

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ МОНОКАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО ХЛОРИНА е6 – ПЕРСПЕКТИВНОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Н.Ю. Жидоморов¹, О.А. Назаренко¹, В.И. Демидов¹, А.В. Кустов^{2,3}, Н.В. Кукушкина^{2,3},
О.И. Койфман^{2,3}, А.К. Гагуа⁴, И.К. Томилова¹, Д.Б. Березин³

¹Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Иваново, Россия

²Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, Иваново, Россия

³«Ивановский государственный химико-технологический университет», НИИ

Макрогетероциклов, Иваново, Россия

⁴«Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии» ФМБА, Москва, Россия

Резюме

На белых крысах изучены особенности острой токсичности химически модифицированного производного природного пигмента хлорофилла а монокатионного хлорина е6 – перспективного фотосенсибилизатора (ФС) для антимикробной и противоопухолевой фотодинамической терапии. Преимуществами ФС являются интенсивное поглощение в длинноволновой области видимого спектра, достаточно высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода, выраженные амфифильные свойства наряду с хорошей растворимостью в воде и высокий уровень фотоцитотоксичности в отношении как злокачественных клеток линии *HeLa*, так и антибиотикорезистентных госпитальных штаммов бактерий *E. coli*, *P. Aeruginosa* и других. Величина ЛД₅₀ для монокатионного хлорина е6 составляет 100 мг/кг массы тела. В воспроизведенной экспериментальной модели острой токсичности патоморфологические изменения жизненно важных органов лабораторных животных свидетельствуют о выраженном вазопатическом действии препарата с развитием отека головного мозга и респираторного дистресс-синдрома, ставшими основными звеньями танатогенеза.

Ключевые слова: антимикробная фотодинамическая терапия, противоопухолевая фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, хлорины, острая токсичность.

Для цитирования: Жидоморов Н.Ю., Назаренко О.А., Демидов В.И., Кустов А.В., Кукушкина Н.В., Койфман О.И., Гагуа А.К., Томилова И.К., Березин Д.Б. Исследование острой токсичности монокатионного производного хлорина е6 – перспективного фотосенсибилизатора для антимикробной и противоопухолевой фотодинамической терапии // *Biomedical Photonics*. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 23–32. doi: 10.24931/2413-9432-2022-11-2-23-32.

Контакты: Березин Д.Б., e-mail: berezin@isuct.ru

STUDY OF ACUTE TOXICITY OF MONOCATIONIC CHLORIN e6 DERIVATIVE, A PERSPECTIVE PHOTOSENSITIZER FOR ANTIMICROBIAL AND ANTITUMOR PHOTODYNAMIC THERAPY

Zhidomorov N.Yu.¹, Nazarenko O.A.¹, Demidov V.I.¹, Kustov A.V.^{2,3}, Kukushkina N.V.^{2,3},
Koifman O.I.^{2,3}, Gagua A.K.⁴, Tomilova I.K.¹, Berezin D.B.³

¹Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia

²G.A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ivanovo, Russia

³Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Research Institute of
Macrocyclics, Ivanovo, Russia

⁴National Medical Research Center for Otorhinolaryngology of the Federal Medico-
Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

Abstract

In this experimental work the acute toxicity of a chemically modified derivative of the natural pigment chlorophyll a called monocationic chlorin e6, which is a promising photosensitizer (PS) for antimicrobial and antitumor photodynamic therapy, was studied using white rats. The advantages of the PS under investigation are an intense absorption in the long-wavelength region of the visible spectrum, a sufficiently high quantum yield of singlet oxygen generation, pronounced amphiphilic properties along with an appropriate solubility in water, and a high level of photocytotoxicity in relation to both malignant *HeLa* cells and antibiotic-resistant hospital strains of *E. coli* bacteria, *P. aeruginosa* and others. It has been shown that the value of LD_{50} of the considered PS can be calculated as the value of 100 mg/kg. In the reproduced experimental model of acute toxicity, pathomorphological changes in the vital organs of laboratory animals indicate a pronounced vasopathic effect of the drug with the development of cerebral edema and respiratory distress syndrome, which have become the main signs of thanatogenesis.

Key words: antimicrobial photodynamic therapy, antitumor photodynamic therapy, photosensitizer, chlorins, acute toxicity.

For citations: Zhidomarov N.Yu., Nazarenko O.A., Demidov V.I., Kustov A.V., Kukushkina N.V., Koifman O.I., Gagua A.K., Tomilova I.K., Berezin D.B. Study of acute toxicity of monocationic chlorin e6 derivative, a perspective photosensitizer for antimicrobial and antitumor photodynamic therapy, *Biomedical Photonics*, 2022, vol. 11, no. 2, pp. 23–32. doi: 10.24931/2413–9432–2022–11-2-23-32.

Contacts: Berezin D.B., e-mail: berezin@isuct.ru

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой высокотехнологичный малоинвазивный подход к лечению широкого спектра онкологических заболеваний и локализованных микробных инфекций, который может использоваться как самостоятельно, так и в комплексе с хирургическим методом, лекарственной и лучевой терапией [1–14]. Важными преимуществами ФДТ, кроме ее низкой инвазивности, являются отсутствие резистентности опухолевых и микробных клеток к проводимому лечению, а также способность ФДТ вызывать иммунный ответ организма [2, 4, 5, 9, 11].

Метод основан на селективном накоплении в малигнизированных и микробных клетках малотоксичных пигментов – фотосенсибилизаторов (ФС), способных под действием видимого света взаимодействовать с молекулярным кислородом 3O_2 , запуская каскад фотохимических реакций. Это приводит к эффективной генерации активных форм кислорода (АФК) и уничтожению патогенных микроорганизмов или опухолевых клеток [1–3, 10–15]. В зависимости от природы ФС генерация АФК может протекать по одному из двух механизмов: с образованием синглетного кислорода 1O_2 или кислородсодержащих радикальных частиц, в частности, OH^\bullet и $O_2^{\bullet-}$ [1, 11, 15]. Люминесцентное красное свечение малигнизированной ткани под действием видимого излучения в результате селективного накопления в ней ФС применяется для флуоресцентной диагностики (ФД) опухолей [7, 12].

К настоящему времени в клинической практике применяется целый ряд ФС для диагностики и лечения пациентов с онкологическими заболеваниями и бактериальными инфекциями [1, 6, 8, 11, 16]. Большинство из ФС представляют собой макрогетероциклические соединения класса порфиринов, фталоцианинов, хлоринов или бактериохлоринов [16–20], а также ряд производных 5-аминолевулиновой кислоты. Важно отметить, что практически все созданные

ранее препараты для ФДТ, ориентированные на борьбу с онкологическими заболеваниями, содержат в составе молекул заместители неионогенной или анионной природы [11, 21].

Исследования последних лет направлены, прежде всего, на разработку и тестирование новых более эффективных ФС третьего поколения [12, 22]. Основными современными требованиями к ФС помимо интенсивного поглощения видимого излучения в области «терапевтического окна» биологических тканей (600–850 нм) и эффективной генерации АФК являются хороший гидрофильно-липофильный баланс, предполагающий одновременную водо- и жирорастворимость (амфифильность) ФС, невысокая стоимость, устойчивость лекарственных форм при хранении и, что наиболее важно, низкая темновая и выраженная фоточитотоксичность препаратов.

