

УДК 547.97:541.14+535.34+535.37+66.094.3

Сравнительное изучение фотофизических свойств низкотоксичных фотосенсибилизаторов на основе эндогенных порфиринов

© 2018 г. Т. Д. Муравьева*, канд. хим. наук; А. В. Дадеко*;
В. М. Киселев*, доктор физ.-мат. наук; Т. К. Крисько*, канд. физ.-мат. наук;
И. М. Кисляков*, канд. физ.-мат. наук; А. В. Крисько*, А. М. Стародубцев*;
И. В. Багров*, канд. физ.-мат. наук; И. М. Белоусова*, доктор физ.-мат. наук;
Г. В. Пономарев**, доктор хим. наук

*АО «Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова», Санкт-Петербург

**Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии наук, Москва

E-mail: krisko_tata@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.2018

DOI:10.17586/1023-5086-2018-85-11-65-80

Представлен обзор работ, связанных с изучением *in vitro* спектральных, флуоресцентных и фотосенсибилизирующих свойств, а также фотостабильности низкотоксичных фотосенсибилизаторов на основе эндогенных порфиринов — динатриевой соли-2,4-ди(1-метоксиэтил) дейтеропорфирина IX (димергин) и тетракальевой соли копропорфирина III в сравнении с препаратами медицинского назначения хлориновой природы — фотодитазина, радахлорина и фотолонна при облучении растворов фотосенсибилизаторов в видимом диапазоне спектра. Обсуждено и изучено влияние транспортных добавок и белков на упомянутые выше свойства. Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования препаратов на основе эндогенных порфиринов в качестве эффективных агентов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики, где наряду с фотофизическими свойствами фотосенсибилизатора ключевую роль играют фотостабильность, низкая токсичность и селективность накопления в патологических очагах организма, что напрямую связано с химической структурой препарата.

Отдельно рассмотрены результаты последних работ, выполненных в ГОИ им. С.И. Вавилова, по данному направлению.

Ключевые слова: димергин, копропорфирин, фотодитазин, радахлорин, альбумин, плуроник, поглощение света, флуоресценция, синглетный кислород, фотостабильность, квантовый выход.

Коды OCIS: 160.2540, 170.1610, 170.5180, 170.6280

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних лет оптические методы находят все более широкое применение в различных областях медицины. Одним из таких новых методов, показавшим свою перспективность, является метод фотодинамического воздействия на патологические очаги организма при лечении широкого спектра заболеваний [1–3], в процессе контроля за эффективностью терапии, а также при медицинской диагностике [4–7].

В основе фотодинамического (ФД) воздействия лежит явление усиления цитотоксичности некоторых веществ — так называемых фотосенсибилизаторов (ФС), за счет образования активных форм

кислорода и появления собственной люминесценции ФС под действием излучения оптического диапазона. Комплексное взаимодействие основных составляющих ФД процесса, а именно использование ФС, избирательно накапливаемого патологическими образованиями, кислорода, находящегося в тканях организма, и излучения, селективно поглощаемого ФС, приводит с одной стороны к возможности фототерапевтического эффекта, называемого фотодинамической терапией (ФДТ), а с другой — открывает перспективы фотодинамической диагностики (ФДД). Принципиально, методы ФД воздействия в большинстве случаев неинвазивные, малотравматичные, селективно действующие

на патологические образования, допускающие многократность повторения воздействия. В ряде случаев дополнительное преимущество ФДТ и ФДД может заключаться в относительно низкой стоимости процедур за счет применения недорогих ФС и дешевых источников излучения, в частности светодиодов [8, 9]. При подборе соответствующих ФС и источника излучения существует возможность сочетания в одной процедуре флуоресцентной диагностики и терапевтического воздействия (тераностика) [10].

Благодаря физическому принципу, являющемуся основой метода, ФДТ получила широкое распространение в лечении таких серьезных патологий как онкология [1], гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей [2], особенно в случае поражения антибиотикорезистентными микроорганизмами, кожные болезни (псориаз [11], розацеа [12] и др.), гинекологические [13], офтальмологические [3] и ряда других заболеваний. Лечение каждого заболевания специфично, однако общими моментами при использовании ФД приемов являются селективность накопления ФС в патологическом очаге, высокая способность к генерации активных форм кислорода и к люминесценции ФС при облучении, фотостабильность при поглощении излучения, их низкая темновая токсичность, высокая скорость накопления в патологических очагах и скорость выведения из организма после ФД процедуры. В связи с этим становится очевидным, что наиболее важную роль в успешном проведении процесса ФД воздействия играет выбор ФС, в частности, его химическая природа и фотофизические свойства [14]. При этом существенное внимание также уделяется степени поражения организма патологическим очагом, что определяет возможность проникновения излучения для максимально полного поглощения световой энергии ФС. Даже вводится термин «идеальный ФС» в надежде на то, что в недалеком будущем он может быть получен и передан медикам [15].

