

Эффективность в системе *in vitro* гликозилированных производных триметилового эфира хлорина  $e_6$  в зависимости от положения углеводного фрагмента в макроцикле

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ В СИСТЕМЕ *IN VITRO* ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРИНА $e_6$ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛОЖЕНИЯ УГЛЕВОДНОГО ФРАГМЕНТА В МАКРОЦИКЛЕ

Р.И. Якубовская<sup>1</sup>, А.Д. Плютинская<sup>1</sup>, Е.А. Плотникова<sup>1</sup>, М.А. Грин<sup>2</sup>, А.Ф. Миронов<sup>2</sup>, В.С. Сергеева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, г. Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, г. Москва

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, г. Москва

## Резюме

Изучены физико-химические и фотофизические свойства гликоконъюгатов на основе триметилового эфира хлорина  $e_6$  с углеводными заместителями в разных положениях макроцикла, а также их фотоиндуцированная активность относительно опухолевых клеток человека (HEp2, A549 и HT29) и животных (LLC) в системе *in vitro*. Показано, что все фотосенсибилизаторы оставались стабильными в течение длительного времени в темновых условиях. При оценке эффективности соединений выявлено, что наибольшую активность проявлял фотосенсибилизатор с галактозой в пирроле А (величина  $ИК_{50}$  варьировалась от  $27 \pm 2$  до  $75 \pm 5$  нМ в зависимости от клеточной культуры), в то время как наличие остатка углевода в пирроле С снижало фотоиндуцированную активность в 5–10 раз.

**Ключевые слова:** фотодинамическое воздействие, гликозилированные производные хлорина  $e_6$ , фотосенсибилизаторы.

## Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – перспективное направление лечения злокачественных новообразований. Одним из путей усиления эффективности ФДТ является повышение селективности накопления фотосенсибилизаторов (ФС) в опухоли, которое может быть достигнуто за счет связывания молекул красителя с различными системами адресной доставки: моноклональными антителами, липопротеидами, белками и другими векторными молекулами [1]. В качестве лигандов, способных специфически связываться с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, могут также выступать и углеводы.

Известно, что на поверхности опухолевых клеток присутствуют рецепторы, распознающие все типы углеводов. Среди них особое место занимают галектины, представляющие собой белки семейства лектинов, специфичные к  $\beta$ -галактозидам. Галектины встречаются в ядре, в составе цитоплазматической мембраны и в экстрацеллюлярном матриксе. Специфичность галектинов к  $\beta$ -галактозидам обусловлена наличием белков консервативного углеводузнающего домена, включающего около 135 аминокислотных остатков, которые образуют два  $\beta$ -складчатых листа, формирующих полость, способную удерживать линейный тетрасахарид [2, 3]. Поэтому  $\beta$ -галактозидные заместители способны улучшить направленную доставку ФС в клетку путем связывания гликоконъюгатов с галек-

тинами на поверхности клетки [4–6]. Также следует отметить, что присоединение углеводных фрагментов к макроциклическому кольцу придает молекуле амфифильный характер, способствует увеличению растворимости ФС в водных средах [7, 8].

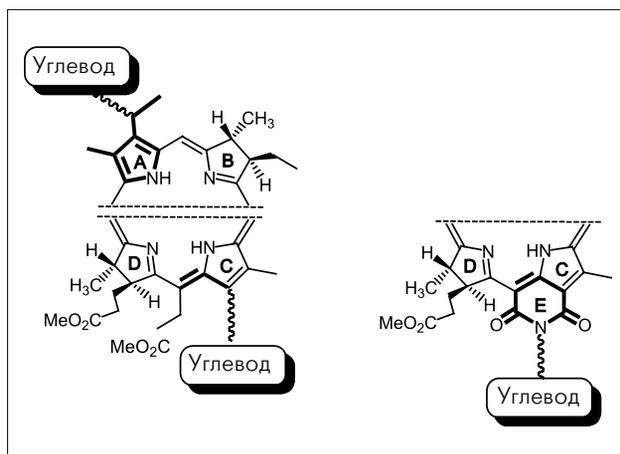
Авторами были синтезированы гликоконъюгаты на основе триметилового эфира хлорина  $e_6$  с углеводными остатками в разных положениях макроцикла и изучены их физико-химические и фотофизические свойства, а также фотоиндуцированная противоопухолевая активность в системе *in vitro*.

