

## Фотоиндуцированная генерация супероксидного радикала индотрикарбоцианиновыми красителями

Н. В. Белько<sup>1)</sup>, А. М. Мальтанова<sup>2)</sup>, А. В. Богданова<sup>3)</sup>, Д. С. Тарасов<sup>1)</sup>,  
С. А. Фатыхова<sup>4)</sup>, П. С. Шабуня<sup>4)</sup>, А. А. Смоляков<sup>5)</sup>, С. К. Позняк<sup>2)</sup>,  
Т. А. Кулагова<sup>3)</sup>, М. П. Самцов<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, e-mail: [dmitrij-tarasov@list.ru](mailto:dmitrij-tarasov@list.ru)

<sup>2)</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

<sup>3)</sup>Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

<sup>4)</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>5)</sup>Институт физики имени Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Установлено, что индолениновые гептаметиновые красители эффективно генерируют супероксидный радикал при фотоактивации излучением ближнего ИК диапазона. Образование супероксида зарегистрировано в смеси вода/ацетонитрил для пяти красителей с различной структурой заместителей при помощи спектроскопии электронного парамагнитного резонанса со спиновой ловушкой. Показано, что заместители в структуре молекулы (в полиметиновой цепи и при концевых гетероостатках) относительно слабо влияют на эффективность генерации супероксида.

**Ключевые слова:** гептаметиновые красители, фотодинамическая терапия, супероксид, окислительный стресс, цитотоксичность.

## Photoinduced generation of superoxide anion radical by heptamethine dyes in the near infrared range

N. V. Bel'ko<sup>1)</sup>, A. M. Mal'tanova<sup>2)</sup>, A. V. Bahdanava<sup>3)</sup>, D. S. Tarasau<sup>1)</sup>,  
S. A. Fatykhava<sup>4)</sup>, P. S. Shabunya<sup>4)</sup>, A. A. Smaliakou<sup>5)</sup>, S. K. Poznyak<sup>2)</sup>,  
T. A. Kulahava<sup>3)</sup>, M. P. Samtsov<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus, e-mail: [dmitrij-tarasov@list.ru](mailto:dmitrij-tarasov@list.ru)

<sup>2)</sup>Research Institute for Physical Chemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Belarus

<sup>3)</sup>Institute for Nuclear Problem of Belarusian State University, Minsk, Belarus

<sup>4)</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>5)</sup>B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus

Indolenine heptamethine dyes are shown to be efficient generators of superoxide anion radical upon photoactivation in the near-IR spectral range. Superoxide production was registered for five dyes with different substituents using electron paramagnetic resonance spectroscopy with spin trapping. Substituents in the polyethine chain and at the heterocyclic terminal groups only weakly influence the efficiency of superoxide generation. Superoxide production was registered for five dyes with different substituents using electron paramagnetic resonance spectroscopy with spin trapping.

**Keywords:** heptamethine dyes, photodynamic therapy, superoxide, oxidative stress, cytotoxicity.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является перспективным методом лечения онкологических заболеваний. Новые фотосенсибилизаторы (ФС) для ФДТ постоянно разрабатываются и совершенствуются. Наличие молекулярного кислорода в тканях, которые подвергаются воздействию, является одним из ключевых компонентов ФДТ, при этом большинство опухолевых тканей подвержены гипоксии. Данная особенность является одним из основных препятствий в развитии и более широком применении ФДТ.

Различают два основных механизма фототоксичности в ФДТ. Механизм I типа связан с фотоиндуцированным переносом электрона с молекулы ФС на молекулу растворенного в окружающей среде кислорода, что приводит к образованию супероксидного радикала ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Хотя данный интермедиат является окислителем умеренной силы, внутри клеток возможна его трансформация в гидроксильный радикал ( $\bullet\text{OH}$ ), который является одним из самых сильных окислителей. Механизм II типа включает перенос энергии с возбужденной молекулы ФС на молекулу кислорода, в результате чего формируется синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), который также проявляет выраженные окислительные свойства. Большинство известных ФС (в т. ч. все разрешенные в клинической практике ФС) следуют механизму II типа. В то же время механизм I типа более перспективен с точки зрения повышения эффективности ФДТ при наличии локальной гипоксии, поскольку он значительно менее чувствителен к концентрации молекулярного кислорода, а также позволяет повторно использовать молекулы кислорода за счет цепи радикальных реакций.

