

На правах рукописи

Плотникова Екатерина Александровна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ, ПОГЛОЩАЮЩИХ В БЛИЖНЕЙ ИК-
ОБЛАСТИ СПЕКТРА, ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2017 год

Работа выполнена в Московском научно-исследовательском онкологическом институте имени П.А. Герцена – филиале федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Якубовская Раиса Ивановна**

Официальные оппоненты:

Ипатова Ольга Михайловна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»;

Странацко Евгений Филиппович, доктор медицинских наук, профессор, академик ЛАН РФ, руководитель отделения лазерной онкологии и фотодинамической терапии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр лазерной медицины Федерального медико-биологического агентства»

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.047.02 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125284, г. Москва, 2-ой Боткинский проезд, дом 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (125284, г. Москва, 2-й Боткинский проезд, дом 3) и на сайте www.mnloi.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор биологических наук

Елена Романовна Немцова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Одним из динамично развивающихся методов лечения злокачественных новообразований является фотодинамическая терапия (ФДТ), основанная на накоплении в опухолевой ткани введенного в организм фотосенсибилизатора (ФС), действие которого активируется локальным световым облучением и сопровождается генерированием активных форм кислорода, вызывающих гибель опухолевых клеток. В последние годы ФДТ показала свою перспективность в лечении поверхностных злокачественных новообразований кожи, головы и шеи, легких и бронхов, толстой и тонкой кишки, пищевода, желудка, предстательной железы, мочевого пузыря, молочных желез, шейки матки и др.

ФДТ является малоинвазивным методом, легко переносится больными, не приводит к серьезному травмированию тканей и органов, обеспечивая их функциональную сохранность, и не вызывает образования косметических дефектов. Однако выбор официальных препаратов для ФДТ как в мире, так и в России в настоящее время ограничен производными порфирина, хлорина и фталоцианина, которые имеют поглощение в области 630 – 685 нм, где проницаемость биологических тканей незначительна. Успешное применение метода ФДТ для лечения малых и больших, но поверхностных, новообразований стимулирует поиск новых ФС с улучшенными свойствами, имеющих поглощение в дальней красной и ближней ИК областях спектра. Использование подобных красителей позволяет воздействовать на пораженную ткань на глубине более 15 мм и открывает возможности для лечения более объемных и опухолей.

В настоящее время поиск новых структур для создания высокоэффективного фотосенсибилизатора проводится среди соединений бактериохлоринового ряда. Однако большинство из них имеет ограниченную растворимость в водных растворах, эти соединения, как правило, нестабильны при хранении и неустойчивы фотохимически, поскольку легко окисляются. Для решения этих проблем, а также для увеличения избирательности фотодинамического действия этого класса красителей проводятся разнообразные модификации их структур путем введения различных заместителей или ионов металлов, создания наноструктурированных, мицеллярных и липосомальных дисперсий, а также конъюгатов с векторными молекулами.

Настоящая работа посвящена поиску высокоэффективной субстанции бактериохлоринового ряда, пригодной для создания ФС нового поколения для ФДТ больших и глубокозалегающих опухолей.

Цели и задачи работы

Целью настоящей работы является изучение физико-химических, фотофизических и биологических свойств новых субстанций бактериохлоринового ряда, поглощающих свет в длинноволновой области спектра ($\lambda_{\text{max}} = 745 - 835 \text{ нм}$), и выбор лидерных соединений для создания фотосенсибилизаторов нового поколения.

Задачи исследования:

1. Первичный скрининг субстанций-фотосенсибилизаторов:

- изучить фото-, физико-химические свойства, фотоиндуцированную активность и цитотоксичность на опухолевых клетках соединений бактериохлоринового ряда природного и синтетического происхождения;

- провести корреляцию между структурой ФС и их физико-химическими, фотофизическими и биологическими свойствами. Отобрать для исследований на животных субстанции с наилучшими характеристиками.

2. Углубленное исследование:

- изучить особенности фармакокинетики лидерных соединений в органах и тканях мышей с перевиваемыми опухолями;

- изучить противоопухолевую эффективность ФДТ с применением отобранных ФС у животных с инокулированными опухолями малого и большого размеров различного генеза в сравнении с препаратом Радахлорин;

- показать преимущества применения длинноволновых субстанций-фотосенсибилизаторов при фотодинамическом лечении животных с опухолями большого размера.

3. Оценка глубины проникновения светового луча в опухолевую ткань при использовании лидерных соединений бактериохлоринового ряда и препарата Радахлорин.

Научная новизна работы

В работе оценены фото-, физико-химические и биологические свойства новых оригинальных субстанций бактериохлоринового ряда и на основании полученных данных выбраны высокоэффективные соединения природного и синтетического происхождения, поглощающие в дальней красной и ближней ИК-области спектра (от 745 нм до 835 нм).

Для отобранных соединений (метилловый эфир *O*-пропиллоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин) проведено изучение фотоиндуцированной активности на опухолевых клетках мыши в мультипараметрической системе, оценено их распределение в ткани саркомы S37 и окружающих опухоль тканях и органах животных методами локальной флуоресцентной спектроскопии и оптического имиджинга, получены данные по специфической противоопухолевой эффективности у мышей и крыс с перевиваемыми опухолями как

малого, так и большого размеров в сравнении с официальным препаратом Радахлорин и показаны значительные преимущества использования длинноволновых фотосенсибилизаторов. На основании проведенных исследований отобраны две перспективные субстанции для разработки на их основе препаратов нового поколения для фотодинамической терапии злокачественных новообразований.

Практическая значимость исследования

Выбраны высокоэффективные субстанции бактериохлоринового ряда для создания новых препаратов для ФДТ злокачественных новообразований, отличающиеся устойчивостью при хранении и облучении, высокой специфической активностью и приемлемой фармакокинетикой, поглощающие в области спектра 745 – 805 нм.

Экспериментально обоснованы и показаны преимущества применения длинноволновых ФС при лечении животных с опухолями большого размера. Их использование позволяет воздействовать на опухоль глубиной более 12 мм и добиться высокого эффекта ФДТ в отношении крупных по размеру опухолей, имеющих глубокую инвазию в подлежащие ткани, при однократном сеансе облучения.

Положения, выносимые на защиту

1) Проведенный первичный скрининг 16-ти фотосенсибилизаторов бактериохлоринового ряда, включающий оценку физико-химических, фото-физических и биологических свойств в системе *in vitro*, позволил отобрать для дальнейшего углубленного изучения два соединения: метиловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида ($\lambda_{\text{max}} = 800$ нм) природного происхождения и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин ($\lambda_{\text{max}} = 747$ нм) синтетического происхождения, характеризующиеся стабильностью при хранении и облучении, а также высокой фотоиндуцированной активностью.

2) Проведенные углубленные исследования показали, что:

- оба лидерных соединения имеют достаточно высокую флуоресценцию в органах и тканях животных, что позволяет надежно регистрировать их как при подготовке сеансов облучения, так и во время процедуры ФДТ;

- метиловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин обладают относительно быстрой фармакокинетикой: накопление красителей в опухолевой ткани животных регистрируется через 15 минут после введения, они удерживаются в ней до 2 часов и быстро выводятся из кожи и внутренних органов;

- отобранные соединения имеют высокую фотоиндуцированную цитотоксичность *in vitro* и проявляют выраженную эффективность при проведении ФДТ у животных с опухолями как малого, так и большого размеров;

- ФДТ с применением субстанций бактериохлоринового ряда у животных с опухолями больших размеров позволяет достичь более выраженного противоопухолевого эффекта, чем ФДТ с применением радахлорина.

3) Высокая эффективность ФДТ с применением ФС, имеющих поглощение в области 745-805 нм, обусловлена более глубоким проникновением возбуждающего света в ткань опухоли.

Личный вклад автора

Все включенные в диссертацию данные получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор участвовал в обосновании и постановке основной части экспериментов, в обобщении, анализе и статистической обработке полученных результатов.

Апробация работы

Результаты работы были доложены и обсуждены на семинарах отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии МНИОИ им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИРЦ» МЗ РФ; XI Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Москва, 2011г); 10 юбилейной конференции «Нанотехнологии в онкологии» (Москва, 2012г); Всероссийской научно-практической конференции «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (Московская область, пос. Удельная, 2014г); III, IV и V Всероссийских конференциях «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Новосибирск, 2014г; Санкт-Петербург, 2015г и Москва, 2016г); XII Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2015г); Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2015г).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 статей в отечественных и зарубежных журналах, 20 тезисов докладов на российских конференциях с международным участием и получено 3 патента.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей главы «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение результатов», выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 34 рисунка и 13 таблиц. Библиографический указатель включает 148 источников (33 отечественных, 115 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы

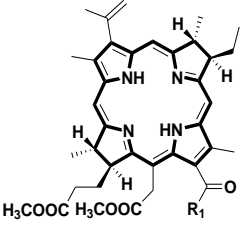
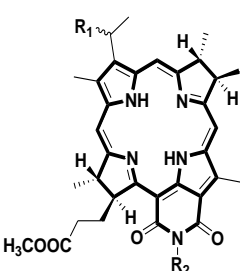
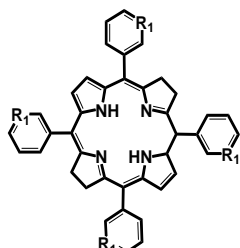
Фотосенсибилизаторы

Субстанции бактериохлоринового ряда (Бхл) природного происхождения синтезированы в Московском технологическом университете им. М.В. Ломоносова на кафедре химической технологии биологически активных соединений под руководством д.х.н., проф. М.А. Грина (Таблица 1) путем направленной химической модификации бактериохлорофилла *a*, экстрагируемого из биомассы *Rhodobacter capsulate*.