## Материалы и методы

### Фотосенсибилизаторы

В качестве фотосенсибилизаторов использовали триметиловый эфир хлорина  $e_6$  (3MeChI) и конъюгаты на его основе с остатком галактозы в пирроле А (3MeChI\_gal\_NoAc), пирроле С (2MeChI\_gal\_NoAc) и экзоцикле Е (MeCycloImChI\_gal\_NoAc) (рис. 1). Синтез фотосенсибилизаторов проведен в МИТХТ им. М.В. Ломоносова [2, 4, 9].

Гликоконъюгаты на основе производных хлорофилла а – гидрофобные соединения, для проведения спектрофотометрических исследований и биологических тестов в системе *in vitro* их растворяли в 100%-ном Кремофоре EL и доводили до концентрации 1 мг/мл 0,9%-ным раствором хлористого натрия. Концентрация Кремофора EL в конечных растворах составляла 5%.



**Рис. 1.** Способы присоединения углеводных остатков к макроциклическому кольцу триметилового эфира хлорина  $e_6$

### Исследования в системе *in vitro*

#### Методика проведения абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии фотосенсибилизаторов в растворах.

Спектры поглощения исследованных фотосенсибилизаторов в культуральной среде регистрировали на спектрофотометре «Genesys 2» (США) в диапазоне волн длиной от 450 до 850 нм сразу после приготовления растворов, через 0,5; 2; 4 и 24 ч. Концентрация фотосенсибилизаторов в растворе составляла 10 мкг/мл. Растворителем служила среда Игла-МЕМ, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). В ходе исследования оценивали изменения оптической плотности и характер спектра в выбранном временном диапазоне.

Флуоресценцию регистрировали контактным способом на лазерном спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей «ЛЭСА-6» (ТОО «БИО-СПЕК», Россия). Возбуждали флуоресценцию He-Ne лазером при волне генерации длиной 632,8 нм, спектральный диапазон составлял 300–900 нм. Регистрацию спектров флуоресценции проводили сразу после приготовления растворов, через 0,5; 2; 4 и 24 ч. Выбранная концентрация (2,5 мкг/мл) достигалась путем последовательного разведения исходного раствора. В качестве растворителя использовали среду Игла-МЕМ, содержащую 10% ЭТС. Оценивали изменения в интенсивности флуоресценции и характер спектра.

#### Методика оценки фотостабильности фотосенсибилизаторов в бесклеточной среде

В опытах использовали растворы фотосенсибилизаторов, концентрация красителей в них составляла 2,5 мкг/мл. Растворы готовили непосредственно перед проведением опыта с использованием среды Игла-МЕМ, содержащей 10% ЭТС.

В лунки плоскодонного 96-луночного микропланшета (Corning, США) вносили по 150 мкл раствора. Источником оптического излучения служила галогеновая лампа мощностью 500 Вт, использовался широкополосный фильтр КС-10 ( $\lambda \geq 620$  нм) и водный фильтр

толщиной 5 см. Плотность мощности составляла 17,0–17,5 мВт/см<sup>2</sup>, а световая доза – 5 и 10 Дж/см<sup>2</sup>. Интенсивность флуоресценции оценивали до и после облучения в диапазоне 600–800 нм.

#### Методика проведения фотодинамического воздействия (ФДВ) на опухолевые клетки

Исследования проводили на опухолевых клетках человека, полученных из НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН: эпидермоидной карциноме гортаноглотки (HEp2), аденокарциноме легкого (A549) и карциноме толстой кишки (HT29), а также на опухолевых клетках мыши – карциноме легкого Льюис (LLC), выделенных из солидной опухоли и адаптированных для культивирования в системе *in vitro*. Для пассирования клеток и проведения экспериментов использовали среду Игла-МЕМ с добавлением 2 мМ L-глутамин и 8–10% эмбриональной телячьей сыворотки. Культивировали клетки при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>.

