотоиндуцированном и темновом (контроль) воздействии исследуемых соединений **1-36** (источник света – светодиоды, $\lambda=660$ нм, величина световой экспозиции 12 Дж/см²).

Соединение	Выживаемость клеток линии HeLa, %		Соединение	Выживаемость клеток линии HeLa, %	
	фото	контроль (темновая)		фото	контроль (темновая)
1	94.24±5.78	91.74±3.60	19	1.04±0.07	81.38±1.43
2	68.51±21.49	84.20±2.50	20	1.00±0.07	88.77±2.31
3	48.25±12.51	91.28±4.46	21	1.98±0.14	74.07±4.16
4	10.31±0.45	76.35±2.07	22	1.05±0.09	88.25±2.87
5	65.07±6.40	94.30±4.78	23	93.49±6.87	93.65±2.70
6	4.06±0.82	77.60±3.86	24	19.05±3.70	81.28±4.80
7	10.46±3.08	78.76±5.24	25	20.87±3.11	92.50±2.50
8	70.62±5.98	84.09±5.19	26	23.04±2.76	89.23±3.30
9	11.70±2.10	76.42±1.99	27	19.98±2.75	80.09±3.74
10	9.44±0.44	80.17±2.68	28	20.28±2.56	75.33±2.09
11	3.43±0.69	68.76±1.94	29	19.16±2.99	83.07±2.17
12	25.10±4.18	85.55±3.42	30	96.39±4.52	80.78±4.99
13	19.37±2.99	83.78±2.39	31	1.07±0.07	81.68±2.34
14	3.55±0.80	90.95±3.54	32	1.15±0.10	85.4±1.69
15	9.68±0.50	85.33±1.84	33	25.65±4.26	71.96±2.10
16	1.24±0.11	74.11±1.81	34	2.61±0.18	79.58±2.12
17	25.54±2.48	88.12±1.75	35	3.59±0.66	65.41±2.93
18	1.67±0.12	77.72±3.26	36	1.85±0.14	75.59±1.93

Таблица 3. Значения IC₅₀ (мкмоль/л) для темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности исследуемых производных хлорофилла *a* в эксперименте на линии клеток HeLa (источник света – светодиоды, $\lambda=660$ нм, величина световой экспозиции 12 Дж/см²), значения IC_{50(темн)}/IC_{50(фото)}.

Соединение	IC ₅₀ ±SE _(темн) , мкмоль/л	IC ₅₀ ±SE _(фото) , мкмоль/л	IC _{50(темн)} /IC _{50(фото)}
1	> 100	1.42±0.16	> 70
5	24.56±10.56	1.61±0.37	15
12	> 100	0.25±0.02	> 400
14	4.01±0.80	0.025±0.003	160
16	5.63±0.49	0.047±0.002	119
25	1.89±0.22	0.22±0.06	8
26	11.56±1.44	2.70±0.22	4

Заклучение

Таким образом, в настоящей работе систематически исследована темновая и фотоиндуцированная цитотоксичность ряда производных хлорофилла *a* в экспериментах *in vitro* и выявлен ряд тенденций влияния строения соединений на их цитотоксичность. Полученные в настоящей работе значения IC₅₀ при темновом воздействии (IC_{50(темн)}) производных хлорофилла *a* поз-

воляют разделить исследованные соединения на три группы: вещества с высокой (IC_{50(темн)} < 10 мкмоль/л), средней (IC_{50(темн)} от 10 до 100 мкмоль/л) и низкой (IC_{50(темн)} > 100 мкмоль/л) цитотоксичностью. Соединения с IC_{50(темн)} < 10 мкмоль/л вероятно можно рассматривать как потенциальные темновые цитотоксические агенты. Менее токсичные производные перспективны для дальнейшего исследования в качестве ФС. Хлорины без экзоцикла, такие как, хлорин *e*₆ **30**, его 15,17-диметиловый