Субстанции бактериохлоринового ряда синтетического происхождения получены в ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» в лаборатории функциональных красителей под руководством д.х.н., проф. Е.А. Лукьянца (Таблица 1) конденсацией эквимольных количеств пиррола с 3-пиридинальдегидом.

Таблица 1

Субстанции бактериохлоринового ряда природного и синтетического происхождения

№ Бхл	Тип макроцикла	R ₁ , R ₂	λ _{max} , нм	ξ, М ⁻¹ с.м ⁻¹
Производные бактериохлорина природного происхождения				
1		R ₁ - OH	756	31500
2		R ₁ - NH-(CH ₂) ₄ -NH ₂	754	86250
3		R ₁ - NH-(CH ₂) ₈ -NH ₂	754	76100
4		R ₁ - NH-(CH ₂) ₄ -N-(CH ₃) ₂	754	74900
5		R ₁ - NH-(CH ₂) ₄ -N-(CH ₃) ₃	754	40050
Циклоимидные производные бактериохлорина природного происхождения				
6		R ₁ =N-O-C ₃ H ₇ ; R ₂ -O-C ₃ H ₇	800	50400
7		R ₁ =O; R ₂ -N-(CH ₃) ₂	822	50100
8		R ₁ -NH-N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac;R ₂ -N(CH ₃) ₂	777	56000
9		R ₁ =O; R ₂ -CH ₂ -N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac	831	60000
10		R ₁ -NH-N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac; R ₂ -N ₃ -CO-NH-CO-NH-Lac	780	54000
Тетрагидропорфирины синтетического происхождения				
11		R ₁ -N	747	113200
12		R ₁ -N-CH ₃ -I	761	82600
13		R ₁ -N-CH ₃ OToz	761	84600
14		R ₁ -N-(CH ₂) ₄ -Br	764	79400
15		R ₁ -N-(CH ₂) ₄ -N(C ₅ H ₅)-Br ₂	764	89300
16		R ₁ -N-(CH ₂) ₄ -N-(CH ₃) ₂ -(CH ₂) ₂ -OH-Br ₂	764	86200

Для физико-химических и биологических исследований точные навески гидрофобных красителей (Бхл 1 - 11) растирали в Cremophor EL (Cr EL) и довели до концентрации 0,5 мг/мл 0,9% раствором хлористого натрия (содержание Cr EL в конечном растворе составляло 4%), гидрофильных субстанций (Бхл 12 - 16) растворяли в физиологическом растворе до концентрации 0,5 мг/мл. Полученные объемы фильтровали через мембранный фильтр «Millipore» с размером пор 0,22 мкм в стерильных условиях.

Препарат сравнения Радахлорин (ООО «РАДА-ФАРМА», Россия) – модифицированная природная смесь хлоринов, выделенных из микроводоросли рода *Spirulina*, 70–90% которых составляет хлорин *e6*. Раствор 0,35% для внутривенного введения. Препарат хранится при 0-8° С в защищенном от света месте.

Биологические объекты

Культуры опухолевых клеток: эпидермоидная карцинома гортаноглотки человека HEp2, саркома мышцы S37, карцинома легкого Льюис мышцы LLC, карцинома толстой кишки мышцы Colo26 получены из института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Клетки культивировали в стандартных условиях в средах Игла-MEM (HEp2) и DMEM (S37, Colo26 и LLC) с солями Хэнкса с добавлением 2 mM-L-глутамина и 10% сыворотки крови эмбриональной телячьей (НПП «ПанЭко», Россия).

Животные: конвенциональные мыши (F₁ и BALB/c) (n=1360) и беспородные крысы (n=100) категории MD (minimal disease) получены из питомника лабораторных животных «Андреевка» ФГБУН "НЦБМТ" ФМБА России.

Опухолевые модели: саркома мышцы S37 (лимфогенный путь метастазирования, частота образования метастазов - 100%), карцинома легкого Льюис мышцы LLC (гематогенный путь метастазирования в легкие, частота образования метастазов - 100%), карцинома толстой кишки мышцы Colo26 (гематогенный путь метастазирования в легкие, частота образования метастазов - 100%), альвеолярная слизистая карцинома печени крысы PC-1 (не метастазирует). Для экспериментов животным опухолевый материал инокулировали подкожно на икроножную мышцу с внешней стороны.

Методики исследований

Исследования *in vitro* включали:

а) Изучение физико-химических и фото-физических свойств ФС - с использованием абсорбционного и флуоресцентного методов анализа (оценивали поглощение, способность к флуоресценции и ее интенсивность, стабильность соединений

в растворе в затемненных условиях в течение суток и устойчивость при облучении дозой света 10 Дж/см²).

б) Изучение фото- и цитотоксичности ФС на опухолевых клетках человека и мыши при варьировании концентрации (от 2 нМ до 150 мкМ), времени инкубации (от 15 минут до 6 часов) и облучения (галогеновая лампа с широкополосными фильтрами (Россия), доза света 10 Дж/см²) в двух модификациях: в присутствии красителя в среде инкубации и при его отсутствии (замена перед облучением на среду, не содержащую ФС). Воздействие проводили в экспоненциальной фазе роста клеток. Для оценки цитотоксической активности клетки инкубировали с ФС сутки в затемненных условиях. Выживаемость клеток оценивали визуально и с использованием колориметрического МТТ-теста. Оптическую плотность измеряли на многоканальном спектрофотометре Multiscan (ThermoSpectronic, США) при длине волны 550 нм. Биологически значимым эффектом считали ингибирование роста клеток в культуре более чем на 50% (ИК₅₀).

Исследования *in vivo* включали:

а) Изучение биораспределения ФС у мышей методами локальной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) *ex vivo* (спектральный анализатор «ЛЭСА», ООО «БИОСПЕК», Россия) и оптического имиджинга¹ *in vivo* (установка IVIS Spectrum-CT, PerkinElmer, США). Методом ЛФС оценивали уровень нормированной флуоресценции (ФН, отн.ед) в крови, в ткани опухоли саркомы S37, коже, печени, почках и селезенке через различные промежутки времени после введения ФС (*ex tempore*, через 0,08; 0,25; 0,5, 2, 4, 24, 48, 120 и 168 часов).

Методом оптического имиджинга получали прижизненные интегральные флуоресцентные изображения мышей в динамике (через 0,25, 0,5, 1, 2, 4 и 24 часа после введения ФС) и измеряли интенсивность флуоресценции в фотон/(с·см²) в опухоли S37 и коже. В обоих методах рассчитывали флуоресцентную контрастность между опухолью и кожей (ФК).

б) Изучение противоопухолевой эффективности ФДТ у мышей с метастатическими опухолями (S37, Colo26 и LLC) малого ($V_{оп.}=130\pm 20$ мм³) и большого ($V_{оп.}=460\pm 40$ мм³) размеров, и у крыс с неметастатической карциномой РС-1 большого размера ($V_{оп.}=1300\pm 100$ мм³). При отработке эффективного режима варьировали дозу ФС (от 5,0 до 10,0 мг/кг), интервал между введением и облучением (от 5 минут до 4 часов) и плотность энергии (от 90 до 270 Дж/см²). Облучали светодиодными источниками

¹ Исследования выполнены в Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н.И. Пирогова совместно с к.х.н. А.А. Абакумовым.

оптического излучения с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения ФС (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Россия).

Для облучения животных с опухолями малого размера использовали монопозиционный режим (одно поле, световая доза 90 Дж/см²), для воздействия на опухоли большого размера - полипозиционный режим (три перекрывающихся поля, на каждое - по 90 Дж/см², Σ 270 Дж/см²).

Противоопухолевую эффективность ФДТ оценивали как по общепринятым в экспериментальной онкологии критериям: торможению роста опухоли (ТРО,%), увеличению продолжительности жизни (УПЖ,%) и критерию излеченности (КИ,%), так и с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) (магнитно-резонансный томограф ClinScan 7T 70/30, BrukerBiospin, Германия)² и гистологии³. За мышами, у которых после лечения визуально и пальпаторно не определялся продолженный рост опухоли, последующее наблюдение осуществляли в течение 90 суток, за крысами - 180 суток, затем животных эвтаназировали и оценивали состояние внутренних органов. Контролем служили животные без воздействия, а также получавшие только ФС или облучение. Неизлеченных мышей опытных и контрольных групп с инокулированными метастатическими опухолями Colo26 и LLC, находящихся в терминальном состоянии, вскрывали и оценивали количество метастазов в легких, у животных с саркомой S37 измеряли паховый лимфатический узел на стороне опухоли и рассчитывали его объём.