Получению ФС посвящается огромное количество исследовательских работ, о чем можно судить из обзоров (например [15–17]). В настоящее время ведется поиск новых, более эффективных ФС в различных классах органических красителей, прежде всего среди порфиринов и их синтетических аналогов. Первые препараты, разработанные для ФДТ и ФДД (или только ФДТ), так называемые ФС первого поколения, такие как *Photofrin*, не обладали длинноволновой абсорбцией и вызывали повышенную чувствительность кожи пациентов к дневному свету в течение довольно долгого периода времени (до двух месяцев) после введения [18] из-за медленной скорости выведения их из организма. Указанные факторы ограничивали применение этих ФС в ФДТ. Синтез более совершенных ФС, или ФС второго поколения, позво-

лил перейти к модифицированным соединениям тетрапиррола (порфирина), таким как бензопорфирин (*Visudyne*), 5-аминолевулиновая кислота (5-ALA) (которая сама по себе является не ФС, а пролекарством — первичным компонентом синтеза тетрапирролов (порфиринов) в организме человека и индуцирует образование дополнительного протопорфирина IX при экзогенном введении в организм), хлорины (*Temoporfin*), фоскан (*Foscan*) и фотодитазин (*Fotoditazin*), которые обладают более интенсивным поглощением в длинноволновой области спектра [18]. Кроме того, были синтезированы и исследованы их металлизированные производные [19]. Фотосенсибилизаторам второго поколения присущи высокий квантовый выход активных форм кислорода, поглощение в длинноволновой области спектра, соответствующее диапазонам поглощения тканей (660–700 и 700–850 нм), короткий период полураспада в сыворотке крови и селективность накопления в тканях, минимальная токсичность при отсутствии света, высокая чистота конечного продукта [20]. Препараты третьего поколения получают путем связывания молекулы ФС с молекулами других веществ, наночастицами или липосомами с целью улучшения селективности накопления ФС в опухолевых клетках [21, 22]. Например, в них может присутствовать радиоактивный радикал, который позволяет связываться только с определенными белковыми носителями (моноклональные антитела, системы рецепторов и др.). Согласно исследованиям, эти ФС сочетают минимальную аккумуляцию в здоровых тканях с высокой специфичностью по отношению к патологически измененным тканям [23].

Создаются все новые и новые поколения ФС, однако, не все они выходят за пределы лабораторий, что свидетельствует о невозможности пока совместить все необходимые качества в одном ФС. В связи с этим весьма логичным является подход, определяемый понятиями «не навреди» и «из двух зол выбирают наименьшее», что определяет и выбор ФС, и источника излучения, и методику самого лечения и диагностики. Несмотря на всю сложность и комплексность проблемы, усилиями химиков, физиков, биологов, медиков разрабатывается и усовершенствуется сочетание максимального количества принципиальных свойств ФС и источников излучения, позволяющих проводить те или иные терапевтические и диагностические процедуры.

Так, например, в случае лечения солидных глубокозалегающих опухолей, до которых практически не доходит световое излучение, используется метод интраоперационной ФДТ. Отмечено, что хорошо поддаются лечению поверхностные новообразования онкологического (особенно на ранних стадиях), предракового и неонкологического характера. Весьма перспективным является ис-

пользование ФД воздействия в случае поражения кожных покровов, слизистых, гнойных патологий мягких тканей, где не столь важна глубина проникновения света.

В данном случае весьма перспективными могут оказаться водорастворимые ФС первого поколения порфириновой природы, такие как тетракалиевая соль копропорфирина III (ТКСКП) [24] и 2,4-ди(1-метоксиэтил) дейтеропорфирина-IX динариевая соль (димегин) [25]. Тетракалиевую соль копропорфирина III получают микробиологическим синтезом с последующей многократной очисткой, выход основного вещества составляет 89,25%, чистота — 90–96%. Димегин получают полусинтетическим способом из природного гемина (протогемина) путем его обработки раствором газообразного бромистого водорода с последующей очисткой. Выход основного вещества составляет 80–85%, а чистота динариевой соли 2,4-ди(1-метоксиэтил) дейтеропорфирина-IX — 99,5%. Данные ФС обладают низкой токсичностью (2400 ± 120 мг/кг — ТКСКП [26] и 240 ± 16 мг/кг — димегин при внутривенном введении крысам), что определяется их эндогенной природой. Дополнительными преимуществами этих ФС являются их высокая растворимость в водных растворах, селективность накопления в патологических очагах, высокая скорость выведения из организма.

Изучению фотофизических свойств ТКСКП и димегина уделено относительно мало внимания. Так, например, ТКСКП изучалась только *in vivo*, в первую очередь в ветеринарии, где показала, что потенциально имеет все шансы для применения в диагностике и лечении новообразований [27–30] и обладает большой скоростью накопления и выведения из организма.

Несмотря на то, что впервые димегин был синтезирован профессором Г.В. Пономаревым еще в 70–80 гг. прошлого века [31], изучению его эффективности как ФС уделялось мало внимания, поскольку у него, как у ФС порфириновой природы, нет достаточно ярко выраженного пика в области длин волн 600–800 нм, что несколько ограничивает его клиническое применение, где в случаях, когда необходимо глубокое проникновение излучения в ткани, работают именно в области этих длин волн. Опубликованы фотофизические и ФД свойства димегина, полученные различными научными группами [32–35]; в работе [32] был определен квантовый выход его генерации синглетного кислорода. Поскольку после ряда исследований димегин показал низкую токсичность [36], высокое сродство к патологическим образованиям [37, 38], хорошую ФД активность [39], в настоящее время его изучение возобновлено. Например, в работе [40] отмечен хороший бактерицидный эффект димегина по отношению к микробным клеткам *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*.

Вместе с тем известно, что эффективность терапевтического действия ФС определяется не только их фотофизическими свойствами, но и свойствами комплексных соединений ФС с липосомами, квантовыми точками, антителами, полимерами-носителями и транспортными белками крови, в основном альбумином, составляющим практически 60% этих белков, и/или липопротеинами высокой плотности, обеспечивающими целевую доставку ФС к патологическому очагу [41].