Клетки рассеивали в лунки плоскодонного 96-луночного микропланшета (Corning, США) в концентрации  $0,7 \times 10^5$  кл/мл, затем инкубировали в течение 28–30 ч в термостате. Далее в лунки планшета вносили тестируемые соединения, варьируя их концентрацию от 5 нМ до 10 мкМ. Для оценки фототоксичности через 0,5; 2; 4 и 6 ч инкубации с фотосенсибилизаторами клетки облучали галогеновой лампой через широкополосный фильтр КС-10 ( $\lambda \geq 600$  нм) и водяной фильтр толщиной 5 см, оснащенный системой циркуляции жидкости. Плотность мощности составляла 17,0–17,5 мВт/см<sup>2</sup>, расчетная световая доза – 10 Дж/см<sup>2</sup>. После воздействия клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Для оценки цитотоксической активности клетки помещали в затемненные условия на 24 ч. Оценку выживаемости проводили как визуально, с помощью световой микроскопии, отмечая морфологические изменения клеток, так и колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [10]. Биологически значимым эффектом считали ингибирование роста клеток в культуре более чем на 50%. Уровень ингибирования роста клеток вычисляли по формуле

$$IP = [(OD_k - OD_o) / OD_k] \cdot 100,$$

где IP – уровень ингибирования роста клеток в культуре, %; OD<sub>o</sub> – оптическая плотность в опытных лунках; OD<sub>k</sub> – оптическая плотность в контрольных лунках без воздействия,  $\lambda = 550$  нм. Данную величину рассчитывали как среднюю по результатам трех независимых тестов.

## Результаты исследования

### Исследованные соединения

При поиске эффективных фотосенсибилизаторов направленного действия были синтезированы гликоконъюгаты на основе хлорина  $e_6$  с углеводными остатками в разных положениях макроцикла: конъюгат с остатком галактозы в пирроле А (3MeChl\_gal\_NoAc), пирроле С (2MeChl\_gal\_NoAc) и экзоцикле Е

(MeCycloImChI\_gal\_NoAc). Для их сравнения использовали триметилловый эфир хлорина  $e_6$  (3MeChI), не содержащий углеводных заместителей. Поскольку физико-химические и фотофизические свойства ФС в значительной степени определяют как фотоиндуцированную активность красителей, так и их перспективность для фармакологии, то на первом этапе проводили спектрофотометрические исследования, оценивая стабильность гликоконъюгатов при хранении в темновых условиях и при облучении, что является одним из основных требований, предъявляемых к фотосенсибилизаторам.

### Физико-химические и фотофизические свойства гликоконъюгатов

Фотосенсибилизаторы 3MeChI и 3MeChI\_gal\_NoAc имеют максимумы поглощения и флуоресценции в области 665–670 нм; наличие имидного экзоцикла в структуре MeCycloImChI\_gal\_NoAc способствует сдвигу максимума в значительной степени в более длинноволновую область ( $\lambda_{\max} = 699 \pm 2$  нм), а введение остатка галактозы в пиррол С (2MeChI\_gal\_NoAc) приводит к смещению максимума поглощения на 10–12 нм влево ( $\lambda_{\max} = 654 \pm 3$  нм).

При изучении спектров поглощения и флуоресценции во времени установлено, что все производные хлорина  $e_6$  стабильны в течение 24 ч инкубации при комнатной температуре в затемненных условиях.

Фотосенсибилизаторы в бесклеточной среде подвержены фотовыцветанию, что сопровождается снижением интенсивности флуоресценции в максимуме (рис. 2). Следует отметить, что конъюгаты с остатком галактозы в пиррольном цикле А и экзоцикле Е оказались более устойчивыми. Так, при облучении энергией плотностью 5 Дж/см<sup>2</sup> интенсивность флуоресценции данных флуорохромов снижалась незначительно (в 1,3–1,4 раза) относительно показателя, детектированного до воздействия светом, и при дальнейшем увеличении плотности энергии до 10 Дж/см<sup>2</sup> оставалась неизменной.

### Фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов

На следующем этапе изучали и оценивали фотоиндуцированную активность и темновую цитотоксичность гликоконъюгатов на культурах опухолевых клеток различного генеза в зависимости от концентрации соединений и времени инкубации. Все

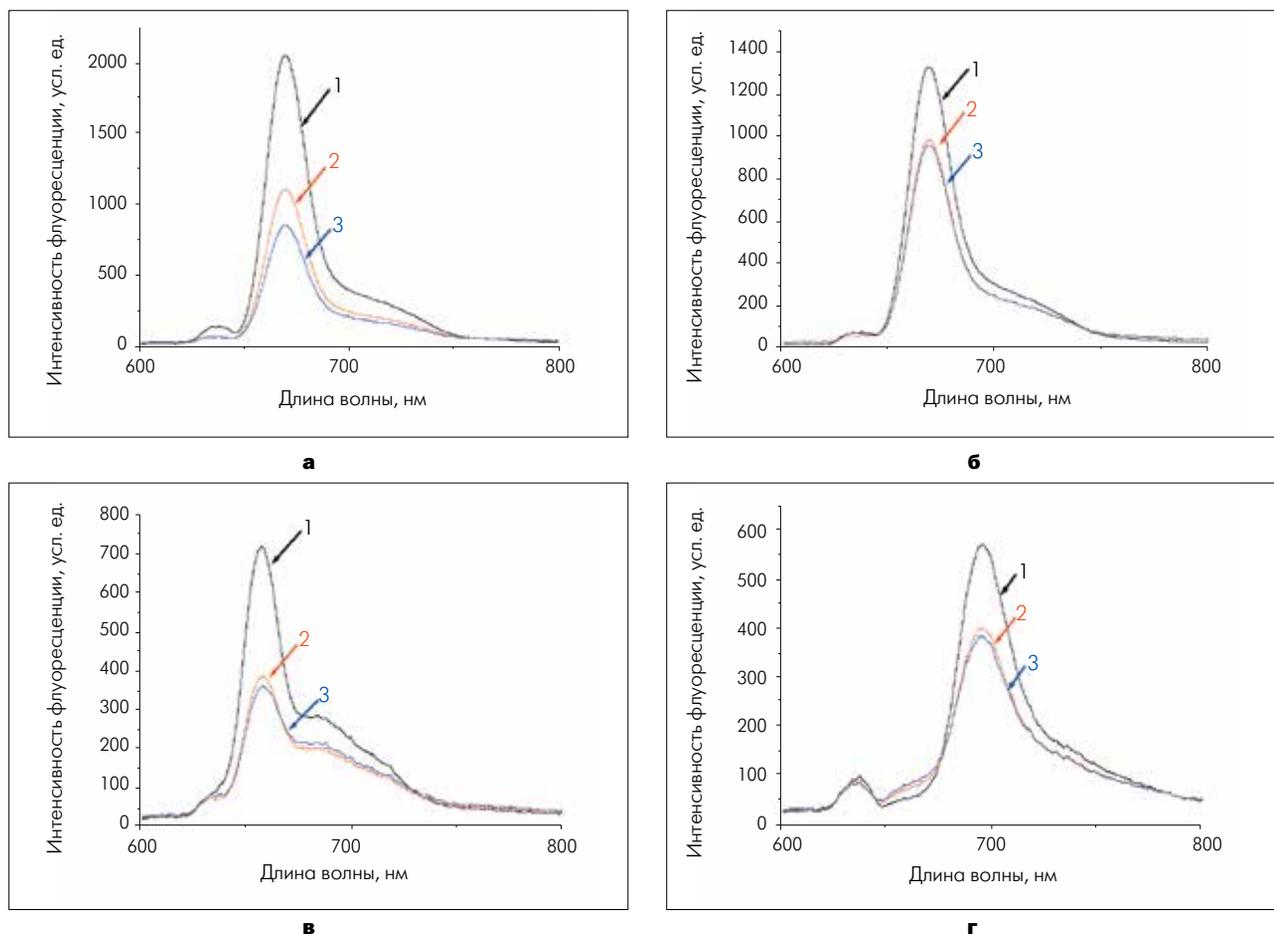
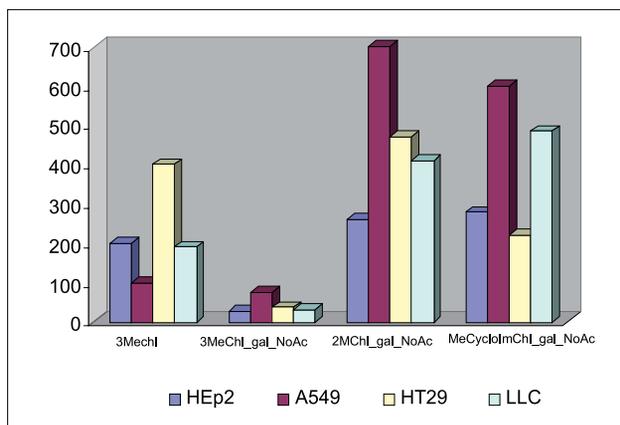