в) Изучение глубины проникновения светового луча в опухолевую ткань при ФДТ *ex vivo* на модели саркомы S37 у мышей. ФС вводили внутривенно в дозе 5,0 мг/кг, через 15 минут после введения красителей животных умерщвляли и иссекали опухолевые образования вместе с покрывающим их фрагментом кожи, которые затем *ex vivo* подвергали облучению светом соответствующей длины волны в условиях, аналогичных проведению процедуры ФДТ. Регистрировали нормированную флуоресценцию в ткани опухоли послойно до и после светового воздействия (толщина каждого слоя составляла 2-3 мм). Контролем служили образцы опухолей, полученные от животных, которым не вводили ФС, но подвергали облучению.

Статистический анализ

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

² Исследования выполнены в Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н.И. Пирогова совместно с к.х.н. А.А. Абакумовым.

³ Исследования проведены в отделении модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии МНИОИ им. П.А. Герцена совместно с д.б.н. Т.А. Кармаковой и М.С. Воронцовой.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Первичный скрининг субстанций-фотосенсибилизаторов включал: оценку спектральных характеристик соединений бактериохлоринового ряда, их устойчивость при хранении в растворе в затемненных условиях и при световом воздействии, а также изучение фотоиндуцированной активности и цитотоксичности на опухолевых клетках Нер2 с целью отбора наиболее перспективных красителей.

В анализ были включены 10 субстанций бактериохлоринового ряда природного происхождения с аминокамидными (Бхл **1 – 5**), с пропиловым (Бхл **6**) и углеводными (Бхл **7 – 10**) заместителями, введение которых способствует увеличению растворимости в биосовместимых средах и их тропности к опухолевой ткани, и 6 субстанций синтетического происхождения: амфифильный Бхл **11** и его водорастворимые аналоги с йодидным, тозилным, тетра- и октабромидными заместителями (Бхл **12 – 16**) (Таблица 1). Введение атомов галогенов способствует увеличению вероятности интеркомбинационного перехода в триплетное состояние и, соответственно, выходу фотоиндуцируемого синглетного кислорода.

По результатам абсорбционного и флуоресцентного анализов ФС с аминокамидными заместителями **1 – 5** имеют максимум при 754 ± 2 нм, не стабильны при хранении (в течение суток отмечали снижение интенсивности флуоресценции на 33 – 56%), соединения с пропиловым **6** и углеводными заместителями **8 – 10** поглощают в области 780 – 831 нм и характеризуются стабильностью при хранении и облучении (Таблица 2).

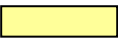

Таблица 2

Физико-химические и фото-физические свойства субстанций бактериохлоринового ряда природного происхождения

БХЛ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
λ_{max} , нм поглощение	756	754	754	754	754	800	822	777	831	780
λ_{max} , нм флуоресценция	757	754	754	754	754	802	810	780	831	780
Стабильность при хранении*	45%	56%	52%	35%	33%	13%	46%	12%	17%	21%
Устойчивость при облучении**	11%	16%	20%	3%	8%	19%	47%	18%	22%	25%

* Снижение интенсивности флуоресценции в максимуме в течение суток в растворе, %

** Снижение интенсивности флуоресценции в максимуме после облучения (10 Дж/см^2), %

 Нестабильный  Стабильный

Все ФС природного происхождения, кроме красителя **9**, обладают фотоиндуцированной активностью при отсутствии темновой токсичности (Рис. 1). Наиболее высокая фотоактивность выявлена у соединений с аминокамидными заместителями (ИК_{50} варьирует от 17 до 49 нМ при 2-х часовой инкубации).

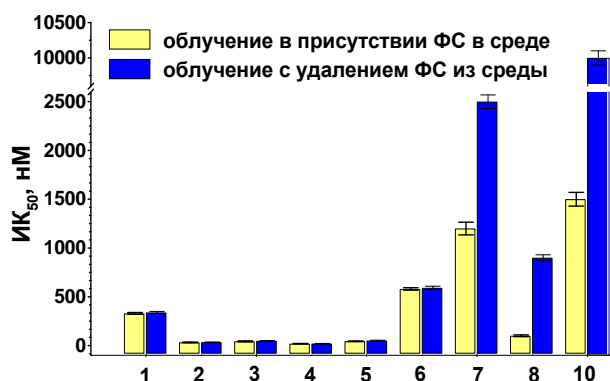


Рис. 1. Фотоиндуцированная активность субстанций бактериохлоринового ряда природного происхождения (опухолевые клетки эпидермоидной карциномы гортаноглотки человека HEP2).

Учитывая совокупность физико-химических и биологических свойств, а также технологичность получения и стабильность при хранении и облучении, для дальнейших исследований нами был выбран БХЛ **6**: метиловый эфир О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпуринимида ($\lambda_{\max} = 800$ нм).

При оценке спектров поглощения ($\lambda_{\max} = 747 - 764$ нм) и флуоресценции ($\lambda_{\max} = 754 - 764$ нм) синтетических тетрагидропорфиринов в динамике выявлено, что большинство из них стабильны в темновых условиях в выбранном временном диапазоне (24 часа), при воздействии светом (плотность энергии 10 Дж/см^2) ФС **12 - 16** подвержены фотобличению, а ФС **11** устойчив при облучении (Таблица 3).

Таблица 3

Физико-химические и фото-физические свойства субстанций бактериохлоринового ряда синтетического происхождения

БХЛ	11	12	13	14	15	16
λ_{\max} , нм поглощение	747	761	761	763	764	764
λ_{\max} , нм флуоресценция	754	761	761	764	764	762
Стабильность при хранении*	8%	24%	7%	8%	15%	54%
Устойчивость при облучении**	19%	55%	47%	45%	38%	48%

* Снижение интенсивности флуоресценции в максимуме в течение суток в растворе, %

** Снижение интенсивности флуоресценции в максимуме после облучения (10 Дж/см^2), %

Нестабильный Стабильный

Максимальная активность в системе *in vitro* выявлена у фотосенсибилизатора **11** - мезо-тетра-(3-пиридил)бактериохлорина, величина ИК₅₀ которого в 9 - 40 раз ниже, чем у красителей с йодидным, тозилльным и бромидными заместителями (Рис. 2). Поглощение в длинноволновой области спектра, стабильность при хранении и облучении, высокая фотоактивность в системе *in vitro* позволяет отнести этот ФС к перспективным.

Таким образом, данные, полученные при изучении фото-, физико-химических свойств и фотоиндуцированной активности в отношении клеток эпидермоидной карциномы гортаноглотки человека HEP2, а также учет технологичности

получения ряда производных бактериохлорина позволили отобрать два лидерных соединения для дальнейшего углубленного изучения: метиловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропокси-бактериопурпуринимида ($\lambda_{max}=800$ нм) (Бхл 6) и мезо-тетра-(3-пиридил)бактериохлорин ($\lambda_{max}=747$ нм) (Бхл 11).

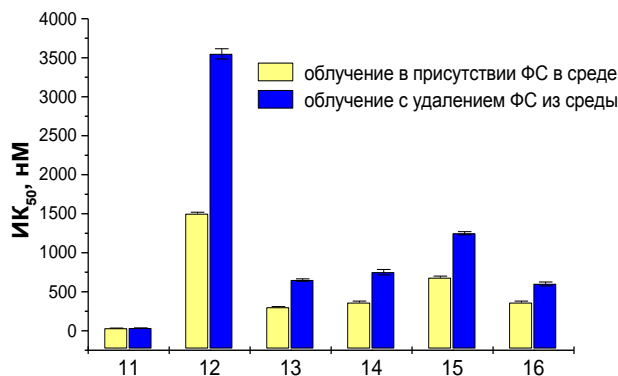


Рис. 2. Фотоиндуцированная активность субстанций бактериохлоринового ряда синтетического происхождения (опухолевые клетки эпидермоидной карциномы гортаноглотки человека HEp2).

2. Углубленное изучение отобранных субстанций-фотосенсибилизаторов включало: изучение их фотоиндуцированной активности и цитотоксичности в системе *in vitro* на опухолевых клетках различного гистогенеза, биораспределения и эффективности ФДТ у животных с опухолями малого и большого размеров в сравнении с официальным препаратом второго поколения радахлорином.

2.1. *In vitro* сравнительное изучение фотоиндуцированной активности фотосенсибилизаторов

Результаты, полученные в системе *in vitro*, показали, что Бхл 6, 11 и радахлорин обладают фотоиндуцированной активностью в отношении опухолевых клеток саркомы мыши S37, карцином толстой кишки Colo26 и легкого LLC в отсутствие темновой токсичности (Таблица 4). Фотоактивность метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида превышала таковую для препарата Радохлорин в 23, 29 и 13 раз для культур опухолевых клеток S37, Colo26 и LLC, соответственно, а мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина - в 68, 152 и 173 раза, соответственно. Величина ИК₅₀ достигала своих минимальных значений с препаратом Радохлорин через 6 часов после его инкубации с опухолевыми клетками, а для соединений бактериохлоринового ряда – через 2-4 часа.