Проведение антимикробной ФДТ предъявляет к ФС ряд специфических требований, основным из которых является наличие в структуре молекулы одной или нескольких катионных групп, положительный заряд которых существенно повышает аффинность препаратов к клеточной стенке микроорганизмов, в первую очередь грамотрицательных патогенных бактерий [9–12, 23], поскольку используемые для противоопухолевой ФДТ препараты оказались малоэффективными при фотоинактивации грамотрицательных микроорганизмов [11].

Ранее нами была проведена серия систематических мультидисциплинарных исследований по получению и исследованию растворимых в воде или в водных растворах поверхностно-активных веществ (ПАВ) ФС порфиринового и хлоринового ряда. Работы включали синтез ФС, оценку генерации ими синглетного кислорода [24–26], определение растворимости, гидрофильно-липофильного баланса и изучение взаимодействия ФС с потенциальными носителями на основе биосовместимых полимеров и мицеллярных ПАВ

[27–32]. Также изучалась темновая и фотоиндуцированная токсичность препаратов *in vitro* и *in vivo* в отношении опухолевых клеток и условно патогенных штаммов микроорганизмов [14, 25, 26, 33, 34]. В ходе проведенных исследований было показано, что ФС с катионными группами обладают выраженной фототоксичностью в отношении грамотрицательной бактериальной микрофлоры [27, 28, 33, 34] как *in vitro*, так и *in vivo*. Было установлено, что монокатионные производные хлорина е6 позволяют эффективно инактивировать культуры опухолевых клеток *in vitro* [12, 35], в то время как трикатионные хлорины обладают слабым цитотоксическим действием.

Наилучшим сочетанием характеристик по совокупности перечисленных выше требований обладают несколько изученных соединений, в частности, монокатионное производное хлорина е6 (соединение I). Этот ФС достаточно хорошо растворим в бидистиллированной воде (более 1 ммоль/кг при 25°C), а в водных растворах потенциальных средств доставки – Твин 80 или поливинилпирролидона (ПВП), его растворимость возрастает в несколько раз. Он обладает интенсивным поглощением в красной области спектра (660 нм) и в неводных средах эффективно генерирует синглетный кислород с величиной квантового выхода ~0,6 [27], обладает хорошим гидрофильно-липофильным балансом с коэффициентом распределения в системе «1-октанол/фосфатно-солевой буфер», равным 8,6±0,2 при температуре 298 К [27, 29], достаточно прочно связывается с мицеллами неионогенного ПАВ Твин 80 ($K_b = 4,57 \pm 0,22$ в области концентраций ФС ~0,01 ммоль/кг), локализуясь преимущественно вблизи поверхности мицелл [30, 31], а также обладает выраженным фотоиндуцированным противоопухолевым (в отношении клеток *HeLa in vitro*) [35] и антимикробным действием в отношении как грамположительной (*St. aureus*), так и грамотрицательной (*E. coli*) патогенной флоры *in vitro* [27, 33].

Индекс выживаемости (%) раковых клеток *HeLa in vitro* при содержании ФС 1 мкмоль/л после облучения красным светом (660 нм, доза 12 Дж/см²) составил лишь 3,71±0,11 [33], что свидетельствует о выраженной фотоиндуцированной противоопухолевой активности препарата. Авторами была показана фототоксичность соединения I в отношении музейных штаммов микроорганизмов [25, 31], причем при концентрации микробных клеток 10³ КОЕ и облучении их красным светом (660 нм, $C_{oc} = 50$ мкмоль/л) в дозе 40 Дж/см² была достигнута полная инактивация грамположительной микрофлоры (*St. aureus*), тогда как количество грамотрицательных бактерий (*E. coli*) не снижалось. Использование добавок, способствующих дестабилизации внешней мембраны микроорганизмов (Твин 80, трилон Б) и/или увеличение концентрации ФС приводило к полной фотоинактивации микробов в ходе эксперимента [25].

Результаты проведенных исследований показывают, что соединение I имеет хороший потенциал для использования в качестве ФС для ФДТ. Это диктует необходимость изучения эффектов, связанных с токсическим воздействием препарата на живой организм в целом, его органы и системы. Проведенные ранее исследования указывают на крайне низкую токсичность анионных ФС для ФДТ на основе хлорина е6 [8, 21, 22, 31]. В частности, один из наиболее часто используемых ФС хлоринового ряда фотолон имеет величину летальной дозы ЛД₅₀ порядка 180 мг/кг массы тела, что в 100 раз выше обычно используемых доз при проведении ФДТ [21]. Однако наличие в соединении I катионной группы может заметно увеличить цитотоксичность ФС. Таким образом, информация об особенностях его воздействия на организм крайне необходима для проведения дальнейших доклинических испытаний препарата. Целью настоящей работы является изучение острой токсичности ФС, оценка величины ЛД₅₀ и исследование механизмов танатогенеза монокатионного хлорина е6.

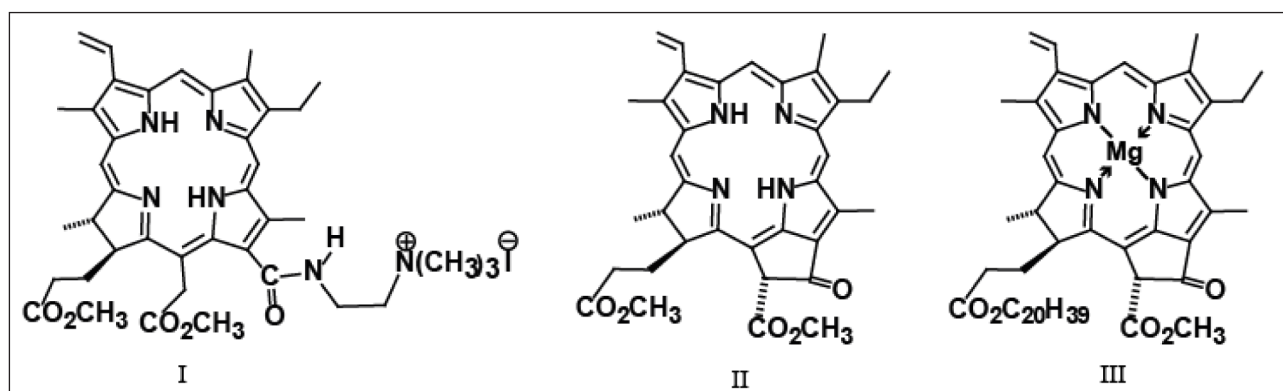


Рис. 1. Объект исследования и природные источники хлорина е6: I – хлорин е6 13(1)-N-(2-N’N’N’-триметиламмониетил) амид 15(2), 17(3)-диметилэтер (соединение I); II – метилфеофорбид а; III – хлорофилл а.

Fig. 1. Objects of study and natural sources of chlorin e6: I – chlorin e6 13(1)-N-(2-N’N’N’-trimethylammonioethyl) amide-15(2),17(3)-dimethyl ester (comp. I); II – methylpheophorbide a; III – chlorophyll a.