Хотя гептаметиновые красители обладают способностью вырабатывать синглетный кислород, квантовые выходы его генерации обычно низки ( $10^{-3} - 10^{-2}$ ). В то же время известно, что фотоактивность гептаметиновых красителей значительно меньше зависит от гипоксии, чем широко распространенные ФС-производные порфина. Таким образом, высокая противоопухолевая активность гептаметиновых красителей указывает на участие дополнительных активных интермедиатов помимо синглетного кислорода.

Учитывая весьма ограниченное количество описанных в литературе ФС, которые действуют по механизму I типа и при этом активируются в ближнем ИК диапазоне, исследование способности гептаметиновых красителей ближнего ИК диапазона генерировать супероксид представляется весьма перспективным.

В данной работе исследуется серия гептаметиновых красителей с различной структурой заместителей при концевых группах и в полиметиновой цепи (рис. 1). В данном наборе краситель **1** является гидрофильным за счет наличия в его структуре полиэтиленгликоля, а его высокая противоопухолевая активность уже была продемонстрирована *in vivo* [1].

Растворы красителей для ЭПР спектроскопии готовили в смеси вода/ацетонитрил (1:1). Образующиеся свободные радикалы фиксировали при помощи спиновой ловушки ROBN ( $\alpha$ -(4-пиридил-N-оксид)-N-терт-бутилнитрон), концентрация которой составляла 50 ммоль/л. Растворы содержали 50 мкмоль/л Fe(II)–ЭДТА для преобразования перекиси водорода в гидроксильный радикал посредством реакции Фентона. Также в растворах присутствовал этанол (5 об.%) для обеспечения

протекания реакции между гидроксильным радикалом и POBN (через 1-гидрокси-этил радикал).

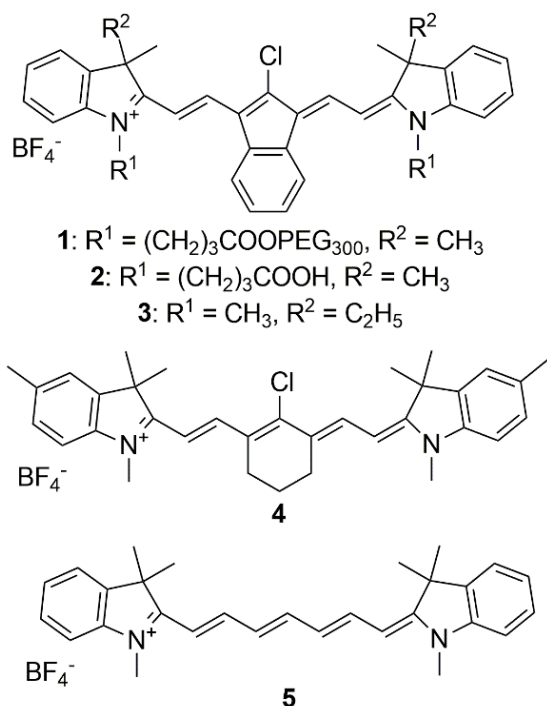


Рис.1. Структурные формулы исследованных красителей

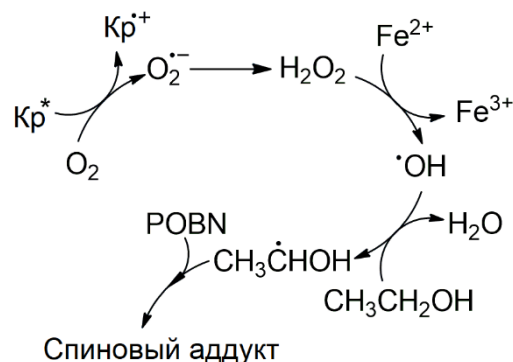


Рис.2. Схема генерации спинового аддукта POBN, сенсibilизированной красителями 1–5

ЭПР спектры регистрировали при помощи спектрометра SPINSCAN X (LINEV SYSTEMS). Образцы помещали в капилляры, запаянные с обоих концов. Фотовоздействие на образцы производилось внутри резонатора спектрометра излучением полупроводникового лазера с длиной волны 750 нм. Плотность мощности излучения на входе резонатора составляла 0,5 Вт/см<sup>2</sup>, а время экспозиции – 1 мин. При регистрации спектров центр поля приходился на 332,2 мТл, а амплитуда модуляции составляла 0,15 мТл.