Удаление ФС из культуральной среды перед облучением практически не влияло на величину ИК₅₀ для всех соединений при выполнении теста на культуре клеток карциномы толстой кишки человека Colo26, что косвенно свидетельствует об интернализации ФС в клетку и реализации фототоксического эффекта в результате индукции фотохимической реакции непосредственно в опухолевой клетке. В то время как удаление ФС 6, ФС 11 и

радахлорина из культуральной среды опухолевых клеток S37 и LLC перед воздействием светом приводило к увеличению величины ИК₅₀ на 57%, 28% и 21% и 7%, 70% и 16%, соответственно, что косвенно свидетельствовало о трудностях преодоления биологических барьеров ФС на клеточном уровне (Таблица 4).

Таблица 4

Фотоиндуцированная активность метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида (Бхл 6), мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (Бхл 11) и радахлорина в системе *in vitro*

ИК ₅₀ , нМ				
ФС	Условия проведения эксперимента	Саркома S37	Карцинома толстой кишки Colo26	Карцинома легкого Льюис LLC
Бхл 6 ($\lambda=800$ нм)	Время инкубации	6 часов	4 часа	4 часа
	Без удаления ФС	100±8	110±9	280±10
	С удалением ФС	230±17	140±12	300±10
Бхл 11 ($\lambda=747$ нм)	Время инкубации	4 часа	2 часа	4 часа
	Без удаления ФС	68±2	21±2	22±2
	С удалением ФС	95±2	23±2	74±3
Радахлорин ($\lambda=662$ нм)	Время инкубации	6 часов	6 часов	6 часов
	Без удаления ФС	2300±100	3200±200	3800±200
	С удалением ФС	2900±100	3300±200	4500±300

Таким образом, в системе *in vitro* на опухолевых клетках мыши различного гистогенеза (S37, Colo26 и LLC) показано, что производное бактериохлорина природного происхождения - метиловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида (ФС 6; $\lambda_{\text{max}} = 800$ нм) и синтетического - мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин (ФС 11; $\lambda_{\text{max}} = 747$ нм) обладают высокой фотоактивностью. Различия в степени выраженности фотоиндуцированного воздействия этих красителей, по всей видимости, обусловлены как структурой молекулы флуорохрома, которая в значительной степени определяет его способность и скорость проникновения в клетку, так и биологическими особенностями опухолевых клеток различного гистогенеза.

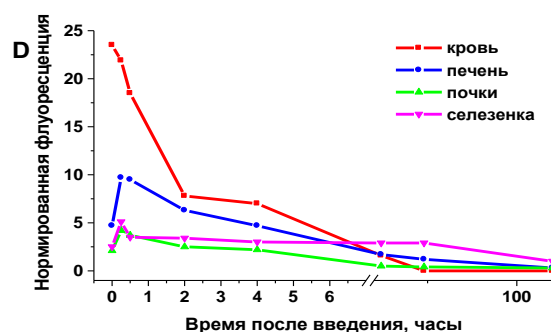
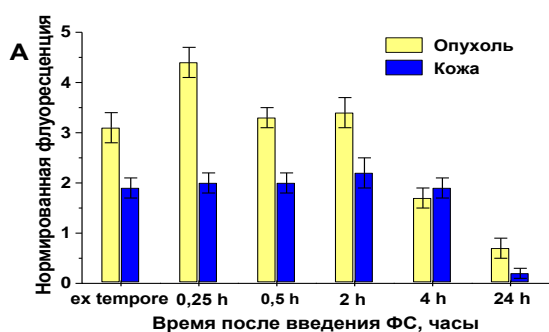
2.2. Изучение биораспределения фотосенсибилизаторов в организме мышей с инокулированной опухолью саркомой S37

Уровень флуоресценции отобранных соединений, как показано в исследованиях в бесклеточной среде *in vitro*, достаточно высокий, что позволяет проводить оценку биораспределения красителей у мышей-опухоленосителей методами локальной флуоресцентной спектроскопии и оптического имиджинга, с целью выявить ткани и органы, в которые они проникают наиболее интенсивно и в которых удерживаются наиболее длительно.

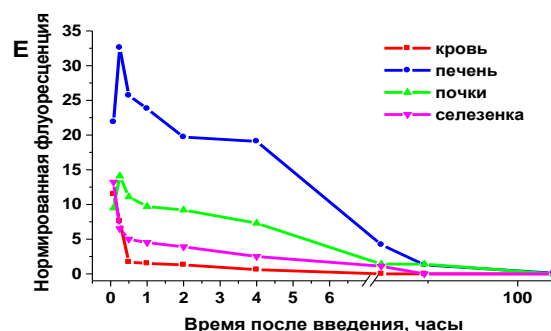
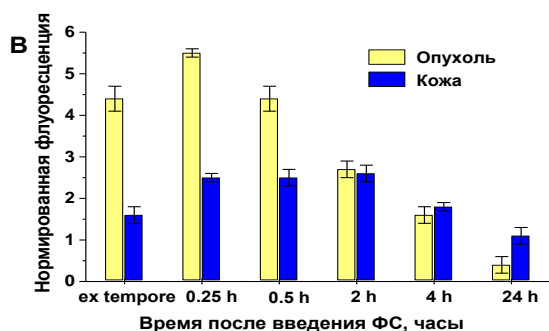
Методом локальной флуоресцентной спектроскопии *ex vivo* показано, что все красители быстро поступают в опухолевую ткань саркомы S37, максимальный уровень

накопления лидерных соединений **6** и **11** регистрируется через 15 минут после введения, а радахлорина - через 30 минут, высокий уровень ФС бактериохлоринового ряда сохраняется до 2 часов, радахлорина - до 4 часов (Рис. 3 А, В, С). Максимальная флуоресцентная контрастность между опухолью и кожей наблюдается для длинноволновых красителей через 15-30 минут и составляет для Бхл **6** $2,2 \pm 0,3$; для Бхл **11** - $2,5 \pm 0,3$, а для радахлорина - $3,8 \pm 0,6$. В коже ФС **6** и **11** регистрируются до 24-36 часов, радахлорин - до 72 часов.

Метилловый эфир О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпинимида



Мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин



Радахлорин

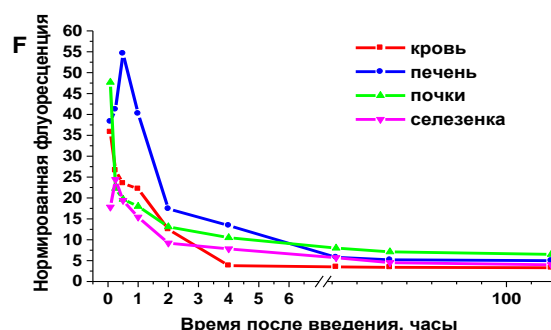
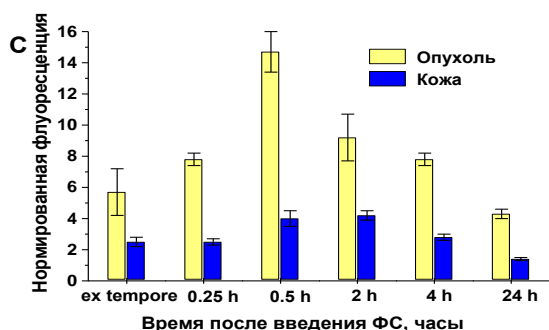


Рис. 3. Распределение ФС в опухолевой ткани саркомы S37 и нормальной коже (слева), в крови и внутренних органах (справа) у мышей на различные сроки после введения: А, D - метилловый эфир О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпинимида; В, Е - мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин; С, F – радахлорин. Результаты получены *ex vivo* методом ЛФС на установке «ЛЭСА».

Во внутренних органах и тканях животных нормированная флуоресценция регистрируется сразу после введения красителей, преимущественно в печени и почках, а затем снижается с различной скоростью, и через 2 суток фоновые значения ФН природного бактериохлорина определяются только в селезенке, а синтетического и радахлорина – в почках и печени (Рис. 3 D, E, F). Следует отметить, что уровень флуоресценции радахлорина на порядок выше, чем у соединений бактериохлоринового ряда.

На рисунке 4 представлены результаты изучения распределения соединений бактериохлоринового ряда в коже и окружающей ткани, полученные методом оптического имиджинга. Количественная оценка сигнала флуоресценции показала, что наиболее высокие значения регистрируются в опухоли S37, также, как и при изучении методом ЛФС, в интервале от 15 минут до 2-х часов после внутривенного введения ФС. Максимальный флуоресцентный контраст между опухолью и прилежащей кожей составляет $2,2 \pm 0,3$ для Бхл 6 и $3,3 \pm 0,2$ для Бхл 11. Использование данного метода позволяет проводить изучение распределения ФС в организме мышей прижизненно, что является более гуманным при обращении с животными.