Материалы и методы

Синтез хлорина (соединение I) осуществлялся из метилфеофорбида а (соединение II) по описанной двухстадийной методике [25, 33, 34]. Метилфеофорбид а получали путем демееталлирования и частичного кислотного гидролиза хлорофилла а (соединение III), экстрагированного из цианобактерии *Spirulina Platensis* [35]. Чистота полученного конечного продукта массой более 500 мг спектрально идентифицированного методами ядерного магнитного резонанса (^1H ЯМР, Bruker 500 Avance III) и масс-спектрометрии (МАЛДИ, MALDI-TOF Shimadzu Axima Confidence) была не менее 95%.

В предварительном исследовании препарата с целью подбора доз для дальнейшего определения острой токсичности участвовали 11 белых беспородных крыс-самок массой от 200 до 230 г. Эксперимент проводили в ноябре – декабре.

Двум крысам вводили потенциальный носитель (Твин-80) по 1 мл 1% и 3% водного раствора, содержащего соответственно 10 и 30 мг вещества.

Растворы ФС готовили по массе следующим образом: навеску твердого ФС перемешивали с расчетным количеством Твин-80, затем к полученной вязкой массе медленно добавляли дважды дистиллированную воду, раствор гомогенизировали ультразвуком (УЗ-гомогенизатор «Sonopuls» (Bandelin, Германия)), после чего полученные растворы центрифугировали (3000 об/мин) для удаления пузырьков воздуха.

Приготовленный таким образом водный раствор изучаемого препарата, содержащий различные дозы ФС в соответствии с табл., а также 1% солюбилизатора Твин-80, был введен 9 крысам (№№1 – 9). Объем инъекции во всех случаях составлял 1 мл. Крысам №7 и №9 препарат был введен внутривенно, остальным – в хвостовую вену (табл.).

Животные, получившие инъекции Твин-80, в том числе в количествах, превышающих рабочую концентрацию солюбилизатора (1%), не продемонстрировали каких-либо поведенческих изменений в течение всего периода наблюдений, что свидетельствовало о малой токсичности этого биосовместимого ПАВ.

У крыс, получивших препарат катионного хлорина внутривенно в дозе более 75 мг/кг массы тела, на следующий день развилась гиперемия ушей, других особенностей, связанных с путём введения, не отмечалось. Одно животное (№9, получившее дозу 150 мг/кг) на вторые сутки погибло, вскрытие произведено в день смерти. Эвтаназия остальных животных выполнялась спустя 2 нед после инъекции ФС методом резкого смещения шейных позвонков с последующим вскрытием и забором на гистологическое исследование головного мозга, легких, сердца, печени и почек.

Таблица

Величина доз ФС, введенного крысам на первом этапе исследования

Table

The amount of PS doses administered in rats at the first stage of the study

№ животного Number of animal	Доза (мг/кг массы тела) Dose (mg/kg of body weight)
1	5
2	10
3	20
4	30
5	50
6	75
7	100
8	125
9	150

В основном эксперименте, проводившемся в мае – июне 2021 г., участвовали 15 белых беспородных крыс-самок (питомник: филиал «Андреевка» ФГБУН науки «Центр биомедицинских технологий» ФМБА) массой от 190 до 220 г.

Животные были разделены на 3 группы по 5 крыс в каждой. Раствор монокаатионного хлорина еб вводился однократно внутривенно в утренние часы в следующих дозах: группа I – 100 мг/кг, группа II – 125 мг/кг, группа III – 150 мг/кг массы тела с последующим наблюдением.

У всех погибших животных в день смерти, у выживших – через 14 сут после инъекции монокаатионного хлорина еб произведено вскрытие и забор для последующего гистологического исследования головного мозга, легких, сердца, печени, почек и селезенки. Забой производился методом резкого смещения шейных позвонков.

После извлечения органов было выполнено гистологическое исследование секционного материала. В группах II и III все животные погибли через 1,5–3 сут, в группе I до окончания эксперимента погибли 2 крысы, на 4-е и 6-е сутки соответственно. Аутопсия погибших животных осуществлялась в пределах первых суток. Оставшиеся живыми в группе I три крысы на 14-е сутки были подвергнуты одномоментной декапитации с последующей безотлагательной секцией. В ходе аутопсий проводили краниотомию, головной мозг извлекали целиком и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Через одни сутки с помощью фронтальных разрезов выделяли зону прецентральной извилины переднего мозга, мозжечок, ствол головного мозга. При вскрытии грудной

и брюшной полостей сердце, печень, почки, надпочечники и селезенку также извлекали целиком и подвергали первичной фиксации. После вторичной фиксации и промывки фрагментов органов проводку (обезживание) материала осуществляли с помощью 99% изопропилового спирта. Кусочки органов заливали парафином, изготовленные на санном микротоме «Microm» гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Морфологический анализ проводили на исследовательском микроскопе «Micros» MC-200, микрофотографии получены с помощью цифровой окулярной камеры DCM 900.

Результаты и их обсуждение

При проведении предварительного исследования на вторые сутки после инъекции был зафиксирован летальный исход только у крысы, получившей препарат в дозе 150 мг/кг массы тела, остальные животные выжили. При проведении основного эксперимента практически сразу после инъекции наблюдалось некоторое ухудшение общего состояния животных: вялость, сонливость, мышечная слабость. Выраженность описанных симптомов коррелировала с полученной дозой исследуемого вещества и усиливалась с ее повышением.

В течение следующих двух суток у всех 10 животных групп II и III наступил летальный исход. В группе I после введения препарата погибли 2 крысы, падеж отмечен на 3-и и на 6-е сутки. Ещё у одной крысы группы I в течение 5–6-х суток эксперимента отмечены мышечная слабость, вздрагивания, взъерошенная и несколько потускневшая шерсть. У остальных животных группы I выраженных внешних изменений не наблюдалось. Таким образом, в группе I погибло 2 крысы из 5-и, доза ФС, равная 100 мг/кг массы тела, можно считать близкой к ЛД₅₀. Для более достоверных выводов следует увеличить число наблюдений.

При гистологическом исследовании органов были получены следующие данные.

Группа I (монокатионный хлорин е6 в дозе 100 мг/кг): у 3-х крыс, доживших до окончания эксперимента, в головном мозге наблюдается умеренно выраженное полнокровие посткапиллярного звена микроциркуляторного русла (МЦР), сопровождающееся паретическим расширением венул, и периваскулярный отек нервной ткани полушарий большого мозга. В коре прецентральной извилины и в коре мозжечка сохранена стратификация слоев, большинство пирамидных нейронов и грушевидных клеток Пуркинье с четкими контурами ядер и цитоплазматических гранул Ниссля при равномерном распределении макроглиальных элементов. Исключение составляют нейроны ствола головного мозга, часть которых имеет формат обратимого ишемического повреждения в виде уменьшения

объема цитоплазмы, гиперхромии ядер, набухания аксонов на фоне перичеллюлярного отека нервной ткани (рис. 2).

На макроскопическом уровне полость левого желудочка сердца концентрически сужена, правый желудочек умеренно дилатирован, содержит жидкую кровь. Микроскопическое исследование: просветы сосудов МЦР расширены, заполнены эритроцитами, без признаков агрегации; сократительные волокна миокарда равномерной окраски, с четкими контурами и поперечной исчерченностью.