Учитывая сказанное выше, представляло интерес провести более детальное исследование фотофизических свойств димегина и ТКСКП по сравнению с уже используемыми в медицине ФС хлорофинового ряда — фотодитазин, радахлорином и фотолоном. Изучение свойств ФС с транспортными добавками, такими как альбумин и плюроник F-127, даст более широкое представление о фотофизических и терапевтических свойствах порфириновых ФС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе исследований были использованы следующие ФС:

- динариевая соль 2,4-ди(1-метоксиэтил)-дейтеропорфирина-IX (димегин) — лиофильно высушенный порошок, изготовленный в Институте биофизики Минздрава СССР, Москва,
- тетракалиевая соль копропорфирина III — раствор для инфузий для ветеринарии, предоставленный фирмой ЭЛЕСТ, Санкт-Петербург,
- фотодитазин — концентрат для приготовления растворов для инфузий — 50 мг в 10 мл воды для инъекций, регистрационный номер ЛС-001246, а также лиофильно высушенный порошок фирмы ООО «Вета-Гранд», Москва,
- родамин В, предоставленный в комплекте со спектрометром группой компаний «Люмэкс», Санкт-Петербург.

В качестве транспортных добавок исследовались

- яичный альбумин с молекулярной массой 45000, *Serva Electrophoresis GmbH* (в экспериментах с ТКСКП),
- альбумин бычий сывороточный (BSA) (ЗАО «Вектон») лиофилизированный с молекулярной массой 66 кД, чистота 98%,
- блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена — плюроник F-127 медицинского назначения фирмы *Sigma-Aldrich* (в опытах с димегинном).

В качестве растворителя в экспериментах с ТКСКП (1, 5, 10, 15, 20 мкМ) и фотодитазин (5, 27, 54 мкМ) использовался фосфатный буфер (pH = 7,0). В таком же буфере исследовалось влияние транспортных добавок (сывороточного альбумина и плюроника F-127) на эффективность

генерации синглетного кислорода, флуоресценцию и фотостабильность димегина и фотодитазина. В этих экспериментах концентрации димегина и фотодитазина составляли 10^{-5} М. Концентрация альбумина в полученных растворах — 10^{-5} М, концентрация плуроника — $0,9 \times 10^{-4}$ М. Растворы ФС с транспортной добавкой перемешивались на магнитной мешалке при температуре 20–22 °С в течение 15 мин (альбумин) и 40 мин (плуроник).

Спектры поглощения ФС в экспериментах с ТКСКП регистрировались на спектрофотометре ультрафиолетового и видимого диапазонов, модель 6405 фирмы *Jenway Ltd. (UK)* в 1- и 5-сантиметровых кюветках, в экспериментах с димегином — определялись с применением спектрофотометра *Shimadzu UV-3600* в 1-см кварцевых кюветках.

Спектры флуоресценции растворов комплексов ФС-альбумин и ФС-плуроник регистрировались спектрометром M266 при возбуждении флуоресценции излучением светодиодной матрицы с длиной волны $\lambda_m = 405$ нм и плотностью мощности $0,89$ Вт/см² в объеме исследуемого раствора 25–30 мл. Схема эксперимента приведена на рис. 1, она также использовалась в опытах по регистрации люминесценции синглетного кислорода.

Спектры флуоресценции в экспериментах с ТКСКП регистрировались с помощью прибора «Флюорат-02-Панорама», группа компаний «Люмэкс» (Россия). Растворы исследуемых ФС помещались во флуорометрическую кювету толщиной 10 мм. Возбуждение ФС проводилось в узком спектральном интервале. Прибор снабжен опорным каналом, интенсивность возбуждения ФС на разных длинах волн приводилась к одному значению. Спектры флуоресценции ТКСКП и фотодитазина, полученные при возбуждении ФС излучением с длиной волны 520 нм, использовались также для вычисления квантового выхода флуоресценции препаратов.

В основе определения квантового выхода флуоресценции ТКСКП и фотодитазина лежит стандартная методика, основанная на сравнении интенсивностей флуоресценции исследуемого ФС и ФС с известным квантовым выходом. В качестве ФС сравнения при длине волны возбуждения 520 нм был использован родамин В. Квантовый

выход его флуоресценции в воде составляет 31% [42, 43]. Чтобы минимизировать вклад реабсорбции флуоресценции, работа проводилась в разбавленных растворах ФС при оптической плотности $D \leq 0,15$ на длине волны возбуждения.

Отношение интенсивностей флуоресценций исследуемого ФС и ФС сравнения (при равенстве геометрической схемы измерений, интенсивности и длины волны возбуждающего света и используемом растворителе) рассчитывается как [44]

$$I_{\text{meas2}}/I_{\text{meas1}} = \varphi_2 D_2 / \varphi_1 D_1, \quad (1)$$

где φ_1 и φ_2 — квантовые выходы флуоресценции исследуемого вещества и вещества сравнения, D_1 и D_2 — оптические плотности растворов исследуемого вещества и вещества сравнения на длине волны возбуждения флуоресценции. Зная квантовый выход флуоресценции ФС сравнения φ_2 , и экспериментально определив отношение интенсивностей флуоресценции (I_{meas}) при условии, что оптические плотности исследуемого ФС и ФС сравнения равны, вычислялся φ_1 .

Оценка эффективности генерации синглетного кислорода димегином и фотодитазином в комплексе с сывороточным альбумином и плуроником проводилась методом прямой регистрации люминесценции синглетного кислорода, генерируемого при взаимодействии молекулярного кислорода в основном состоянии с облученным ФС, на длине волны 1270 нм. Образование комплексов регистрировалось по изменению спектра поглощения растворов, а именно, по батохромному сдвигу пика *Sore* ФС в длинноволновую область. Прямая регистрация генерации синглетного кислорода осуществлялась при облучении растворов излучением светодиодной матрицы с $\lambda_m = 405$ нм (плотность мощности $0,89$ Вт/см²) с применением спектрометра M266.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электронные спектры поглощения ФС