эфир и 13-амидные производные вне зависимости от заместителя при 13-амидном атоме азота, а также заместителей в положениях 3 (этильная или аминометилированная винильная вместо винильной), 15 и 17 (амидные группы) обладают, как правило, наибольшей цитотоксичностью ($IC_{50(темн)} < 10$ мкмоль/л). Величина $IC_{50(темн)}$ большинства форбиновых производных более 10 мкмоль/л. Повышение токсичности ($IC_{50(темн)} < 10$ мкмоль/л) наблюдается при наличии на периферии макроцикла форбинового производного полярных заместителей, таких как карбоксильная группа (**7, 8**) и 1,2-дигидроксиэтильный заместитель (**10, 11**). Подавляющее большинство исследованных в настоящей работе производных хлорофилла *a* дают достаточно выраженное фотодинамическое действие на клетки HeLa при концентрации 1 мкмоль/л. Более подробное исследование некоторых соединений с разной темновой токсичностью показало, что высокими значениями $IC_{50(темн)}/IC_{50(фото)}$ могут обладать вещества как с низкой, так и с высокой собственной токсичностью. Поэтому эффективность ФС не связана однозначно с его низкой темновой токсичностью.

Благодарности. Спектральные исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Химия» Института химии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Исследования биологической активности выполнены с применением оборудования ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Работа выполнена в рамках государственных заданий Института химии ФИЦ Коми научного центра Уральского отделения РАН (Сыктывкар) № 122040600073-3 и ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар) № 122040600024-5.

Список литературы

References

1. Abrahamse H., Hamblin M.R. *Biochem. J.* **2016**, 473(4), 347–364.
2. Van Straten D., Mashayekhi V., de Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J. *Cancers* **2017**, 9, 19.
3. Koifman O.I., Ageeva T.A., Beletskaya I.P., Averin A.D., Yakushev A.A., Tomilova L.G., Dubinina T.V., Tsivadze A.Yu., Gorbunova Yu.G., Martynov A.G., Konarev D.V., Khasanov S.S., Lyubovskaya R.N., Lomova T.N., Korolev V.V., Zenkevich E.I., Blaudeck Th., von Borczyskowski Ch., Dietrich I., Zahn R.T., Mironov A.F., Bragina N.A., Ezhov A.V., Zhdanova K.A., Stuzhin P.A., Pakhomov G.L., Rusakova N.V., Semenishyn N.N., Smola S.S., Parfenyuk V.I., Vashurin A.S., Makarov S.V., Dereven'kov I.A., Mamardashvili N.Zh., Kurtikyan T.S., Martirosyan G.G., Burmistrov V.A., Aleksandriiskii V.V., Novikov I.V., Pritmov D.A., Grin M.A., Suvorov N.V., Tsigankov A.A., Fedorov A.Yu., Kuzmina N.S., Nyuchev A.V., Otvagin V.F., Kustov A.V., Belykh D.V., Berezin D.B., Solovieva A.B., Timashev P.S., Milaeva E.R., Gracheva Yu.A., Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Shpakovsky D.B., Syrbu S.A., Gubarev Yu.A., Kiselev A.N., Koifman M.O., Lebedeva N.Sh., Yurina E.S. *Macroheterocycles* **2020**, 13, 311–467.
4. Ormond A.B., Freeman H.S. *Materials* **2013**, 6(3), 817–840.
5. Nazarova A.I., Feofanov A.V., Sharonov G.V., Karmakova T.A., Plyutinskaya A.D., Yakubovskaya R.I., Lebedeva V.S., Mironov A.F., Maurizot J.-C., Vigny P. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2005**, 31, 482–494.