Легкие пастозные (тестоватой консистенции), занимают 90% объема плевральных полостей. У животных,

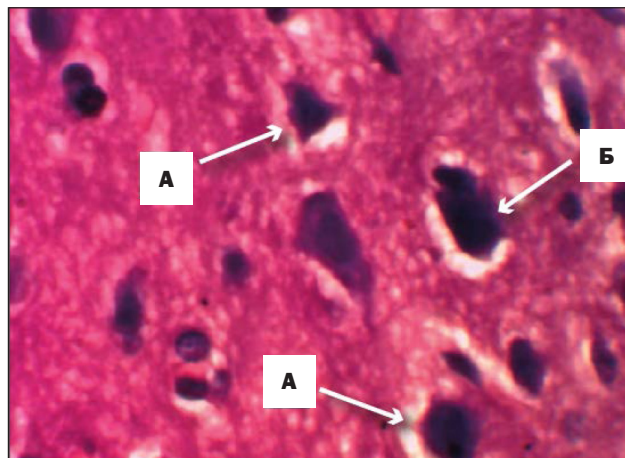


Рис. 2. Гистология. Плазмопыкноз, гиперхромия ядер нейронов (А), набухание аксонального отростка нейрона (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 1200.

Fig. 2. Histology. Plasmopyknosis, hyperchromia of neuron nuclei (A), swelling of the axonal process of a neuron (B). Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 1200.

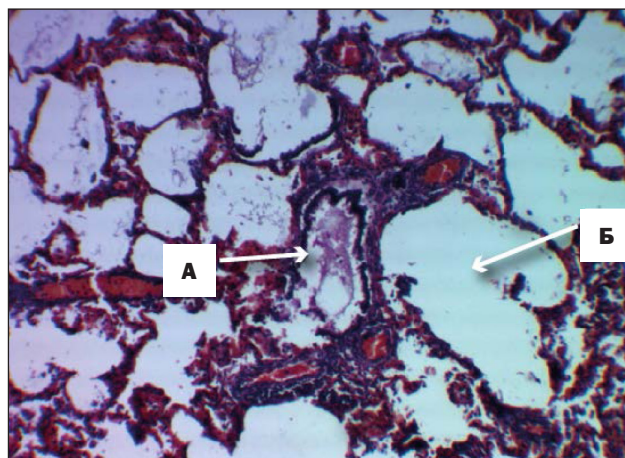


Рис. 3. Гистология. Просвет бронха обтурирован слизью (А), перибронхиальный очаг острой эмфиземы (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 120.

Fig. 3. Histology. Bronchial lumen obturated with mucus (A), peribronchovascular focus of acute emphysema (B). Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 120.

погибших на 3-и и 6-е сутки от начала эксперимента, микроскопическая картина характеризуется умеренно выраженным полнокровием межальвеолярных перегородок, спазмом бронхов среднего и малого калибра, просветы которых частично или полностью обтурированы слизью. В условиях обструкции бронхиального дерева наблюдается формирование очагов центрационной эмфиземы (рис. 3).

В почках наблюдается умеренно выраженное острое венозное полнокровие, капиллярные петли клубочков содержат эритроциты, просвет капсулы не расширен, нефроциты проксимальных и дистальных извитых канальцев обычной формы с равномерной окраской цитоплазмы, просвет канальцев свободный.

При микроскопическом исследовании печени отмечается умеренно выраженное полнокровие центральных и портальных вен, гистоархитектоника печеночных долек сохранена, синусоиды не расширены, со свободным просветом, в строме портальных трактов единичные гистиоциты и лимфоциты. Во 2-м и 5-м наблюдениях отмечаются перипортальные очаги жировой дистрофии гепатоцитов с умеренной лимфоцитарной инфильтрацией стромы.

Группа II (монокатионный хлорин е6 в дозе 125 мг/кг). При исследовании головного мозга у всех крыс выявлены признаки расстройства кровообращения на уровне МЦР, которое выражалось агрегацией эритроцитов в просветах капилляров, умеренно выраженном полнокровием и дилатацией венул, периваскулярным и перичеллюлярным отеком нервной ткани (рис. 4). Наблюдалось фокальное повреждение пирамидных нейронов коры полушарий большого мозга и клеток Пуркинье (грушевидных нейронов мозжечка), которое выражалось набуханием нейроцитов, кариолизисом, разрушением органелл цитоплазмы с перифокальной реакцией микроглии. Нейроны ствола головного мозга имели признаки ишемических изменений в виде гиперхромии ядер с потерей контуров ядрышек, уменьшением объема клеток.

При исследовании сердца отмечалось расширение полостей правого и левого желудочков, микроскопически во всех наблюдениях имело место нарушение гемоциркуляции на уровне МЦР, которое характеризовалось агрегацией эритроцитов в капиллярах, полнокровием венул, отеком стромы миокарда. В субэндокардиальных отделах миокарда левого и правого желудочка выявлены очаги пересокращения (контрактуры) в виде волнообразных сократительных волокон с неравномерной окраской цитоплазмы кардиомиоцитов.

В легких экспериментальных животных наблюдалось острое полнокровие, отек межальвеолярных перегородок с деформацией и уменьшением объема альвеол (рис. 5).

В условиях выраженного распространенного спазма мелких бронхов и бронхиол нарушение сосудистой проницаемости привело к выпоту и накоплению фибрина на слизистой оболочке бронхов по типу «гиалиновых мембран».

При исследовании почек отмечается умеренно выраженное полнокровие всех отделов, в 4-х наблюдениях нефроциты проксимальных извитых канальцев находились в состоянии вакуольной (белковой) дистрофии, просветы канальцев сужены.

В печени острое венозное полнокровие выражалось изменениями преимущественно в центрах печеночных долек, где центральная вена и синусоиды прецентральной зоны были кровенаполнены и рас-

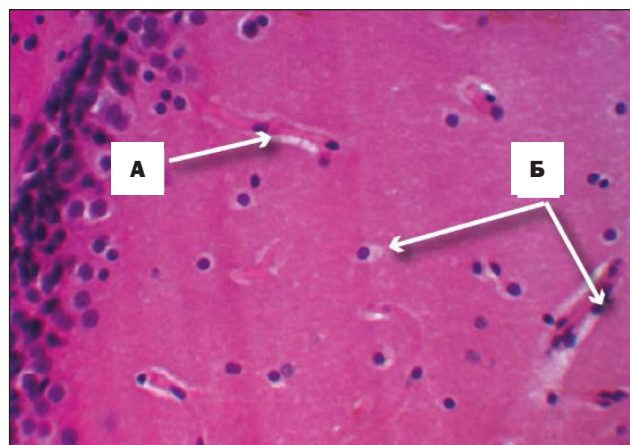


Рис. 4. Гистология. Гемостаз в капиллярах (А), периваскулярный и перичеллюлярный отек нервной ткани (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 480.

Fig. 4. Histology. Hemostasis in the capillaries (A), perivascular and pericellular edema of the nervous tissue (B). Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 480.

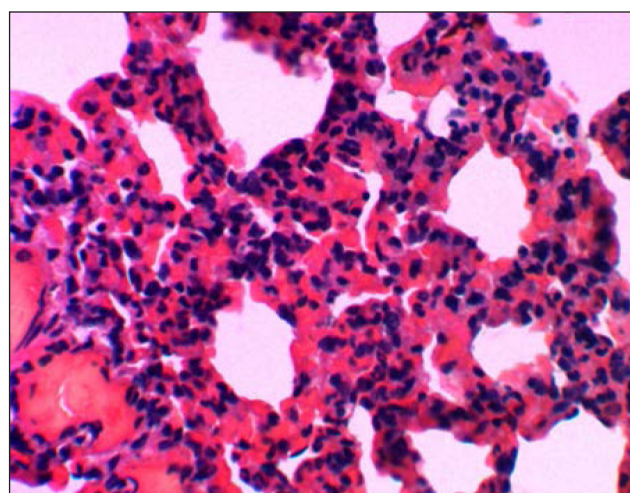


Рис. 5. Гистология. Острое полнокровие легкого, деформация альвеол. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 480.