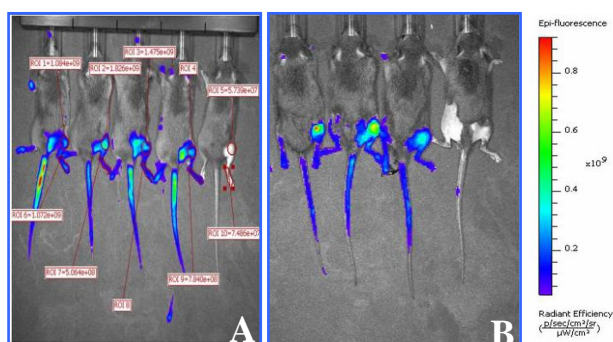


Рис. 4. Прижизненные флуоресцентные изображения мышей с саркомой S37 через 15 минут после внутривенного введения метилового эфира О-пропилоксим-N-пропоксибактериопуринимида (А) и мезо-тетра(3-пиридил) бактериохлорина (В). Изображения получены на установке IVIS Spectrum-CT методом оптического имиджинга.

Полученные данные по биораспределению ФС свидетельствуют о том, что лидерные соединения бактериохлоринового ряда обладают приемлемой фармакокинетикой для комфортного и корректного проведения сеанса ФДТ.

2.3. Изучение эффективности ФДТ с применением фотосенсибилизаторов при лечении мышей и крыс с инокулированными опухолями различного гистогенеза.

Одной из основных задач данной работы являлось сравнение эффективности ФДТ с применением длинноволновых ФС и радахлорина при лечении животных с опухолями малого и большого размеров. Эффективность ФДТ зависит от дозы красителя, интервала времени между введением и облучением, а также от параметров облучения, поэтому для каждого ФС на одной модели – саркоме мыши S37 была проведена ФДТ при варьировании данных параметров и отобраны оптимальные режимы, которые

использовали для дальнейших исследований: Бхл 6 – доза 5,0 мг/кг, интервал между внутривенным введением и облучением –15 минут и плотность энергии 150 Дж/см²; Бхл 11 – 2,0 мг/кг, 30 минут, 150 Дж/см², соответственно; радахлорин – 5,0 мг/кг, 15 минут и 90-150 Дж/см², соответственно.

При ФДТ животных с опухолями малого размера различного гистогенеза (мышцы с метастатическими опухолями - саркомой S37, карциномой толстой кишки Colo26 и карциномой легкого Льюис LLC, $V_{\text{опух}} = 130 \pm 20 \text{ мм}^3$) выявлена 100% регрессия первичного очага при использовании ФС бактериохлоринового ряда и 95-100% торможение роста опухоли с радахлорином (Таблица 5). При этом применение лидерных соединений привело к 100% излеченности в 83% случаев, чего не наблюдалось ни в одном случае при использовании радахлорина. Следует отметить, что неполная излеченность животных, составившая 67 и 80%, соответственно, при полной регрессии первичного очага после ФДТ как с Бхл 6 (LLC), так и с радахлорином (Colo26), связана с прогрессированием метастатического процесса, который на момент облучения (6-7 сутки после инокуляции) мог иметь место у отдельных животных.

Таблица 5

Противоопухолевая эффективность метилового эфира О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпуринимида (Бхл 6), мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (Бхл 11) и радахлорина у мышей с инокулированными опухолями различного гистогенеза малого размера

ФС	V _{опух} = 130 ± 20 мм ³				
Критерии	ТРО, %			УПЖ, %	КИ*, %
	14 сутки	17 сутки	20 сутки		
Саркома S37					
Бхл 6 (λ=800 нм)	100	100	100	137	100
Бхл 11 (λ=747 нм)	100	100	100	131	100
Радахлорин (λ=662 нм)	100	100	98	100	80
Карцинома толстой кишки Colo26					
Бхл 6 (λ=800 нм)	100	100	100	137	100
Бхл 11 (λ=747 нм)	100	100	100	123	100
Радахлорин (λ=662 нм)	100	100	100	95	80
Карцинома легкого Льюис LLC					
Бхл 6 (λ=800 нм)	100	100	100	111	67
Бхл 11 (λ=747 нм)	100	100	100	131	100
Радахлорин (λ=662 нм)	98,3	96,2	95,2	102	60

*наблюдение за излеченными животными 90 суток

При воздействии на опухоли S37, Colo26 и LLC большего размера ($V_{\text{опух}} = 460 \pm 40 \text{ мм}^3$) также выявлена 100% регрессия первичных опухолевых очагов при использовании производных бактериохлоринового ряда и отмечены еще более выраженные различия в эффективности ФДТ при их применении по сравнению с радахлорином (на 20 сутки после ФДТ ТРО составило 37%, 60%, 17 %, соответственно) (Таблица 6). Эффективность ФДТ,

оцененная по критериям «увеличение продолжительности жизни» и «коэффициент излеченности», уменьшилась по сравнению с воздействием на новообразования объемом $130 \pm 20 \text{ мм}^3$, так как на момент облучения (14 сутки после инокуляции) у всех животных имелись метастатические поражения в паховых лимфатических узлах (S37) и легких (Colo26 и LLC).

При этом в группах мышей с инокулированной саркомой S37 при использовании соединений бактериохлоринового ряда наблюдали увеличение продолжительности жизни животных на 95-105% и излеченность у 33-40% мышей, что может быть связано с включением в зону облучения прилегающего к опухоли пахового лимфатического узла и остановкой процесса метастазирования.

Таблица 6

Противоопухолевая эффективность метилового эфира *O*-пропиллоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида (Бхл 6), мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (Бхл 11) и радахлорина у мышей с инокулированными опухолями различного гистогенеза большого размера

ФС	V _{опух} = 460 ± 40 мм ³				
Критерии	ТРО, %			УПЖ, %	КИ*, %
	14 сутки	17 сутки	20 сутки		
Саркома S37					
Бхл 6 (λ=800 нм)	100	100	100	105	33
Бхл 11 (λ=747 нм)	100	100	100	95	40
Радахлорин (λ=662 нм)	57	55	37	42	0
Карцинома толстой кишки Colo26					
Бхл 6 (λ=800 нм)	100	100	100	48	0
Бхл 11 (λ=747 нм)	100	100	100	42	0
Радахлорин (λ=662 нм)	84	73	60	42	0
Карцинома легкого Льюис LLC					
Бхл 6 (λ=800 нм)	100	100	100	33	0
Бхл 11 (λ=747 нм)	100	100	100	58	0
Радахлорин (λ=662 нм)	36	37	17	28	0

*наблюдение за излеченными животными 90 суток

В группах мышей с инокулированными опухолями Colo26 и LLC, ФДТ как с применением отобранных субстанций, так и с радахлорином не увеличивало среднюю продолжительность жизни животных, обусловленную гематогенным метастазированием данных опухолей в легкие, не вовлеченных в зону облучения.

Следует отметить, что при оценке гематогенного и лимфогенного метастазирования на момент гибели животных выявлено, что количество и объем метастазов у мышей в опытных группах, леченных ФДТ с применением лидерных соединений бактериохлоринового ряда, не отличались от количества и объема метастазов у животных в контрольных группах, что дает основание полагать, что фотодинамическая терапия не ускоряет процесс метастазирования.

Другой моделью для сравнительных исследований эффективности отобранных фотосенсибилизаторов и радахлорина была выбрана неметастазирующая перевиваемая опухоль крыс большого размера. На момент облучения подкожный трансплантат опухоли РС-1 представлял собой образование ячеистого строения объемом 1300 мм³, окруженное тонкой соединительнотканной капсулой, опухоль была хорошо васкуляризована и, несмотря на значительные размеры опухолевого узла, на всей его глубине не прослеживалось признаков некротических изменений опухолевой ткани (Рис. 5).

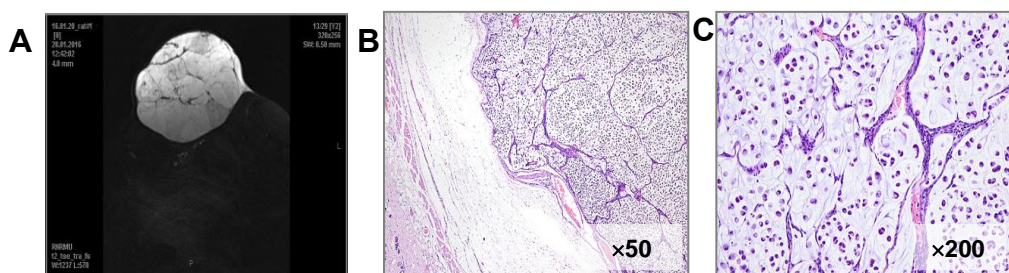


Рис. 5. Изображения опухоли РС-1 на 14 сутки после инокуляции, полученные методом МРТ и морфологически: А - магнитно-резонансное фронтальное изображение подкожно инокулированной на лапу крысы опухоли РС-1; В – общий вид краевого участка опухолевого узла РС-1 (увеличение $\times 50$); С – опухолевый узел РС-1 (увеличение $\times 200$).

После внутривенного введения ФС бактериохлоринового ряда крысам в эквитерапевтических дозах и облучения опухоли, на протяжении последующих 180 суток ни у одного из животных в опытной группе при визуальном осмотре и пальпации не определялось признаков продолженного роста (ТРО=100%; КИ=100%). Фотодинамическое воздействие на развившуюся опухоль, выполненное с радахлорином, не показало высокой противоопухолевой эффективности: величина ТРО не превышала 37% на протяжении всего срока наблюдения за животными (Таблица 7).