Спектры поглощения ТКСКП приведены на рис. 2. Они значительно отличаются от спектров фотодитазина отсутствием характерной для хлоринов интенсивной полосы в области 650 нм, но соответствуют спектрам других порфириновых ФС, например, спектру димегина [45–48] (рис. 3). Как можно видеть из рис. 3, все три ФС обладают интенсивной полосой поглощения в области 395–405 нм — полосой *Sore* — и четырьмя Q-полосами. Также отмечаются увеличенные амплитуды полос поглощения QI фотодитазина и радахлорина в области длины волны 650 нм, поскольку они являются хлориновыми ФС, в то время как у порфиринового ФС димегина данный пик не отличается по интен-

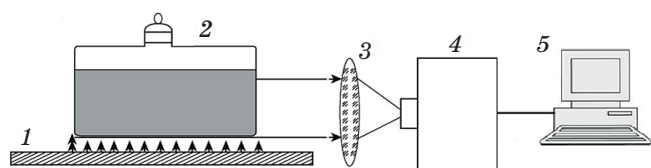


Рис. 1. Схема эксперимента по измерению флуоресценции ФС и генерации синглетного кислорода в растворе ФС. 1 — светодиодная матрица, 2 — кювета с раствором ФС, 3 — линза, 4 — спектрометр, 5 — персональный компьютер.

сивности от остальных Q-полос, что уже было упомянуто ранее. Полученные спектры фотодитазина находились в хорошем соответствии с данными, опубликованными в работах [49, 50], и подобны спектрам других хлориновых ФС, как то фотолон и радахлорин [45–48]. Положения максимумов поглощения димегина, ТКСКП и фотодитазина приведены в табл. 1.

Спектры буферных растворов ТКСКП (рис. 2а) характерны для класса порфиринов, поскольку обладают следующими полосами поглощения: полосой *Soret* на λ_1 (наиболее интенсивная в спектре) и четырьмя Q-полосами с меньшей интенсивностью (рис. 2б), отстоящими друг от друга

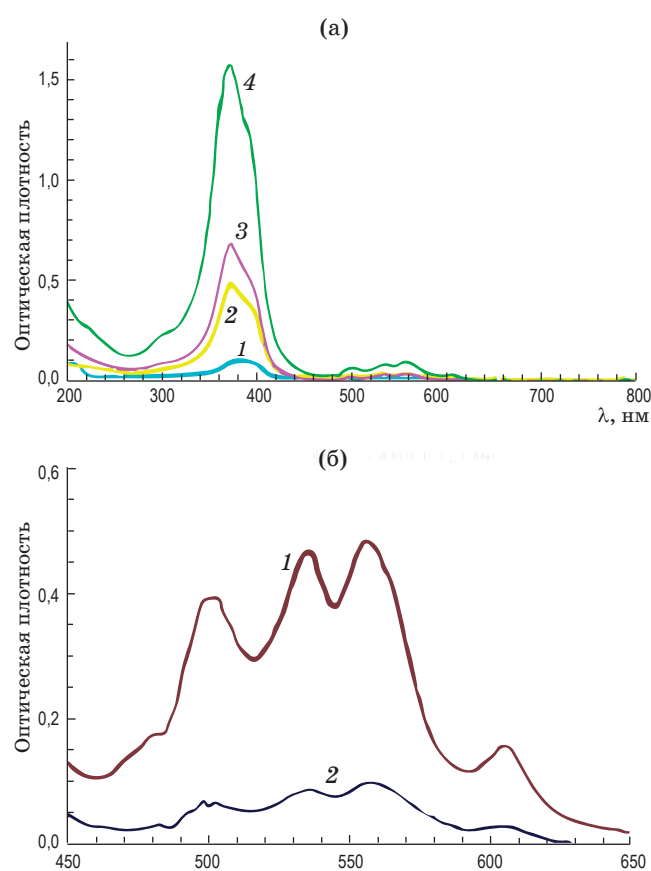


Рис. 2. Спектры поглощения ТКСКП в растворе фосфатного буфера pH = 7,0 в 1-см кювете концентрации ТКСКП 1 (1), 5 (2), 10 (3), 20 (4) мкМ — (а), в 5-см кювете концентрации ТКСКП 15 мкМ (1), в 1-см кювете концентрации ТКСКП 20 мкМ (2) — (б).

примерно на равные интервалы длин волн (QIV на λ_2 , QIII на λ_3 , QII на λ_4 , и QI на λ_5). Однако при этом, тип распределения интенсивностей в четырехполосном спектре у ТКСКП ($II > III > IV > I$) не соответствует ни одному из четырех возможных спектральных типов порфиринов: «этиотипу» ($IV > III > II > I$), «родотипу» ($III > IV > II > I$), «оксородотипу» ($III > II > IV > I$) и «филлотипу» ($IV > II > III > I$). Объяснением этому, по мнению авторов настоящей статьи, может служить смешанный состав ТКСКП, который по данным производителя на 89,25% состоит из тетракалиевого соли копропорфирина III, не более чем на 1% — из белковых и пептидных соединений и приблизительно на 10% — из примесей других порфиринов. В связи с этим можно предположить, что нехарактерная порфиринам картина спектра ТКСКП в области от 450 до 600 нм возникла в результате наложения спектров различных порфиринов, входящих в состав препарата.