Рис. 2. Спектры флуоресценции 3MeChI (а), 3MeChI\_gal\_NoAc (б), 2MeChI\_gal\_NoAc (в), MeCycloImChI\_gal\_NoAc (г) до воздействия светом (1), при облучении с плотностью энергии 5 Дж/см<sup>2</sup> (2) и 10 Дж/см<sup>2</sup> (3) в культуральной среде



**Рис. 3.** Фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов на клеточных культурах HEp2, A549, HT29 и LLC (время инкубации 4 ч)

фотосенсибилизаторы проявили высокую фотоиндуцированную активность относительно клеток в культуре, без светового воздействия красители не оказывали цитотоксического действия на клетки. Максимальное время накопления ФС в клетках составило 4 ч, при увеличении временного интервала до 6 ч величина  $ИК_{50}$  изменялась незначительно (рис. 3).

Среди гликоконъюгатов наибольшей фотоиндуцированной активностью обладал ФС с углеводным фрагментом в пирроле А ( $ИК_{50} = 27 \pm 2, 75 \pm 5, 38 \pm 3$  и  $31 \pm 2$  нМ для клеток HEp2, A549, HT29 и LLC, соответственно), что в 7,4; 1,3; 10,5 и 6,1 раза, соответственно, выше, чем у негликозилированного триметилового эфира хлорина  $e_6$ . Введение остатка галактозы в пиррол С и экзоцикл Е уменьшает фотоактивность ФС на порядок.

Таким образом, фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов относительно клеток культур

HEp2, A549, HT29 и LLC существенным образом зависит от положения углеводных заместителей в макроцикле.

Удаление фотосенсибилизаторов из культуральной среды перед воздействием светом позволяет оценить вклад фотоиндуцированного повреждения, обусловленного красителем, накопившимся внутри клеток. Удаление конъюгата с остатком галактозы в пирроле А из культуральной среды перед воздействием света не приводило к изменению эффективности фотодинамического воздействия. Это косвенно свидетельствует о том, что уже через 4 ч после внесения ФС фотоиндуцированная цитотоксичность реализуется преимущественно за счет активации внутриклеточного красителя. Удаление остальных флюорохромов значительно снижало эффективность фотодинамического воздействия (таблица).

### Заключение

Таким образом, проведенные исследования по изучению фотоиндуцированной активности производных хлорофилла а с углеводными остатками в системе *in vitro* показали, что наиболее эффективным, приводящим к значительному увеличению фотоиндуцированной активности, оказалось введение остатка углевода в пиррол А хлоринового макроцикла (величина  $ИК_{50}$  составила  $27 \pm 2$  нМ), тогда как наличие углеводного остатка в пирроле С или в экзоцикле Е значительно снижало фотоиндуцированную активность соединений. По-видимому, изменение положения углеводного остатка в макроцикле влияет на эффективность трансмембранного переноса гликоконъюгатов и их внутриклеточную локализацию.