Таблица 7

Противоопухолевая эффективность метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпинимида (Бхл 6), мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (Бхл 11) и радахлорина у крыс с инокулированной опухолью РС-1

ФС/ сутки после лечения	ТРО после ФДТ крыс с опухолью РС-1, %					КИ*, %
	10 сутки	14 сутки	17 сутки	21 сутки	25 сутки	
Бхл 6	100	100	100	100	100	100
Бхл 11	100	100	100	100	100	100
Радахлорин	24	14	17	17	37	0

*наблюдение за излеченными животными 180 суток

Для верификации полноты терапевтического эффекта в отдельном эксперименте у всех крыс опытных групп выполнено исследование состояния области воздействия

методом МРТ до начала лечения и на 25 сутки после сеанса ФДТ, а также гистологическое исследование тканей, подвергавшихся фотодинамическому воздействию (Рис. 6).

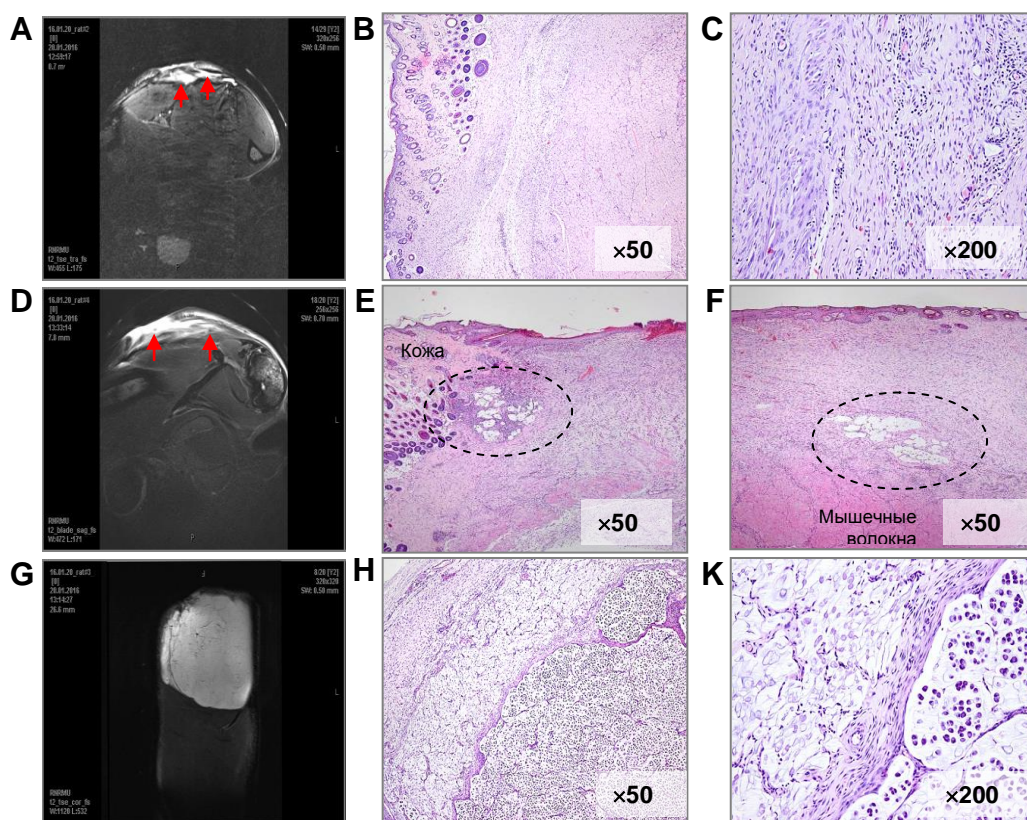


Рис. 6. Верификация эффекта ФДТ на модели перевиваемой подкожной опухоли РС-1 у крыс.

Фронтальные МРТ-изображения конечности животных с подкожным трансплантатом опухоли РС-1: А, D – 25 после ФДТ с Бхл **6** и **11**, G - 25 суток после ФДТ с радахлорином. Микрофотографии гистологических срезов тканей в участках, соответствующих МРТ-изображениям (окрашивание гематоксилином и эозином): В, С – фиброзные изменения подкожной соединительной ткани в зоне воздействия, без признаков опухолевого роста; Е, F – на периферии зоны, подвергавшейся воздействию, на фоне фиброзных изменений определяются небольшие фокусы остаточной опухоли; H, К - краевой участок опухолевого узла с зоной некротических изменений и морфологически неизменной опухолевой тканью.

После ФДТ с бактериохлоринами на МРТ-изображениях у четырех животных в области фотодинамического воздействия в проекции кожного рубца визуализировалась высококонтрастная область, расположенная на границе кожи и мышечной ткани (Рис. 6 А). При гистологическом исследовании в этих участках обнаружены массивные фиброзные изменения, участки грануляционной ткани с редкими очагами лимфоидной инфильтрации, а также небольшие скопления сидерофагов. Признаков опухолевого роста в серийных срезах, полученных с различных сечений образца ткани, не выявлено (Рис. 6 В, С).

У трех животных, получавших лечение с соединениями бактериохлоринового ряда, при анализе МРТ изображений обнаружены небольшие участки с меньшим контрастом

(Рис. 6 D). При гистологическом исследовании установлено, что эти дефекты соответствуют фокусам остаточной опухолевой ткани, сохранившей характерную для РС-1 ячеистую структуру. При этом остатки опухоли были окружены лимфоидным инфильтратом, а ядра большинства опухолевых клеток разрушены (Рис. 6 E, F), что наряду со 100% излеченностью животных, подтверждает реализацию иммунного механизма действия фотодинамической терапии.

После ФДТ с радахлорином на 25 сутки наблюдали продолженный рост опухоли у всех животных (Рис. 6 G). На гистологических срезах видны погибшие опухолевые клетки (слева) и неизменная опухолевая ткань (справа), разделенные соединительнотканной прослойкой, что свидетельствует о поражении поверхностного участка опухоли (Рис. 6 H, K).

Результаты гистологического исследования дают основание полагать, что высокая эффективность фотодинамического воздействия с лидерными соединениями на опухоли крупного размера в значительной степени обусловлена более глубоким проникновением возбуждающего света в ткань опухоли.

Таким образом, данные, полученные в экспериментах на перевиваемых опухолях у мышей и крыс, свидетельствуют об очевидных преимуществах применения соединений бактериохлоринового ряда по сравнению с радахлорином.

3. Глубина проникновения светового луча в опухолевую ткань при ФДТ

Для оценки глубины проникновения в ткани света на модели саркомы S37 у мышей исследовано фотовыгорание метилового эфира О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпуринимида (Бхл 6), мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (Бхл 11) и радахлорина после облучения образцов опухолей *ex vivo* светом соответствующей длины волны.

Измерение контактным методом флуоресцентного сигнала в опухолях, иссеченных у животных после введения фотосенсибилизаторов, показало, что к моменту начала светового воздействия и лидерные субстанции, и радахлорин равномерно распределялись по всему объему опухолевого узла. Показатель ФН для Бхл 6 составил $6,5 \pm 0,4$ отн.ед., для Бхл 11 - $9,0 \pm 0,4$ отн.ед. и для радахлорина – $14,0 \pm 1,5$ отн.ед. (Рис. 7).

В образцах опухолей, иссеченных у животных, которым вводили субстанции бактериохлоринового ряда, после воздействия на них снижение интенсивности флуоресцентного сигнала, обусловленное фотовыгоранием ФС, наблюдалось по всему объему опухолевых образований (Рис. 7 А, В). Толщина ткани, которую должен преодолеть свет для взаимодействия с ФС, в этих случаях достигала 12 мм. После

облучения образцов опухолей, полученных от мышей, которым вводили радахлорин, значительное фотовыгорание ФС регистрировалось на глубине залегания ткани не более 6 мм (Рис. 7 С).

Таким образом, экспериментально показано, что применение длинноволновых ФС - метилового эфира О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпуринимида и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина позволяет воздействовать на опухолевую ткань на глубине более 12 мм, а радахлорина – только на глубине до 6 мм.

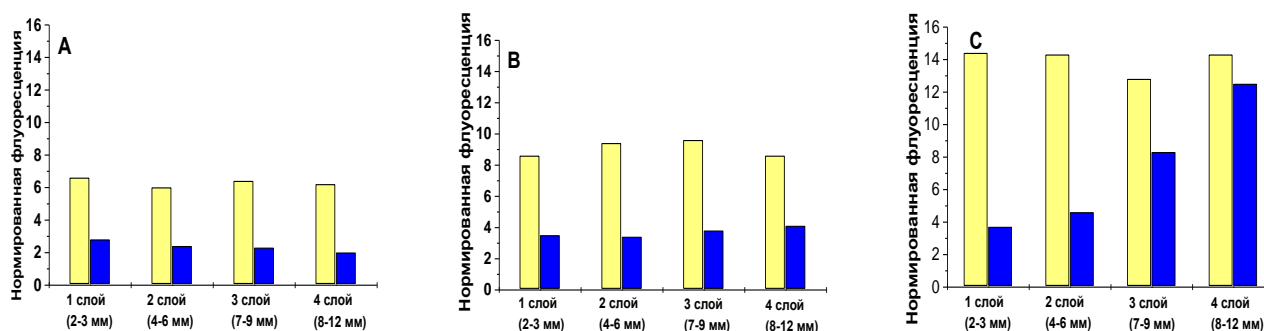


Рис. 7. Фотовыгорание Бхл 6 (А), Бхл 11 (В) и радахлорина (С) в различных слоях ткани саркомы S37 после светового воздействия. Световое облучение опухолей проводили *ex vivo*. Флуоресцентный сигнал измеряли в опухолях, не подвергавшихся световому воздействию (желтые столбцы) и после облучения (синие столбцы), с рассеянного опухолевого узелка. По оси Х – глубина расположения слоя ткани по отношению к поверхности, со стороны которой проводилось облучение светом.