Fig. 5. Histology. Acute plethora of the lung, deformation of the alveoli. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 480.

ширены. Вакуольная дистрофия гепатоцитов носила очаговый характер, гистоархитектоника печеночных долек сохранена.

Изменения в селезенке характеризовались умеренно выраженным полнокровием красной пульпы.

Группа III (монокатионный хлорин еб в дозе 150 мг/кг). В головном мозге на фоне гемостаза в сосудах МЦР, выраженного периваскулярного и перипеллюлярного отека повреждения нейронов характеризовались уменьшением объема клеток, гиперхромией ядер, перераспределением глыбок Ниссля в цитоплазме. В стволовом отделе головного мозга изменения единичных нейронов имели необратимый характер с признаками некроза клеток в виде кариолизиса, фрагментации цитоплазмы, перифокальной реакцией микроглии (рис. 6).

При макроскопической оценке сердца было обнаружено, что полости желудочков расширены, содержат жидкую кровь, миокард дрябловатой консистенции, на микроскопическом уровне наблюдались стаз эритроцитов в капиллярах, полнокровие интрамуральных вен, отек стромы миокарда. Фокально сократительные волокна имели волнообразные изменения, отдельные кардиомиоциты приобрели базофильную окраску.

Исследование легочной ткани показало наличие выраженного полнокровия стромы легких, на фоне которого выпот плазменных белков привел к формированию эозинофильных пленок (по типу гиалиновых мембран) на внутренней поверхности альвеол и мелких бронхов. Выраженное спастическое состояние бронхов сопровождается перибронхиальной инфильтрацией лимфоцитами с наличием единичных эозинофилов (рис. 7).

В почках на фоне острого венозного полнокровия вакуольная дистрофия эпителия проксимальных отделов канальцев приобрела распространенный характер.

Морфологическая оценка ткани печени в группе III показала выраженное венозное полнокровие всех отделов печеночной дольки при отсутствии значимых повреждений со стороны гепатоцитов.

Изменения в селезенке оказались сопоставимыми с гистологической картиной полнокровия в группах I и II.

Таким образом, морфологически значимыми оказались изменения в головном мозге, легких и сердце. Главным звеном патогенеза явилось, по-видимому, выраженное вазопатическое действие катионного хлорина, в результате которого прогрессировали отек и набухание головного мозга. Развитие острой сосудистой энцефалопатии проявлялось нарастанием общеневрологических симптомов (на этапе клинических наблюдений) и коррелировало с дозой вводимого препарата. Выявленные у крыс групп II и III необратимые изменения нейронов ствола головного

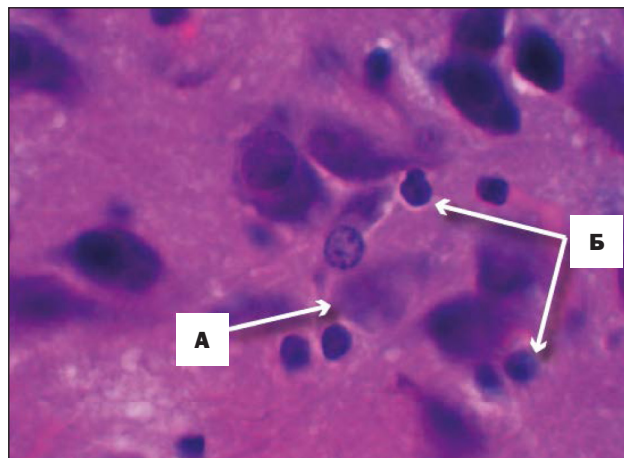


Рис. 6. Гистология. Погибший нейрон продолговатого мозга (А), перифокальная реакция микроглиальных элементов (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 1200.

Fig. 6. Histology. Dead medulla neuron (A), perifocal reaction of microglial elements (B). Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 1200.

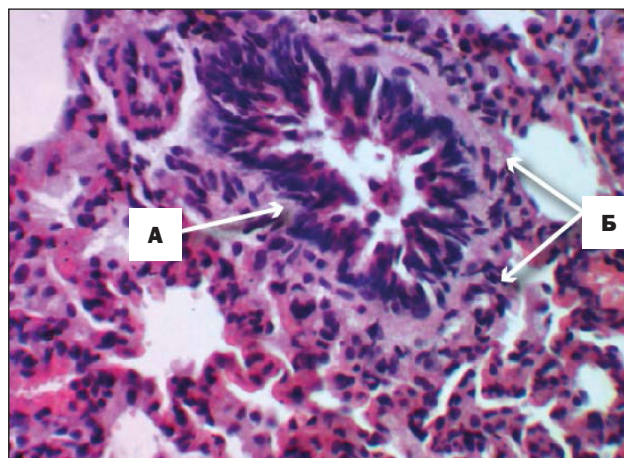


Рис. 7. Гистология. Выраженный бронхоспазм (А), эозинофилы в составе лейкоцитарного инфильтрата (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 480.

Fig. 7. Histology. Severe bronchospasm (A), eosinophils in the leukocyte infiltrate (B). Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 480.

мозга свидетельствуют о развитии дислокационного синдрома, что можно рассматривать как основную причину гибели экспериментальных животных. Патоморфологическая оценка легких выявила распространенный бронхоспазм с гиперсекрецией слизи, выраженность которого нарастала с увеличением дозы препарата. В сочетании с эозинофильной инфильтрацией стенок бронхов формируется картина острой аллергической реакции. Повышенная проницаемость сосудистой стенки стала причиной формирования наложений из фибрина на внутренней поверхности альвеол и мелких бронхов (по типу гиалиновых мембран). По совокупности описанных изменений

можно сделать вывод о развитии острого респираторного дистресс-синдрома, имеющего определенное значение в танатогенезе. Обратимые изменения в миокарде вероятнее всего являются результатом воздействия аритмогенного фактора, формирующегося при введении исследуемого ФС. Описанные морфологические изменения в печени, почках и селезенке у опытных животных являются стереотипными при интоксикации различного генеза.

Заключение

1. Предварительным значением ЛД₅₀ для исследуемого монокатионного хлорина (соединение I) может считаться величина 100 мг/кг массы тела. Она почти в два раза больше, чем у используемых в клинической практике анионных ФС, однако с токсикологической точки зрения вполне приемлема для продолжения доклинических исследований, поскольку при проведении ФДТ доза вводимого

ФС обычно находится в пределах от 1 до 5 мг/кг. Для получения более точного значения ЛД₅₀ следует увеличить число лабораторных животных.