#### Таблица

Фотоактивность в зависимости от присутствия фотосенсибилизатора в среде инкубации во время облучения (культура HEp2, время инкубации 4 ч)

Фотосенсибилизатор	Величина $ИК_{50}$ , нМ, при	
	облучении с ФС в среде инкубации	облучении без ФС в среде инкубации (удаление непосредственно перед облучением)
3MeChI	200 $\pm$ 12	280 $\pm$ 17
3MeChI_gal_NoAc	27 $\pm$ 2	29 $\pm$ 3
2MeChI_gal_NoAc	260 $\pm$ 15	640 $\pm$ 22
MeCycloImChI_gal_NoAc	280 $\pm$ 14	690 $\pm$ 24

\* 3MeChI – триметиловый эфир хлорина  $e_6$ ; 3MeChI\_gal\_NoAc – конъюгат на основе триметилового эфира хлорина  $e_6$  с остатком галактозы в пирроле А; 2MeChI\_gal\_NoAc – конъюгат на основе триметилового эфира хлорина  $e_6$  с остатком галактозы в пирроле С; MeCycloImChI\_gal\_NoAc – конъюгат на основе триметилового эфира хлорина  $e_6$  с остатком галактозы в экзоцикле Е; ФС – фотосенсибилизатор.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соровский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 32–40.
2. Grin M.A., Lonin I.S., Makarov A.I. et al. Synthesis of chlorin-carbohydrate conjugates by «click chemistry» // Mendeleev Commun. – 2008. – Vol. 18. – No. 3. – P. 135–137.
3. Zhang M., Zhang Z., Blessington D. et al. Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters // Bioconjugate Chem. – 2003. – V. 14(4). – P. 709–714.
4. Grin M.A., Lonin I.S., Lakhina A.A., Ol'shanskaya E.S. et al. 1,3 – dipolar cycloaddition in the synthesis of glycoconjugates of natural chlorins and bacteriochlorins // J. Porphyrins Phthalocyanines. – 2009. – Vol. 13. – P. 336–345.
5. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment // Medicina. – 2003. – V. 39 (12). – P. 1137–1150.
6. Park Y.K., Bold B., Cui B.C. et al. Binding Affinities of Carbohydrate-Conjugated Chlorins for Galectin-3 // Bull. Korean Chem. Soc. – 2008. – V. 29 (1). – P. 130–134.
7. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy // Tetrahedron. – 2001. – V. 57 (47). – P. 9513–9547.
8. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W. et al. Photodynamic therapy // J. Natl. Cancer I. – 1998. – V. 90 (12). – P. 889–905.
9. Grin M.A., Lonin I.S., Lakhina A.A., Mironov A.F. Cross-metathesis of olefins in a synthesis of glycoconjugates based on chlorophyll a derivatives // Mendeleev Communication. – 2012. – V. 22. – P. 157–158.
10. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F. et al. // Cancer Res. – 1987. – Vol. 47. – P. 936–942.

# INFLUENCE OF THE CARBOHYDRATE FRAGMENT POSITION IN THE MACROCYCLE OF CHLORINE $e_6$ TRIMETHYL ESTER GLYCOSYLATED DERIVATIVES ON THEIR IN VITRO PHOTO-INDUCED ACTIVITY

Yakubovskaya RI<sup>1</sup>, Plyutinskaya AD<sup>1</sup>, Plotnikova EA<sup>1</sup>, Grin MA<sup>2</sup>, Mironov AF<sup>2</sup>, Sergeeva VS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Moscow

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow

<sup>3</sup> N.I. Pirogov Russian State Medical University, Moscow

The physicochemical and photophysical properties, as well as photo-induced activity, of glycoconjugates based on chlorine  $e_6$  trimethyl ether with various positions of carbohydrate fragment in the macrocycle have been studied. The photo-induced activity was investigated in the human (HEp2, A549 and HT29) and animal (LLC) cell lines. The tested compounds showed *in vitro* both high photo-induced activity and high stability in the dark. The photosensitizer with galactose in the A pyrrole ring demonstrated the highest activity (the half maximal inhibitory concentration (IC50) varied from 27±2 nM to 75±5 nM in tests on different cell lines). Dyes with sugar substitutes in the C pyrrole ring were 5–10 times less active.

**Keywords:** photodynamic exposure, chlorin-carbohydrate conjugates, photosensitizers.

**Контакты:** Плютинская А.Д. E-mail: anna2031@rambler.ru