Проведенные исследования показали, что отобранные нами в результате первичного скрининга субстанции (метилловый эфир О-пропилоксим-N-пропоксибактериопурпуринимида ($\lambda_{max} = 800$ нм) и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин ($\lambda_{max} = 747$ нм)) оказывают существенно более выраженное противоопухолевое действие при лечении животных с опухолями большого размера, чем радахлорин ($\lambda_{max} = 662$ нм), и имеют приемлемую фармакокинетику для комфортного проведения сеансов ФДТ. Все вышесказанное позволяет предполагать, что препараты, созданные на основе изученных субстанций, в клинической практике могут повысить эффективность метода ФДТ и открыть новые возможности для лечения объемных и глубокозалегающих опухолей ряда локализаций.

ВЫВОДЫ

1) На этапе первичного скрининга изучены физико-химические, фото-физические и биологические свойства 16 соединений бактериохлоринового ряда природного (n=10) и синтетического (n=6) происхождения. На основании данных по растворимости и стабильности при хранении в биологических средах, устойчивости при облучении, способности к флуоресценции, фотоиндуцированной цитотоксичности и технологичности

получения, для углубленного изучения отобраны 2 субстанции: природного происхождения - метиловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида ($\lambda_{\text{max}} = 800 \text{ нм}$) и синтетического - мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин ($\lambda_{\text{max}} = 747 \text{ нм}$).

2) При детальном изучении фотоиндуцированной активности лидерных соединений на панели опухолевых клеток мыши различной природы в мультипараметрической системе выявлено, что величина ИК_{50} достигает минимальных значений через 2-4 часа инкубации ФС с клетками, незначительно зависит от их гистогенеза и составляет для метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида $100 \pm 8 \text{ нМ}$, $110 \pm 9 \text{ нМ}$ и $280 \pm 10 \text{ нМ}$ относительно клеток S37, Colo26 и LLC, для мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина - $68 \pm 3 \text{ нМ}$, $21 \pm 2 \text{ нМ}$ и $22 \pm 2 \text{ нМ}$, соответственно, что на порядок ниже, чем для радахлорина.

3) С помощью методов локальной флуоресцентной спектроскопии *ex vivo* и оптического имиджинга *in vivo* показано, что метиловый эфир *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин быстро (в течение 15-30 минут) поступают и накапливаются в опухолевой ткани (саркома S37) и внутренних органах мышей; высокий уровень фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани регистрируется в течение 2 часов; через 24 часа красители выводятся из организма животных на 85-95%. Максимальная величина флуоресцентной контрастности между опухолью и кожей для метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида составляет $2,2 \pm 0,3$; а для мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина $2,5 \pm 0,3$.

4) При ФДТ мышей с метастатическими опухолями различного гистогенеза (саркома S37, карцинома толстой кишки Colo26 и карцинома легкого Льюис LLC) малого ($V_{\text{оп}} = 130 \pm 20 \text{ мм}^3$) и большого ($V_{\text{оп}} = 460 \pm 20 \text{ мм}^3$) размеров выявлена высокая эффективность лечения (полная регрессия опухолевого очага, ТРО 100%) с применением метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида (доза 5,0 мг/кг, интервал между введением и облучением 15 минут, плотность энергии 270 Дж/см^2) и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (доза 2,0 мг/кг, интервал между введением и облучением 30 минут, плотность энергии 270 Дж/см^2).

5) При ФДТ крыс с альвеолярной слизистой карциномой печени РС-1 большого размера ($V_{\text{оп}} = 1300 \pm 100 \text{ мм}^3$) выявлена высокая эффективность лечения с применением метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида (доза 2,5 мг/кг, интервал между введением и облучением 15 минут, плотность энергии 270 Дж/см^2) и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (доза 1,0 мг/кг, интервал между введением и облучением 30 минут, плотность энергии 270 Дж/см^2) (100% излеченность животных), что подтверждено методом магнитно-резонансной томографии и гистологическим анализом.

6) При ФДТ мышей и крыс с инокулированными опухолями больших размеров ($V_{\text{оп}} = 460 \pm 20 \text{ мм}^3$ и $1300 \pm 100 \text{ мм}^3$, соответственно) наблюдали более высокую эффективность лечения с применением лидерных соединений бактериохлоринового ряда (полная регрессия опухолевого очага, ТРО 100%), чем с радахлорином (частичная регрессия опухолевого очага; ТРО для S37, Colo26, LLC и РС-1 составило 37%, 42%, 28% и 30%, соответственно) (доза 5,0 и 2,5 мг/кг, соответственно, интервал между введением и облучением 15 минут, плотность энергии 270 Дж/см^2).

7) Получена зависимость эффекта ФДТ от глубины проникновения светового луча в опухоль и показано, что применение фотосенсибилизаторов - метилового эфира *O*-пропилоксим-*N*-пропоксибактериопурпуринимида и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина позволяет воздействовать на опухолевую ткань на глубине более 12 мм, а радахлорина – только на глубине до 6 мм.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Plotnikova E.A. – «Click Chemistry» in the synthesis of the first glycoconjugates of bacteriochlorin series. Grin M.A., Lonin I.S., Likhoshesterov L.M., Novikova O.S., Plyutinskaya A.D., Plotnikova E.A., Kachala V.V., Yakubovskaya R.I., Mironov A.F. // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2012. - №16. - P. 1094-1109.

2) Плотникова Е.А. - Изучение полусинтетических и синтетических бактериохлоринов в системе *in vitro*. Плотникова Е.А., Плютинская А.Д., Якубовская Р.И., Лукьянец Е.А., Макарова Е.А., Грин М.А., Миронов А.Ф. // Материалы I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы ФД и ФДТ». – Москва. – 2012. - №1. - С.19-20.

3) Плотникова Е.А. - Изучение наноструктурированной водной дисперсии О-алкоксим-N-алкоксибактериопурпуринимида, предназначенной для ФДТ злокачественных новообразований. Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Грин М.А., Миронов А.Ф. // Материалы 10 конференции «Нанотехнологии в онкологии». – Москва. – 2012.

4) Плотникова Е.А. - Экспериментальная фотодинамическая терапия: 15 лет развития метода. Якубовская Р.И., Морозова Н.Б., Панкратов А.А., Казачкина Н.И., Плютинская А.Д., Кармакова Т.А., Андреева Т.Н., Венедиктова Ю.Б., Плотникова Е.А., Немцова Е.Р., Соколов В.В., Филоненко Е.В., Чиссов В.И., Коган Б.Я., Бутенин А.В., Феофанов А.В., Страховская М.Г. // *Российский химический журнал*. – 2013. - №2. - С. 10-30.

5) Плотникова Е.А. - Изучение нового длинноволнового фотосенсибилизатора О-пропилалкоксим-N-пропоксибактериопурпуринимида в системах *in vitro* и *in vivo*. Якубовская Р.И., Морозова Н.Б., Плотникова Е.А., Грин М.А., Миронов А.Ф. // Материалы Белорусско-Российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». - Минск. – 2013. – Т. 12. - №2. - С. 94.

6) Плотникова Е.А. - Сравнение новых фотосенсибилизаторов в системе *in vitro*. Плютинская А.Д., Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Лукьянец Е.А., Макарова Е.А., Дудкин С.В., Грин М.А., Миронов А.Ф., Феофанов А.В., Сергеева В.С. // Материалы VIII Всероссийского съезда онкологов. - Санкт Петербург. – 2013. – Т. 59. - С. 116-117.

7) Плотникова Е.А. - Экспериментальная фотодинамическая терапия: достижения и перспективы. Якубовская Р.И., Панкратов А.А., Морозова Н.Б., Плютинская А.Д., Андреева Т.Н., Венедиктова Ю.Б., Плотникова Е.А., Лукьянец Е.А., Деркачева В.М., Макарова Е.А., Дудкин С.В., Грин М.А., Миронов А.Ф., Страховская М.Г. // Материалы VIII Всероссийского съезда онкологов. - Санкт Петербург. – 2013. - Т. 59. - С. 148-149.

8) Плотникова Е.А. - Сравнительное изучение новых фотосенсибилизаторов различных классов в системе *in vitro*. Плютинская А.Д., Плотникова Е.А., Якубовская Р.И., Макарова Е.А., Лукьянец Е.А., Дудкин С.В., Грин М.А., Миронов А.Ф. // Материалы II Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы Фотодинамической терапии и Фотодиагностики». – Москва. – 2013. - №3. - С. 28.