Поскольку порфириновые и хлориновые препараты в водной среде склонны к агрегации, то спектр их поглощения достаточно сильно может зависеть от свойств среды, например значения pH. Так, ранее нами было показано, что фотодитазин и фотолон испытывают значительную дезагрегацию при увеличении pH раствора от 6,0 до 7,5 [47], при этом спектр димегина не сильно меняется

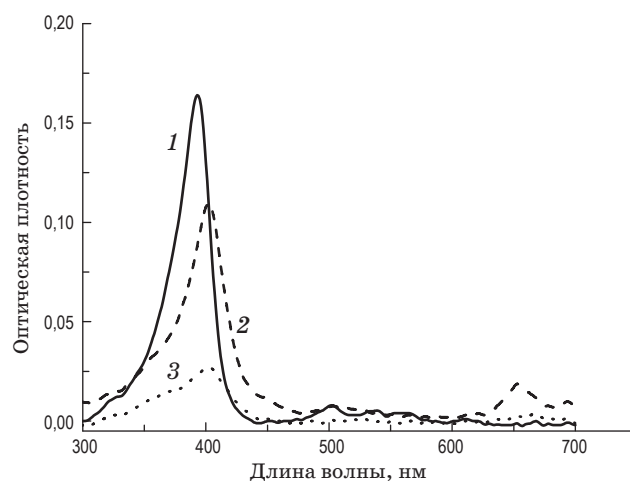


Рис. 3. Спектры оптического поглощения ФС (димегин (1), фотодитазин (2), радахлорин (3)) с концентрацией 1 мкМ [45].

Таблица 1. Положение максимумов поглощения димегина, ТКСКП и фотодитазина в фосфатном буфере, pH = 7,0

ФС	λ_1 , нм	λ_2 , нм	λ_3 , нм	λ_4 , нм	λ_5 , нм	Источник
Димегин	392	500	537	558	609	Настоящее исследование
ТКСКП	373	500	535	557	606	Настоящее исследование
Фотодитазин	403–408	503	536	601	656	Настоящее исследование
Фотодитазин	400	504	534	608	662	[49]

при изменении этого показателя. Также влияние на спектр поглощения ФС имеют транспортные добавки, например альбумин, который образует комплексы с порфиринами [46, 48, 51].

В настоящем исследовании представлялось важным сравнить влияние на спектральные свойства порфириновых и хлориновых ФС альбумина и плуроника F-127. Было показано, что добавление в раствор ФС (димегин, фотодитазин) сывороточного альбумина и плуроника повлекло за собой трансформацию основных полос спектра оптического поглощения ФС (рис. 4). У обеих транспортных добавок было зафиксировано смещение основного пика в спектрах поглощения как димегина, так и фотодитазина (пик *Soret* — 395–405 нм) в сторону длинноволновой области на 5–8 нм, наблюдаемое ранее в ряде работ при образовании комплекса порфирина с альбумином [46, 48, 51–55], а также изменение интенсивности полос поглощения. Так, например, при контакте ФС с плуроником произошло небольшое увеличение интенсивности поглощения, что, вероятно, может говорить об уменьшении размера агрегатов в растворе ФС за счет мицеллообразования.

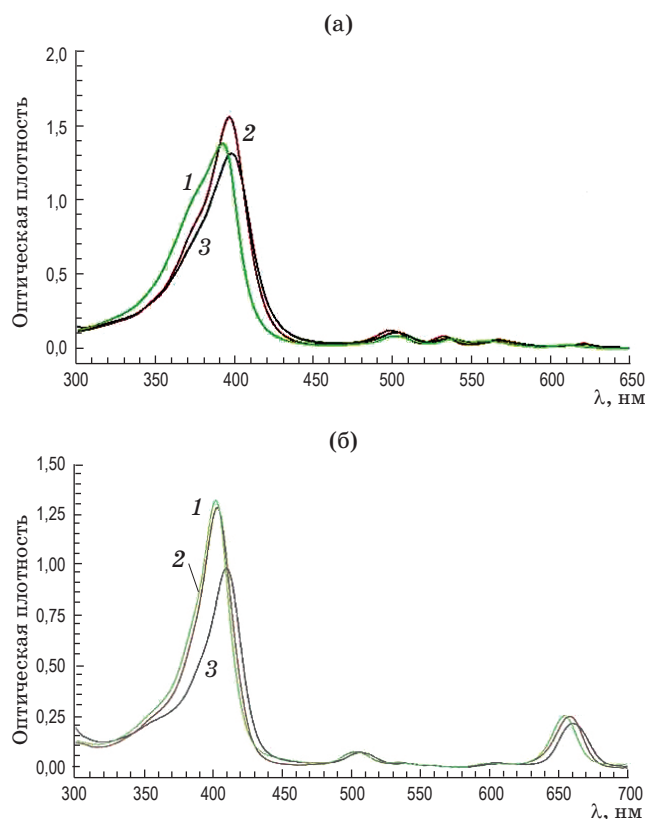


Рис. 4. Спектры поглощения комплексов димегина (а) и фотодитазина (б) с транспортными добавками. Раствор ФС (1), раствор комплекса ФС-плуроник (2), раствор комплекса ФС-альбумин (3). Концентрации димегина и фотодитазина в растворах 10^{-5} Моль/л, альбумина — 10^{-5} Моль/л, плуроника — $0,9 \times 10^{-4}$ Моль/л.

В результате образования комплекса ФС с альбумином наблюдалось наличие изобестической точки, которое говорит о том, что ФС в растворе может находиться только в двух состояниях — «свободном» (пик поглощения слева от изобестической точки) и связанном с альбумином в виде мономера (пик поглощения справа от изобестической точки) [54, 56]. В работе [46] показано наличие изобестической точки в спектрах димегина при добавлении альбумина различных концентраций в диапазоне от 7,8 до 500 мкМ. С возрастанием концентрации альбумина количество молекул ФС, находящихся в «свободном» состоянии, уменьшается, соответственно уменьшается и амплитуда полосы поглощения, отвечающего этому состоянию, а количество молекул ФС, связанных с альбумином, растет, что отражается на росте амплитуды полосы поглощения справа от изобестической точки. При относительно большой концентрации альбумина, когда все молекулы ФС оказываются в связанном с альбумином состоянии, рост амплитуды полосы поглощения комплекса ФС с альбумином прекращается. В настоящем исследовании и в работе [46] (при концентрациях ФС и альбумина, аналогичных настоящему исследованию), вероятно, не весь ФС переходил в комплекс, поэтому наблюдалась более низкая интенсивность поглощения комплекса ФС с альбумином по сравнению с интенсивностью полосы поглощения «свободных» ФС, измеренной до добавления альбумина. Авторы настоящей работы полагают, что при увеличении концентрации альбумина амплитуда полосы поглощения комплекса будет превышать амплитуду полосы поглощения ФС без альбумина, что и описано в работах [46, 48] при концентрации димегина 10 мкМ, а также в работе [51].