2. Внутривенное введение исследуемого ФС в токсических дозах вызывает преимущественное поражение головного мозга, легких и миокарда.
3. Патоморфологические изменения жизненно важных органов лабораторных животных свидетельствуют о выраженном вазопатическом действии соединения I с развитием отека головного мозга и респираторного дистресс-синдрома, явившихся основными звеньями танатогенеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-13-00398, <https://rscf.ru/project/21-13-00398/> с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИХР РАН и ИГХТУ (при поддержке Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-671).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy // Amsterdam: Gordon Breach Sci. Publ. – 2000. – P. 305.
2. Agostinis P, Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA Cancer J. Clin.* – 2011. – Vol. 61(4). – P. 250-281. doi: 10.3322/caac.20114
3. Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Krylova L.V., Volovetsky A.B., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Meshkov I.N., Gorbunova Y.G., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Balalaeva I.V., Fedorov A.Y. Water-soluble chlorin/ arylaminoquinoxaline conjugate for photodynamic and targeted therapy // *Med. Chem.* – 2019. – Vol. 62(24). – P. 11182-11193. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01294
4. Van Straten D., Mashayekhi V., De Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions // *Cancers.* – 2017. – Vol. 9(19). – P. 1-54. doi: 10.3390/cancers9020019
5. Krammer B., Malik Z., Pottier R., Stepp H. Basic principles. In: Photodynamic therapy with ALA. A clinical handbook / Ed. by Pottier R., Krammer B., Stepp, R. Baumgartner H. // Cambridge: Royal Society Chem. Publ. – 2006. – P. 15-78.
6. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. Клинические аспекты фотодинамической терапии. – Калуга: Изд. науч. лит. – 2009. – С. 204.
7. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // *Biomedical Photonics.* – 2016. Т. 5, № 2. – С. 26-37.
8. Филоненко Е.В. Клиническое внедрение и научное развитие фотодинамической терапии в России в 2010–2020 гг. // *Biomedical Photonics.* – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 4–22. doi: 10.24931/2413-9432-2021-9-4-4-22
9. Liu Y., Qin R., Zaat S.A.J., Breukink E., Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections // *J. Clin. Translat. Res.* – 2015. – Vol. 1(3). – P. 140-167.
10. Hamblin M. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2016. – Vol. 33. – P. 67-73.
11. Кустов А.В., Березин Д.Б., Стрельников А.И., Лапочкина Н.П. Противоопухолевая и антимикробная фотодинамическая терапия: механизмы, мишени, клинико-лабораторные исследования: руководство / под ред. А.К. Гагуа. – М: Ларго. – 2020. – С. 108.

REFERENCES

1. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. *Amsterdam: Gordon Breach Sci. Publ.*, 2000, pp. 305.
2. Agostinis P, Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, Vol. 61(4), pp. 250-281. doi: 10.3322/caac.20114
3. Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Krylova L.V., Volovetsky A.B., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Meshkov I.N., Gorbunova Y.G., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Balalaeva I.V., Fedorov A.Y. Water-soluble chlorin/ arylaminoquinoxaline conjugate for photodynamic and targeted therapy. *Med. Chem.*, 2019, Vol. 62(24), pp. 11182-11193. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01294
4. Van Straten D., Mashayekhi V., De Bruijn H.S., Oliveira S., Robinson D.J. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, 2017, Vol. 9(19), pp. 1-54. doi: 10.3390/cancers9020019
5. Krammer B., Malik Z., Pottier R., Stepp H. Basic principles. In: Photodynamic therapy with ALA. A clinical handbook / Ed. by Pottier R., Krammer B., Stepp, R. Baumgartner H. *Cambridge: Royal Society Chem. Publ.*, 2006, pp. 15-78.
6. Tsyb A.F., Kaplan M.A., Romanko Yu.S., Popuchiev V.V. Clinical aspects of photodynamic therapy. *Kaluga: Publishing house of scientific lit.*, 2009, pp. 204.
7. Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice. *Biomedical Photonics*, 2016. Vol. 5(2), pp. 26-37.
8. Filonenko E.V. Clinical implementation and scientific development of photodynamic therapy in Russia in 2010-2020. *Biomedical Photonics*, 2021, Vol. 10(4), pp. 4-22. doi: 10.24931/2413-9432-2021-9-4-4-22
9. Liu Y., Qin R., Zaat S.A.J., Breukink E., Heger M. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J. Clin. Translat. Res.*, 2015, Vol. 1(3), pp. 140-167.
10. Hamblin M. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2016, Vol. 33, pp. 67-73.
11. Kustov A.V., Berezin D.B., Strelnikov A.I., Lapochkina N.P. Antitumor and antimicrobial photodynamic therapy: mechanisms, targets, clinical and laboratory studies: guidelines / edited by A.K. Gagua. *Moscow: Largo*, 2020, p. 108.