Образование спинового аддукта POBN, фотосенсибилизированное красителями 1–5, осуществлялось посредством цепочки свободнорадикальных реакций, показанных на рис. 2. Как показано на рис. 3, воздействие на все исследованные красители излучением с длиной волны 750 нм в присутствии железа(II), этанола и POBN приводит к образованию узких интенсивных полос в ЭПР спектре с константами сверхтонкой структуры  $a_N = 15,5$  Г и  $a_H = 2,7$  Г. Эти значения практически идентичны для всех красителей и хорошо согласуются с данными для спинового аддукта POBN с 1-гидроксиэтил радикалом. ЭПР сигнал не наблюдался в отсутствие светового воздействия. В качестве положительного контроля гидроксильный радикал также генерировали посредством реакции Фентона между пероксидом водорода и железом(II), в результате чего образовался тот же спиноый аддукт в сопоставимой концентрации.

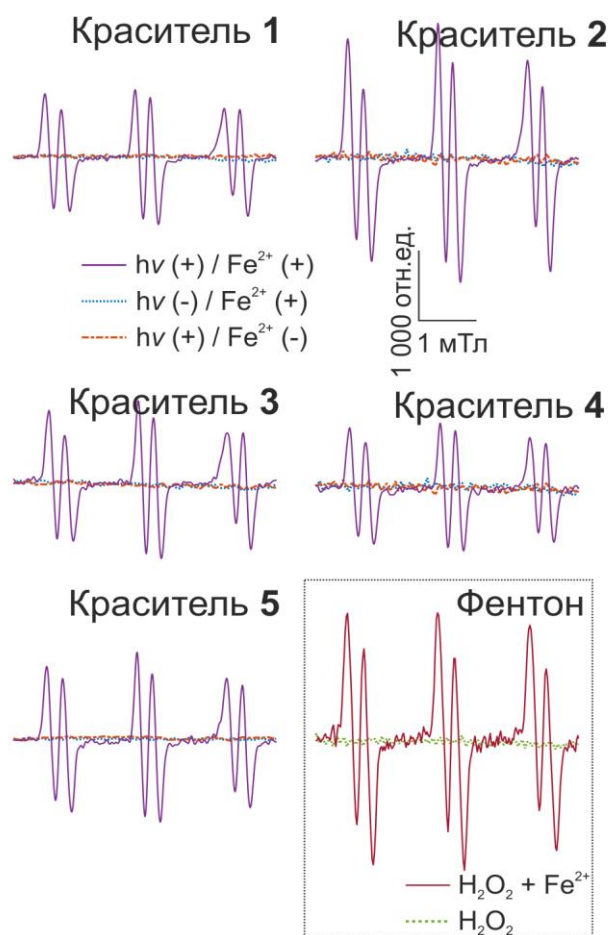


Рис.3. ЭПР спектры спинового аддукта РОВН, образовавшегося в растворах красителей 1–5 концентрации 1 ммоль/л в смеси ацетонитрил/вода (1:1) при воздействии излучением с длиной волны 750 нм (плотность мощности 0,5 Вт/см<sup>2</sup>, доза 30 Дж/см<sup>2</sup>). В растворах содержалось 50 мкмоль/л Fe(II)–ЭДТА, 50 ммоль/л РОВН и 5 об.% этанола. Такой же спиновый аддукт был генерирован химически посредством реакции Фентона (при смешивании 50 мкмоль/л Fe(II)–ЭДТА и 250 мкмоль/л пероксида водорода)

Таким образом, данные ЭПР спектроскопии свидетельствуют о том, что гептаметиновые красители 1–5 являются эффективными генераторами супероксидного радикала посредством фотоиндуцированного восстановления молекулярного кислорода. Количество вырабатываемого супероксида было сопоставимо для всех красителей, кроме красителя 2. Систематическое установление влияния заместителей на выработку супероксида будет предметом дальнейших исследований. Индолениновые гептаметиновые красителя являются перспективными ФС для ФДТ. В дальнейшем также будут исследована их внутриклеточная локализация, темновая и фототоксичность, связанные с ними механизмы клеточной гибели, а также их противоопухолевая активность в гипоксических условиях.

### Библиографические ссылки

1. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A. A. Lugovski [et al.] //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2016. Vol. 316. P. 31–36.