Можно отметить, что образование комплекса димегина с альбумином не вызывало значительного уменьшения оптического поглощения, в то время как поглощение комплекса фотодитазин-альбумин отличалось от исходного спектра фотодитазина примерно на 25%. Такое отличие вызвано, вероятно, более низкой фотостабильностью фотодитазина по сравнению с димегином.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ РАСТВОРОВ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Димегин достаточно эффективно образует синглетный кислород при облучении в растворе в видимой области спектра. Квантовый выход у димегина составляет 0,68 [32] (табл. 2). Квантовый выход синглетного кислорода у хлориновых препаратов также может достигать значения 0,7 [16, 57–61], но при определенных условиях, например, в фосфатном буфере с pH = 7,0 димегин может являться более эффективным ФС, чем препараты

Таблица 2. Генерация синглетного кислорода изучаемыми порфириновыми ФС и их аналогами

Название фотосенсибилизатора	Квантовый выход интер-конверсии	Квантовый выход $^1\text{O}_2$	Среда	Источник
Димегин	—	0,68	D ₂ O-этанол	[32]
Копропорфирин III	—	0,13	этанол	[62]
ТКСКП	—	0,18	D ₂ O, рD = 7–8	[57]
	—	0,41	D ₂ O + 2% Тритон X-100	
	—	0,37	фосфатный буфер (рН = 7,0)	
	—	0,17	фосфатный буфер (рН = 7,0) + овальбумин	
Фотодитазин	—	около 0,70	физиологический раствор	[16]
Фотодитазин	—	0,60	фосфатный буфер (рН = 7,0)	[57]
	—	0,19	фосфатный буфер ((рН = 7,0) + овальбумин	
	—	0,52	фосфатный буфер (рН = 7,0)	
Метиленовый синий	—	0,45	фосфатный буфер (рН = 7,0) + овальбумин	[57]
	—	0,52–0,62	H ₂ O	
	0,96	≤ 0,75	H ₂ O	
	0,96	—	этанол	
Радахлорин	—	—	0,01 М боратный буфер, рН = 9,18	[60]
	0,96	—	0,01 М боратный буфер с добавлением сывороточного альбумина человека, рН = 7,2	
	0,96	—	0,01 М боратный буфер с добавлением сывороточного альбумина человека, рН = 7,2	
	0,96	—	0,01 М боратный буфер с добавлением сывороточного альбумина человека, рН = 7,2	
Хлорин е6	—	0,67	tris-HCl буфер (рН = 8,5)	[61]
	—	0,6	tris-HCl буфер (рН = 7,4)	
	—	0,5	фосфатный буфер (рН = 6,3)	
Хлорин е6 + ПВП	—	0,74	tris-HCl буфер (рН = 8,5)	[61]
	—	0,75	tris-HCl буфер (рН = 7,4)	
	—	0,72	фосфатный буфер (рН = 6,3)	

на основе хлорина е6 (фотолон, фотодитазин, радахлорин) (рис. 5) [45, 47]. В работах [45, 47] эффективность образования синглетного кислорода определялась по скорости уменьшения концентрации химической ловушки синглетного кислорода — L-триптофана на начальном участке зависимости при облучении ФС в растворе. В табл. 2 показано, что квантовый выход синглетного кислорода ТКСКП находится в пределах 0,4 [57, 62].

На квантовый выход синглетного кислорода порфирина может влиять ряд факторов, связанных с состоянием ФС в среде. Так, в работе [61] показано, что квантовый выход синглетного кислорода хлорина е6, растворенного в буфере с рН = 8,5 (в котором ФС находится преимущественно в мономерном состоянии), составлял 0,67. Однако, уменьшение рН буфера до 6,3 приводило к агрегации молекул хлорина, уменьшая тем самым его квантовый выход до 0,5. Сохранение времени жизни триплетного состояния T1 ФС

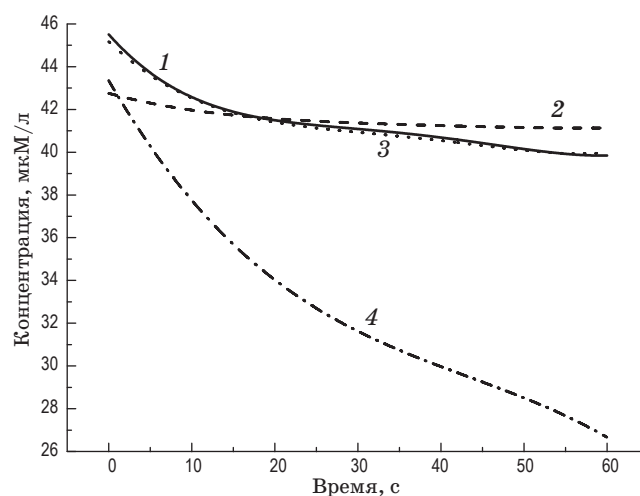


Рис. 5. Зависимости концентрации триптофана в буферном растворе (рН = 7,0), содержащем ФС (фотодитазин (1), радахлорин (2), фотолон (3), димегин (4)), от времени облучения реакционной смеси на длине волны 405 нм [47].