12. Koifman O.I., Ageeva T.A., Beletskaya I.P., Averin A.D., et al. Macroheterocyclic compounds – a key building block in new functional materials and molecular devices // *Macroheterocycles*. – 2020. – Vol. 13(4). – P. 311-467. doi: 10.6060/mhc200814k
13. Kustov A.V., Privalov O.A., Strelnikov A.I., Koifman O.I., Lubimtsev A.V., Morshnev Ph.K., Moryganova T.M., Kustova T.V., Berезin D.B. Transurethral resection of non-muscle invasive bladder tumors combined with fluorescence diagnosis and photodynamic therapy with chlorin e6-type photosensitizers // *J. Clin. Med.* – 2022. – Vol. 11. – P. 233. doi: 10.3390/jcm11010233
14. Caterino M., D'Aria F., Kustov A.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Star-seva O.M., Berезin D.B., Pylina Y. I., Usacheva T. R., Amato J., Giancola C. Selective binding of a bioactive porphyrin-based photosensitizer to the G-quadruplex from the KRAS oncogene promoter // *Intern. J. Biol. Macromolecules*. – 2020. – Vol. 145. – P. 244-251. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.152
15. Dabrowski J. M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation // *Adv. Inorg. Chem.* – 2017. – Vol. 70. – P. 343-394. doi: 10.1016/bs.adioch.2017.03.002
16. Maisch T. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2015. – Vol. 150. – P. 2-10. doi: /10.1016/j.jphotobiol.2015.05.010
17. Kobayashi N. Spectroscopically and/or structurally intriguing phthalocyanines and related compounds. Part 1. Monomeric systems // *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* – 2019. – Vol. 62. – P. 4-46. doi: 10.6060/ivkkt.20196206.5913_1
18. Kustov A.V., Smirnova N.L., Berезin M.B. Standard enthalpies and heat capacities of ethyl acetate and deuteroporphyrin dimethylester solution in N,N-dimethylformamide at 298–318 K // *Thermochim. Acta*. – 2011. – Vol. 521. – P. 224-226. doi: 10.1016/j.tca.2011.02.020
19. Kustov A.V., Smirnova N.L., Berезin D. B., Berезin M.B. Thermodynamics of solution of proto- and mezoporphyrins in N,N-dimethylformamide // *J. Chem. Thermodyn.* – 2015, Vol. 89. – P. 123-126. doi: 10.1016/j.jct.2015.05.016
20. Kustov A.V., Smirnova N.L., Berезin D.B., Berезin M.B. Blood porphyrins in binary mixtures of N,N-dimethylformamide with 1-octanol and chloroform: The energetics of solvation, solute-cosolvent interactions and model calculations // *J. Chem. Thermodyn.* – 2015. – Vol. 83. – P. 104-109. doi: 10.1016/j.jct.2014.12.013
21. Трухачева Т.В., Шляхтин С.В., Исаков Г.А. Фотолон – новое средство для фотодинамической терапии. – Минск: РУП «Белмедпрепараты». – 2009. – С. 64.
22. Yakavets I., Millard M., Zorin V., Lassalle H.-P., Bezdetnaya L. Current state of the nanoscale delivery systems for temoporfin-based photodynamic therapy: Advanced delivery strategies // *J. Contr. Release*. – 2019. – Vol. 304. – P. 268-287. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.05.035
23. Huang L., Dai T., Hamblin M.L. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. In: *Photodynamic therapy. Methods and protocols* / Ed. by Ch.J. New York: Gomer Springer Science+Business Media, 2010. – P. 155-174.
24. Berезin D.B., Karimov D.R., Venediktov E.A., Kustov A.V., Makarov V.V. The synthesis and singlet oxygen generation study of 13(1)-N-piperazinyl chlorin e6-15(2),17(3)-dimethyl ester // *Macroheterocycles*. – 2015. –Vol. 8(4). – P. 384-388. doi: 10.6060/mhc151088b
25. Kustov A.V., Belykh D.V., Startseva O.M., Kruchin S.O., Venediktov E.A., Berезin D.B. New photosensitizers developed on a methylpheophorbide a platform for photodynamic therapy: synthesis, singlet oxygen generation and modeling of passive membrane transport // *Pharm. Anal. Acta*. – 2016. – Vol. 7(5). – P. 480-484. doi: 10.4172/2153-2435.1000480.
26. Вenedиктов Е.А., Туликова Е.Ю., Рожкова Е.П., Белых Д.В., Худяева И.С., Березин Д.Б. Синтез, спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства трикатионного производного хлорина е6 с триметиламмонийными группами // *Макрогетероциклы*. – 2017. – Т. 10, № 3. – С. 295-300. doi: 10.6060/mhc170404v
12. Koifman O.I., Ageeva T.A., Beletskaya I.P., Averin A.D., et al. Macroheterocyclic compounds – a key building block in new functional materials and molecular devices. *Macroheterocycles*, 2020, Vol. 13(4), pp. 311-467. doi: 10.6060/mhc200814k
13. Kustov A.V., Privalov O.A., Strelnikov A.I., Koifman O.I., Lubimtsev A.V., Morshnev Ph.K., Moryganova T.M., Kustova T.V., Berезin D.B. Transurethral resection of non-muscle invasive bladder tumors combined with fluorescence diagnosis and photodynamic therapy with chlorin e6-type photosensitizers. *J. Clin. Med*, 2022, Vol. 11, pp. 233. doi: 10.3390/jcm11010233
14. Caterino M., D'Aria F., Kustov A.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Star-seva O.M., Berезin D.B., Pylina Y. I., Usacheva T. R., Amato J., Giancola C. Selective binding of a bioactive porphyrin-based photosensitizer to the G-quadruplex from the KRAS oncogene promoter. *Intern. J. Biol. Macromolecules*, 2020, Vol. 145, pp. 244-251. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.152
15. Dabrowski J. M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and potentiation. *Adv. Inorg. Chem*, 2017, Vol. 70, pp. 343-394. doi: 10.1016/bs.adioch.2017.03.002
16. Maisch T. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 2015, Vol. 150, pp. 2-10. doi: /10.1016/j.jphotobiol.2015.05.010
17. Kobayashi N. Spectroscopically and/or structurally intriguing phthalocyanines and related compounds. Part 1. Monomeric systems. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol*, 2019, Vol. 62, pp. 4-46. doi: 10.6060/ivkkt.20196206.5913_1
18. Kustov A.V., Smirnova N.L., Berезin M.B. Standard enthalpies and heat capacities of ethyl acetate and deuteroporphyrin dimethylester solution in N,N-dimethylformamide at 298–318 K. *Thermochim. Acta*, 2011, Vol. 521, pp. 224-226. doi: 10.1016/j.tca.2011.02.020
19. Kustov A.V., Smirnova N.L., Berезin D. B., Berезin M.B. Thermodynamics of solution of proto- and mezoporphyrins in N,N-dimethylformamide. *J. Chem. Thermodyn*, 2015, Vol. 89, pp. 123-126. doi: 10.1016/j.jct.2015.05.016
20. Kustov A.V., Smirnova N.L., Berезin D.B., Berезin M.B. Blood porphyrins in binary mixtures of N,N-dimethylformamide with 1-octanol and chloroform: The energetics of solvation, solute-cosolvent interactions and model calculations. *J. Chem. Thermodyn*, 2015, Vol. 83, pp. 104-109. doi: 10.1016/j.jct.2014.12.013
21. Trukhacheva T.V., Shlyakhtin S.V., Isakov G.A. Photolon is a new tool for photodynamic therapy. – Minsk: RUE “Belmedpreparaty”. – 2009. – p. 64.
22. Yakavets I., Millard M., Zorin V., Lassalle H.-P., Bezdetnaya L. Current state of the nanoscale delivery systems for temoporfin-based photodynamic therapy: Advanced delivery strategies. *J. Contr. Release*, 2019, Vol. 304, pp. 268-287. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.05.035
23. Huang L., Dai T., Hamblin M.L. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. In: *Photodynamic therapy. Methods and protocols* / Ed. by Ch.J. New York: Gomer Springer Science+Business Media, 2010, pp. 155-174.
24. Berезin D.B., Karimov D.R., Venediktov E.A., Kustov A.V., Makarov V.V. The synthesis and singlet oxygen generation study of 13(1)-N-piperazinyl chlorin e6-15(2),17(3)-dimethyl ester. *Macroheterocycles*, 2015, Vol. 8(4), pp. 384-388. doi: 10.6060/mhc151088b
25. Kustov A.V., Belykh D.V., Startseva O.M., Kruchin S.O., Venediktov E.A., Berезin D.B. New photosensitizers developed on a methylpheophorbide a platform for photodynamic therapy: synthesis, singlet oxygen generation and modeling of passive membrane transport. *Pharm. Anal. Acta*, 2016, Vol. 7(5), pp. 480-484. doi: 10.4172/2153-2435.1000480.
26. Venediktov E.A., Tulikova E.Yu., Rozhkova E.P., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Berезin D.B. Synthesis, spectral-luminescent and photochemical properties of a tricationic derivative of chloride e6 with trimethylammonium groups. *Macroheterocycles*, 2017, Vol. 10(3). – pp. 295-300. doi: 10.6060/mhc170404v