6. Nechaev A.V., Mironov A.F. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2008**, 34, 245–251.
7. Kustov A.V., Privalov O.A., Strelnikov A.I., Koifman O.I., Lubimtshev A.V., Morshnev Ph.K., Moryanova T.M., Kustova T.V., Berezin D.B. *J. Clin. Med.* **2022**, 11, 233.
8. Zamilatskov I.A., Savinkina E.V., Volov A.N., Grigoriev M.S., Lonin I.S., Obolenskaya L.N., Ponomarev G.V., Koifman O.I., Kuzovlev A.S., Kuzmicheva G.M., Tsivadze A.Yu. *Macroheterocycles* **2012**, 5, 308–314.
9. Lyapina E.A., Larkina E.A., Tkachevskaya E.P., Mironov A.F., Machneva T.V., Osipov A.N. *Biophysica* **2010**, 55, 296–300.
10. Osati S., Ali H., Guérin B., van Lier J.E. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2017**, 21, 701–730.
11. Kustov A.V., Kustova T.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. *Dyes Pigm.* **2020**, 173, 107948.
12. Li G., Slansky A., Dobhal M.P., Goswami L.N., Graham A., Chen Y., Kanter P., Alberico R.A., Sperryak J., Morgan J., Mazurchuk R., Oseroff A., Grossman Z., Pandey R.K. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 32–42.
13. Chen Y., Gryshuk A., Achilefu S., Ohulchansky T., Potter W., Zhong T., Morgan J., Chance B., Prasad P.N., Henderson B.W., Oseroff A., Pandey R.K. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1264–1274.
14. Pandey S.K., Sajjad M., Chen Y., Pandey A., Missert J.R., Batt C., Yao R., Nabi H.A., Oseroff A.R., Pandey R.K. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 274–282.
15. Glowacka-Sobotta A., Wrotyński M., Kryjewski M., Sobotta L., Mielcarek J. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, 23, 1–10.
16. Mojzisova H., Bonneau S., Vever-Bizet C., Brault D. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, 1768, 2748–2756.
17. Machneva T.V., Lokmatov A.V., Shevtsova I.S., Larkina E.A., Tkachevskaya E.P., Mironov A.F., Vladimirov Iu.A., Osipov A.N. *Biofizika* **2012**, 57, 274–285.
18. Garcia G., Sol V., Lamarche F., Granet R., Guilloton M., Champavier Y., Krausz P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3188–3192.
19. Karmakova T., Pankratov A., Kazachkina N., Yakubovskaya R., Feofanov A., Nazarova A., Lebedeva V., Ruziyev R., Mironov A., Maurizot J.-C., Vigny P. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2006**, 82, 28–36.
20. Aggarwal A., Samaroo D., Jovanovic I.R., Singh S., Tuz M. P., Mackiewicz M.R. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, 23, 741–765.
21. Chen Y., Zheng X., Dobhal M.P., Gryshuk A., Morgan J., Dougherty T. J., Oseroff A., Pandey R.K. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3692–3695.
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. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4306–4318.
23. Gurinovich G.P., Zorinab T.E., Melnov S.B., Melnova N.I., Gurinovich I.F., Grubina L.A., Sarzhevskaya M.V., Cherenkevich S.N. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, 13, 51–57.
24. Isakau H.A., Parkhats M.V., Knyukshto V.N., Dzhagarov B.M., Petrov E.P., Petrov P.T. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2008**, 92, 165–174.
25. Galindev O., Badraa N., Shim Y.K. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, 11, 829–835.
26. Pylina Y.I., Shadrin D.M., Shevchenko O.G., Startseva O.M., Velezhaninov I.O., Belykh D.V., Velezhaninov I.O. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 103.
27. Nazarova A., Ignatova A., Feofanov A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Yakubovskaya R., Mass O., Grin M., Mironov A., Maurizot J.-C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, 6, 1184–1196.
28. Singh S., Aggarwal A., Bhupathiraju N.V.S.D.K., Arianna G., Tiwari K., Drain C.M. *Chem. Rev.* **2015**, 115(18), 10261–10306.
29. Lovell J.F., Tracy W.B., Liu, Chen J., Zheng G. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2839–2857.