на уровне 2 мкс при подкислении раствора указывало на то, что размен энергии возбуждения мономерными молекулами, находящимися в триплетном состоянии, не изменялся при снижении pH среды. Агрегаты хлорина е6, видимо, переставали участвовать в образовании триплетного состояния ФС.

Транспортная добавка (поливинилпирролидон — ПВП), как показано в этой же работе, препятствовала образованию агрегатов хлорина, поэтому квантовый выход синглетного кислорода при всех исследованных pH оставался на уровне 0,7 и соответствовал мономолекулярному состоянию ФС. Деагрегация димегина в работе [63], обусловленная влиянием ПВП, оказывала наиболее сильное (по сравнению с полиэтиленоксидом и плюронином) положительное влияние как на эффективность процесса фотогенерации синглетного кислорода, так и на эффективность реакции фотоокисления субстрата в D_2O .

Исследуемая в настоящей работе транспортная добавка плюроник F-127 также способствует деагрегации ФС [63], поэтому, например, не только не уменьшает эффективность образования синглетного кислорода при облучении димегина, оцениваемую по скорости падения концентрации химической «ловушки» синглетного кислорода — L-триптофана на начальном участке зависимости, что показано в работе [64] (рис. 6), но и увеличивает ее по результатам работы [63]. В работах [65, 66] показано более заметное (примерно в 1,5 раза) увеличение фотокаталитической активности комплексов плюроника F-127 с димегином и фотодитазином, наблюдавшееся в процессе окисления L-триптофана синглетным кислородом в водносолевом растворе. По всей видимости, степень солюбилизации или деагрегации порфириновых ФС зависит от исходного соотношения между молярными концентрациями порфирина и плюроника, что в итоге сказыва-

ется на эффективности генерации синглетного кислорода комплексом порфирина-плюроник [67].

В настоящем исследовании эффективность генерации синглетного кислорода при облучении димегина с плюронином, охарактеризованная по интенсивности люминесценции 1O_2 на длине волны 1270 нм при облучении растворов ФС светом с $\lambda_m = 405$ нм, несколько возросла из-за деагрегации ФС (рис. 7). На рисунке представлены данные димегина, но похожая зависимость наблюдалась и у фотодитазина. Для наглядности на рисунке также добавлен спектр люминесценции 1O_2 в растворе димегина без транспортных добавок.

В отличие от полимерных транспортных добавок, белковые соединения, осуществляющие транспортные функции в крови, например, альбумин и трансферин, оказывают противоположное воздействие на эффективность генерации синглетного кислорода при облучении порфириновых ФС. Так, в работе [68] было показано, что при образовании комплексов с трансферинном время жизни триплетных состояний порфириновых ФС возрастало, в то время как эффективность образования синглетного кислорода падала. Первое было связано с деагрегацией порфиринов, а второе — с тушением образовавшегося синглетного кислорода аминокислотами трансферина.

Способность альбумина нековалентно связываться с большим числом эндогенных или экзогенных лекарственных средств обусловлена существованием по крайней мере шести сайтов связывания высокого сродства в молекуле альбумина [69]. Был идентифицирован специфический сайт связывания порфириновых мономеров [70], расположенный в аминокислотной последовательности альбумина 124–298. Порфириновые молекулы с высокой константой связывания при контакте с молекулой альбумина занимают предназначенное им природой место в виде мономеров, образуя порфирин-альбуминовый комплекс. В данном месте молекулы альбумина находятся 2 аминокислоты тирозина, которые являются активными тушителями синглетного кислорода. Альбумин также является основным тушителем синглетного кислорода в плазме крови [62].

В настоящем исследовании было показано, что эффективность образования синглетного кислорода при облучении ФС также уменьшалась в результате образования комплекса ФС-альбумин, однако, незначительно (рис. 7). Отмечено [51] уменьшение эффективности образования синглетного кислорода димегином при добавлении бычьего сывороточного альбумина на 20%. В исследовании [57], сравнивавшем фотосенсибилизирующие свойства ТКСКП и фотодитазина при добавлении и без добавления овальбумина в буферном растворе с pH = 7,0, было показано, что при добавлении альбумина квантовые выходы образования син-

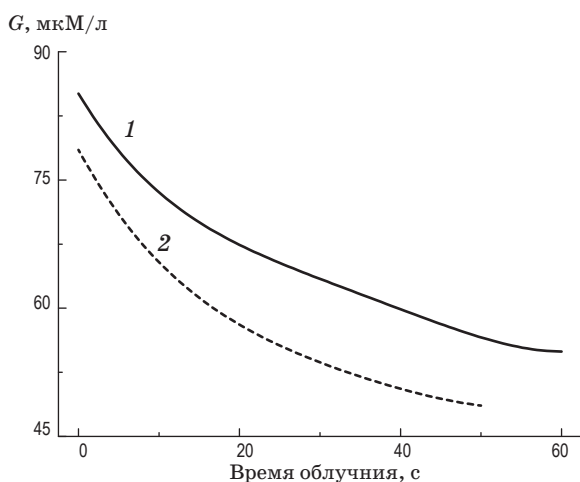


Рис. 6. Эффективность генерации синглетного кислорода комплексом димегин-плюроник (1) и димегином (2) [64]. G — концентрация триптофана в растворе.