27. Kustov A.V., Belykh D.V., Smirnova N.L., Venediktov E.A., Kudayarova T.V., Kruchin S.O., Khudyaeva I.S., D Berezin D.B. Synthesis and investigation of water-soluble chlorophyll pigments for antimicrobial photodynamic therapy // *Dyes Pigm.* – 2018. – Vol. 149. – P. 553-559. doi: 10.1016/j.dyepig.2017.09.073
28. Kustov A.V., Kustova T.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. Synthesis and investigation of novel chlorin sensitizers containing the myristic acid residue for antimicrobial photodynamic therapy // *Dyes Pigm.* – 2020. – Vol. 173. – P. 107948. doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107948
29. Kustov A.V., Belykh D.V., Smirnova N.L., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. Partition of methylpheophorbide a, dioxidine and their conjugate in the 1-octanol/phosphate saline buffer biphasic system // *J. Chem. Thermodyn.* – 2017. – Vol. 115. – P. 302-306. doi: 10.1016/j.jct.2017.07.031
30. Berezin D.B., Kustov A.V., Krestyaninov M.A., Batov D.V., Kukushkina N.V., Shukhto O.V. The behavior of monocationic chlorin in water and aqueous solutions of non-ionic surfactant Tween 80 and potassium iodide // *J. Mol. Liq.* – 2019. – Vol. 283. – P. 532-536. doi: 10.1016/j.molliq.2019.03.091
31. Kustov A.V., Krestyaninov M.A., Kruchin S.O., Shukhto O.V., Kustova T.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Koifman M.O., Razgovorov P.B., Berezin D.B. Interaction of cationic chlorin photosensitizers with non-ionic surfactant Tween 80 // *Mend. Commun.* – 2021. – Vol. 31(1). – P. 65-67. doi: 10.1016/j.mencom.2021.01.019
32. Шухто О.В., Худяева И.С., Белых Д.В., Березин Д.Б. Агрегация гидрофобных хлоринов с фрагментами антимикробных препаратов в водных растворах этанола и Твин 80 // *Известия ВУЗов. Химия и хим. технол.* – 2021. – Т. 64, № 11. – С. 86-96. doi: 10.6060/ivkkt.20216411.6500
33. Кустов А.В., Гарасько Е.В., Белых Д.В., Худяева И.С., Старцева О.М., Макаров В.В., Стрельников А.И., Березин Д.Б. Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда для антимикробной фотодинамической терапии // *Успехи современного естествознания.* – 2016. – Т.12, № 2. – С. 263-268.
34. Berezin D.B., Makarov V.V., Znoyko S.A., Mayzlish V.E., Kustov A.V. Aggregation water soluble octaanionic phthalocyanines behavior and their photoinactivation antimicrobial effect in vitro // *Mend. Commun.* – 2020. – Vol. 30(5). – P. 621-623. doi: 10.1016/j.mencom.2020.09.023
35. Pylina Ya.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. Dark and photoinduced cytotoxicity of cationic derivatives of chlorin e6 with different numbers of charged groups // *Macroheterocycles.* – 2021. – Vol. 14(4). doi: 10.6060/210944b
36. Гушина О.И., Ларкина Е.А., Миронов А.Ф. Синтез катионных производных хлорина е6 // *Макрогетероциклы.* – 2014. – Т. 7, № 4. – С. 414-416. doi: 10.6060/mhc140931g
37. Каримов Д.Р., Макаров В.В., Кручин С.О., Березин Д.Б., Смирнова Н.Л., Березин М.Б., Желтова Е.И., Стрельников А.И., Кустов А.В. Оптимизация условий выделения хлорофиллов из крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) и спиролины (*Spirulina platensis*) // *Химия растит. сырья.* – 2014. – Т. 17, № 4. – С. 189-196. doi: 10.14258/jcprm.201404310
38. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических средств: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств. / Под ред. Р.У. Харбиева. - М.: Медицина. – 2005. – С. 41-54.
27. Kustov A.V., Belykh D.V., Smirnova N.L., Venediktov E.A., Kudayarova T.V., Kruchin S.O., Khudyaeva I.S., D Berezin D.B. Synthesis and investigation of water-soluble chlorophyll pigments for antimicrobial photodynamic therapy. *Dyes Pigm.*, 2018, Vol. 149, pp. 553-559. doi: 10.1016/j.dyepig.2017.09.073
28. Kustov A.V., Kustova T.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. Synthesis and investigation of novel chlorin sensitizers containing the myristic acid residue for antimicrobial photodynamic therapy. *Dyes Pigm.*, 2020, Vol. 173, pp. 107948. doi: 10.1016/j.dyepig.2019.107948
29. Kustov A.V., Belykh D.V., Smirnova N.L., Khudyaeva I.S., Berezin D.B. Partition of methylpheophorbide a, dioxidine and their conjugate in the 1-octanol/phosphate saline buffer biphasic system. *J. Chem. Thermodyn.*, 2017, Vol. 115, pp. 302-306. doi: 10.1016/j.jct.2017.07.031
30. Berezin D.B., Kustov A.V., Krestyaninov M.A., Batov D.V., Kukushkina N.V., Shukhto O.V. The behavior of monocationic chlorin in water and aqueous solutions of non-ionic surfactant Tween 80 and potassium iodide. *J. Mol. Liq.*, 2019, Vol. 283, pp. 532-536. doi: 10.1016/j.molliq.2019.03.091
31. Kustov A.V., Krestyaninov M.A., Kruchin S.O., Shukhto O.V., Kustova T.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Koifman M.O., Razgovorov P.B., Berezin D.B. Interaction of cationic chlorin photosensitizers with non-ionic surfactant Tween 80. *Mend. Commun.*, 2021, Vol. 31(1), pp. 65-67. doi: 10.1016/j.mencom.2021.01.019
32. Shukhto O.V., Khudyaeva I.S., Belykh D.V., Berezin D.B. Aggregation of hydrophobic chlorines with fragments of antimicrobial drugs in aqueous solutions of ethanol and Twin 80. *Izvestiya VUZov. Chemistry and Chemical technology*, 2021, Vol. 64(11), pp. 86-96. doi: 10.6060/ivkkt.20216411.6500
33. Kustov A.V., Garasko E.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Startseva O.M., Makarov V.V., Strelnikov A.I., Berezin D.B. Photosensitizers of the chlorin series for antimicrobial photodynamic therapy. *Successes of modern natural science*, 2016, Vol.12(2), pp. 263-268.
34. Berezin D.B., Makarov V.V., Znoyko S.A., Mayzlish V.E., Kustov A.V. Aggregation water soluble octaanionic phthalocyanines behavior and their photoinactivation antimicrobial effect in vitro. *Mend. Commun.*, 2020, Vol. 30(5), pp. 621-623. doi: 10.1016/j.mencom.2020.09.023
35. Pylina Ya.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. Dark and photoinduced cytotoxicity of cationic derivatives of chlorin e6 with different numbers of charged groups. *Macroheterocycles*, 2021, Vol. 14(4). doi: 10.6060/210944b
36. Gushchina O.I., Larkina E.A., Mironov A.F. Synthesis of cationic derivatives of chloride e6. *Macroheterocycles*, 2014, Vol. 7(4), pp. 414-416. doi: 10.6060/mhc140931g
37. Karimov D.R., Makarov V.V., Kruchin S.O., Berezin D.B., Smirnova N.L., Berezin M.B., Zheltova E.I., Strelnikov A.I., Kustov A.V. Optimization of chlorophyll isolation conditions from dioecious nettle (*Urtica dioica* L.) and spirulina (*Spirulina platensis*). *Chemistry grows. raw materials*, 2014, Vol. 17(4), pp. 189-196. doi: 10.14258/jcprm.201404310
38. Arzamashev E.V., Guskova T.A., Berезovskaya I.V., Lyubimov B.I., Lieberman S.S., Verstakova O.L. Methodological guidelines for the study of the general toxic effect of pharmacological agents: A guide to the experimental (preclinical) study of new pharmacological agents. *Edited by R.U. Habriev. - M.: Medicine*, 2005, pp. 41-54.