30. Pandey S.K., Gryshuk A.L., Sajjad M., Zheng X., Chen Y., Abouzeid M.M., Morgan J., Charamisinau I., Nabi H.A., Oseroff A., Pandey R.K. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6286–6295.
31. Gryshuk A., Chen Y., Goswami L.N., Pandey S., Missert J. R., Ohulchansky T., Potter W., Prasad P.N., Oseroff A., Pandey R.K. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1754–1767.
32. Osterloh J., Vicente M.G.H. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, *6*, 305–324.
33. Gurinovich G.P., Zorina T.E., Arkatov Yu.M. et al. *Cytology* [Гуринович Г.П., Зорина Т.Е., Аркатов Ю.М., Саржевская М.В., Черенкевич С.Н. *Цитология*] **1989**, *31*, 1058–1062.
34. Fomichev Yu.A., Zorin V.P., Zorina T.E., Cherenkevich S.N. *Microbiology* [Фомичев Ю.А., Зорин В.П., Зорина Т.Е., Черенкевич С.Н. *Микробиология*] **1991**, *60*, 507–511.
35. Chen H., Humble S. W., Waruna Jinadasa R. G., Zhou Z., Nguyen A. L., M. Vicente G. H., Smith K. M. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2017**, *21*, 354–363.
36. Jinadasa R., Hu X., Vicente M., Smith K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*(21), 7464–7476.
37. Pylina Y.I., Khudyaeva I.S., Startseva O.M., Shadrin D.M., Shevchenko O.G., Velegzhaninov I.O., Kukushkina N.V., Berezin D.B., Belykh D.V. *Macroheterocycles* **2021**, *14*, 317–322.
38. Belykh D.V., Tarabukina I.S., Matveev Yu.S., Kuchin A.V. *Zh. Obshch. Khim.* [Белых Д.В., Тарабукина И.С., Матвеев Ю.С., Кучин А.В. *Журнал общей химии*] **2007**, *77*, 1218–1225.
39. Belykh D.V., Korylov E.A., Gruzdev I.V., Kuchin A.V. *Zh. Org. Khim.* [Белых Д.В., Копылов Е.А., Груздев И.В., Кучин А.В. *Журнал органической химии*] **2010**, *46*, 584–592.
40. Belykh D.V., Pushkareva E.I. *Zh. Obshch. Khim.* [Белых Д.В., Пушкарева Е.И. *Журнал общей химии*] **2011**, *81*(6), 1023–1028.
41. Belykh D.V., Tarabukina I.S., Gruzdev I.V., Kodess M.I., Kutchin A.V. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2009**, *13*, 949–956.
42. Kenner G.V., Mac Combie S.W., Smith K.M. *J. Chem. Soc. Percin Trans* **1973**, *1*, 2517–2523.
43. *Porphyrins: Structure, Properties, Synthesis* (Ениколопян N.S., Ed.), Moscow: Nauka, **1985**. 334 p. [*Порфирины: структура, свойства, синтез* (Ениколопян Н.С., ред.), М.: Наука, **1985**. 334 с.].
44. Belykh D.V., Shevchenko D.V., Tarabukina I.S. *Macroheterocycles* **2014**, *7*, 79–87.
45. Belykh D.V., Karmanova L.P., Spirikhin L.V., Kutchin A.V. *Mendeleev Commun.* **2002**, *12*, 77–78.
46. Belykh D.V., Karmanova L.P., Spirikhin L.V., Kutchin A.V. *Zh. Org. Khim.* [Белых Д.В., Карманова Л.П., Спирихин Л.В., Кучин А.В. *Журнал органической химии*] **2007**, *43*, 120–128.
47. Belykh D.V., Tarabukina I.S., Gruzdev I.V., Kutchin A.V. *Macroheterocycles* **2010**, *3*, 145–149.
48. Belykh D.V., Khudyaeva I.S. *Macroheterocycles* **2018**, *11*, 273–276.
49. Tulaeva L.A., Belykh D.V., Yakovkeva N.M. et al. *Chem-ChemTech* [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.] [Тулаева Л.А., Белых Д.В., Яковлева Н.М., Селькова И.А., Рочева А.В., Кучин А.В. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*] **2006**, *49*(4), 82–87.
50. Gurinovich G.P., Sevchenko A.N., Solov'ev K.N. *Spectroscopy of Chlorophyll and Related Compounds*. Minsk, **1968**. 518 p. [Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьев К.Н. *Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений*. Минск: Наука и техника, **1968**. 518 с.].

Received 03.02.2022

Accepted 01.03.2022