9) Плотникова Е.А. - Аминоамиды в ряду бактериохлорофила *a* и их фотоиндуцированная активность в системах *in vitro* и *in vivo*. Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Грин М.А., Миронов А.Ф. // Материалы II Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы Фотодинамической терапии и Фотодиагностики». – Москва. – 2013. - №3. - С. 29-30.

10) Плотникова Е.А. - Новые фотосенсибилизаторы на основе бактериопурпуринимида и их фотоиндуцированная противоопухолевая активность. Грин М.А., Пантюшенко И.В., Плотникова Е.А., Плютинская А.Д., Малыгина А.И., Каширцева И.В., Михайловская А.А., Якубовская Р.И., Каплан М.А., Миронов А.Ф. // Материалы II Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы Фотодинамической терапии и Фотодиагностики». – Москва. – 2013. - №3. - С. 33-34.

11) Plotnikova Ekaterina A. - Photophysical properties and *in vitro* and *in vivo* photoinduced antitumor activity of cationic salts of *meso*-tetra(*N*-alkyl-3-pyridyl)bacteriochlorins. Yakubovskaya Raisa I., Plotnikova Ekaterina A., Plutinskaya Anna D., Morozova Natalya B., Chissov Valery I., Makarova Elena A., Dudkin Semen V., Lukyanets Evgeny A., Vorozhtsov Georgy N. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2014. - P. 109-114.

12) Plotnikova Ekaterina A. - Novel bacteriochlorophyll-based photosensitizers and their photodynamic activity. Grin Mikhail A., Reshetnikov Roman I., Yakubovskaya Raisa I., Plotnikova Ekaterina A., Morozova Nataliya B., Tsigankov Anatoliy A., Efremenko Anastasiya V., Ermakova Dariya E., Feofanov Alexey V., Mironov Andrey F. // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. - 2014. - V. 18. - P. 129-138.

13) Плотникова Е.А. - Новый высокоэффективный ИК-фотосенсибилизатор в ряду бактериохлорофилла *a* для фотодинамической терапии рака. Пантюшенко И.В., Грин М.А., Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Цыганков А.А., Миронов А.Ф. // *Вестник МИТХТ*. – 2014. - Т.9 (3). - С. 3-10.

14) Плотникова Е.А. - Препарат для фотодинамической терапии и способ фотодинамической терапии с его использованием. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Миронов А.Ф., Грин М.А., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Цыганков А.А.. Патент на изобретение № 2521327. Оpubл. 27.06.2014.

15) Плотникова Е.А. - Изучение катионных солей мезо-тетра(*n*-алкил-3-пиридил)бактериохлорофинов в системе *in vitro*. Плотникова Е.А., Плютинская А.Д. // Материалы XII Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». – Москва. – 2014. - №1. - С. 50-51.

16) Плотникова Е.А. - Аминоамиды бактериохлорофилла *a*, обладающие высокой противоопухолевой эффективностью. Грин М.А., Решетников Р.И., Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Феофанов А.В., Ефременко А.В., Ермакова Д.Э., Цыганков А.А., Миронов А.Ф. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике». – Москва. – 2014. - №1. - С.77.

17) Плотникова Е.А. - Перспективный фотосенсибилизатор нового поколения для фотодинамической терапии: мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин. Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Плютинская А.Д., Лукьянец Е.А. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике». – Москва. – 2014. - №1. - С.143.

18) Plotnikova E.A. - Experimental photodynamic therapy: 15 years of development. Yakubovskaya R.I., Morozova N.B., Pankratov A.A., Kazachkina N.I., Plyutinskaya A.D., Karmakova T.A., Andreeva T.N., Venediktova Yu.B., Plotnikova E.A., Nemtsova E.R., Sokolov V.V., Filonenko E.V., Chissov V.I., Kogan B.Ya., Butenin A.V., Feofanov A.V., Strakhovskaya M.G. // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2015. - V. 85 (1). – P. 217-239.

19) Плотникова Е.А. – Аминоамиды в ряду бактериохлорофилла альфа, обладающие фотодинамической активностью, и способ их получения. Миронов А.Ф., Решетников Р.И., Грин М.А., Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Цыганков А.А. Феофанов А.В., Ермакова Д.Э., Ефременко А.В. Патент на изобретение № 2548675. Оpubл. 20.04.2015.

20) Плотникова Е.А. - Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии. Макарова Е.А., Якубовская Р.И., Ворожцов Г.Н., Ластовой А.П., Лукьянец Е.А., Морозова Н.Б., Плотникова Е.А. Патент на изобретение № 2549953. Оpubл. 10.05.2015.

21) Плотникова Е.А. - Поиск новых фотосенсибилизаторов для флуоресцентной диагностики опухолей. Морозова Н.Б., Плотникова Е.А., Шевченко Е.Н., Соловьева Л.И., Лукьянец Е.А., Якубовская Р.И. // Материалы XII Всероссийской научно-практической

конференции: «Отечественные противоопухолевые препараты». – Москва. – 2015. – Т. 14. – №1. – С.110.

22) Плотникова Е.А. - Преимущества длинноволновых фотосенсибилизаторов при лечении опухолей большого размера. Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Ластовой А.П., Макарова Е.А., Лукьянец Е.А., Якубовская Р.И. // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции: «Отечественные противоопухолевые препараты».- Москва. – 2015. – Т. 14. – №1. – С.122.

23) Плотникова Е.А. - Бактериохлорины: от вещества до нового отечественного препарата. Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Ластовой А.П., Макарова Е.А., Лукьянец Е.А., Грин М.А., Миронов А.Ф., Абакумов М.А., Якубовская Р.И. // Материалы IV Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика». – Санкт-Петербург. – 2015. – С.20-21.

24) Плотникова Е.А. - Разработка фотосенсибилизатора нового поколения для фотодинамической терапии злокачественных новообразований. Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Ластовой А.П., Лукьянец Е.А., Якубовская Р.И. // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова. Достижения современной фармакологической науки. – Рязань. – 2015. – С. 233-236.

25) Плотникова Е.А. - Оценка фотофизических свойств и фотоиндуцированной противоопухолевой активности катионных бромидных солей мезо-тетра(п-алкил-3-пиридил) бактериохлорина в системах *in vitro* и *in vivo*. Морозова Н.Б., Плютинская А.Д., Плотникова Е.А., Якубовская Р.И., Каприн А.Д., Макарова Е.А., Дудкин С.В., Лукьянец Е.А., Ворожцов Г.Н. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. – 2015-2016. - Т.26-27. - №4-1. – С. 103-110.

26) Плотникова Е.А. - Серосодержащие производные бактериохлорофилла *a* и наноструктурированные фотосенсибилизаторы на их основе. Грин М.А., Пантюшенко И.В., Островерхов П.В., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Старовойтова А.В., Михайловская А.А., Феофанов А.В., Каплан М.А., Якубовская Р.И., Мажуга А.Г., Миронов А.Ф. // Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». – Москва. – 2016. – Т. 15. – №1. – С.26-27.

27) Плотникова Е.А. - Исследование образца полимерных наночастиц с производным бактериохлорофилла *a* для фотодинамической терапии. Сапельников М.Д., Никольская Е.Д., Плотникова Е.А., Якубовская Р.И., Панов А.В., Миронов А.Ф., Грин М.А. // Материалы V Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика». – Москва. – 2016. – С. 3-4.

28) Плотникова Е.А. - Сравнительная оценка глубины проникновения светового луча в опухолевую ткань при использовании фотосенсибилизаторов хлоринового и бактериохлоринового рядов. Плотникова Е.А., Лукьянец Е.А., Якубовская Р.И. // Материалы V Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика». – Москва. – 2016. – С.12.

29) Плотникова Е.А. - Фотодинамическая терапия с мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорином и радахлорином на модели перевивной опухоли РС-1 у крыс. Плотникова Е.А., Кармакова Т.А., Воронцова М.С., Страмова В.О., Абакумов М.А., Ластовой А.П., Лукьянец Е.А., Якубовская Р.И. // Материалы V Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и Фотодиагностика». – Москва. – 2016. – С.12-13.

30) Плотникова Е.А. - Бактериохлорины: от вещества до нового фотосенсибилизатора. Плотникова Е.А., Грин М.А., Лукьянец Е.А., Якубовская Р.И. // Материалы II Всероссийской конференции по молекулярной онкологии. – Москва. – 2016. – №3(4). – С. 89.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Бхл – субстанции бактериохлоринового ряда
ИК –инфракрасный
ИК₅₀ – концентрация, при которой наблюдается 50% гибель клеток
КИ – критерий излеченности
ЛФС – локальная флуоресцентная спектроскопия
МРТ – магнитно-резонансная томография
ТРО – торможение роста опухоли
УПЖ – увеличение продолжительности жизни
ФДТ – фотодинамическая терапия
ФК – флуоресцентная контрастность
ФН – нормированная флуоресценция
ФС - фотосенсибилизатор
Colo26 – карцинома толстой кишки мыши
Cr EL – Cremophor EL
HEp2 – эпидермоидная карцинома гортаноглотки человека
LLC – карцинома легкого Льюис
PC-1 - альвеолярная слизистая карцинома печени
S37 – саркома S37