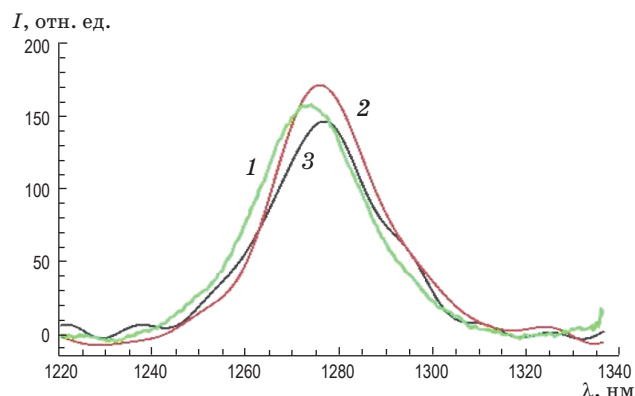


Рис. 7. Спектры люминесценции синглетного кислорода, полученного при заключении в комплексы димерина. 1 — димерин без добавок, 2 — димерин-плюроник, 3 — димерин-альбумин. Концентрации димерина в растворах 10^{-5} Моль/л, альбумина — 10^{-5} Моль/л, плюроника — $0,9 \times 10^{-4}$ Моль/л.

глетного кислорода обоих ФС падали в 2–3 раза и становились практически равными друг другу (табл. 2).

Снижение квантового выхода генерации синглетного кислорода комплексом порфирина-альбумин с одной стороны может быть объяснено «локальным» тушением синглетного кислорода молекулами тирозина в составе альбумина, с другой — разрушением ФС посредством образованного им же самим синглетного кислорода, находящегося в непосредственной близости от ФС. В подтверждение этих предположений свидетельствует полученный в нашей работе [57] факт, что ФС непорфириновой природы (метиленовый синий, служивший ФС сравнения при определении квантовых выходов) демонстрировал совсем другое поведение при контакте с альбумином. Квантовый выход генерации синглетного кислорода метиленовым синим в результате контакта с альбумином практически не менялся (табл. 2). Вероятно, ФС метиленовый синий при образовании комплекса с альбумином располагался на внешней поверхности глобулы альбумина, вдали от «активных» аминокислотных поглотителей синглетного кислорода. Поверхностный контакт молекулы метиленового синего с молекулой альбумина, в отличие от связывания порфиринов в специфическом сайте белка, расположенном в глубине белковой глобулы, а также более высокая фотофизическая стабильность метиленового синего обеспечили сохранность его химической структуры и фотофизических свойств в ФД процессе.

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Флуоресцентные спектры порфиринов — как димерина [46–48] (рис. 8), так и ТКСКП (рис. 9) смещены в сторону более коротких длин волн по срав-

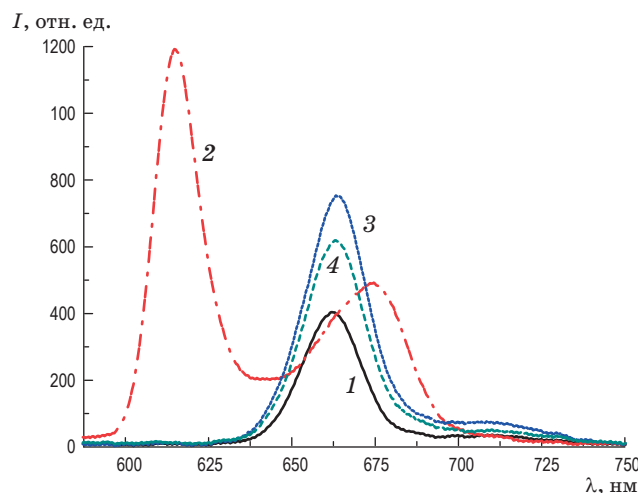


Рис. 8. Спектры флуоресценции ФС в дистиллированной воде (pH = 6,0). Фотолон (1), димерин (2), фотодитазин (3), радахлорин (4) [47].

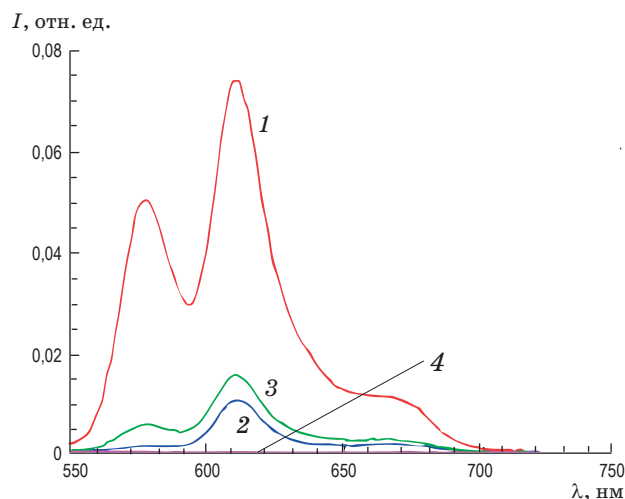


Рис. 9. Спектры флуоресценции ТКСКП с концентрацией 20 мкМ в буферном растворе при возбуждении излучениями фиолетового светодиода, $\lambda_{\max} = 406$ нм (1), синего светодиода, $\lambda_{\max} = 475$ нм (2), зеленого светодиода, $\lambda_{\max} = 520$ нм (3), 4 — базовая линия (буфер).

нению с флуоресцентными спектрами хлоринов (фотолон, фотодитазин, радахлорин), представленными на рис. 8, поскольку имеют свойство зеркальной симметрии со спектрами поглощения [71]. В отличие от димерина, у которого флуоресценция характеризуется двумя хорошо разделенными максимумами, флуоресцентный спектр ТКСКП состоял из трех полос. Трехпиковое распределение интенсивностей в спектре флуоресценции ТКСКП могло быть влиянием pH среды [72]. Сравнение полученных спектров флуоресценции фотодитазина с данными других авторов [73] не выявило противоречий между результатами различных исследований (табл. 3).

Таблица 3. Положение максимумов флуоресценции димегина, ТКСКП и фотодитазина

Название ФС	λ_0 , нм	λ_1 , нм	λ_2 , нм	Среда	Источник
ТКСКП	578	611	665	Фосфатный буфер	Настоящее исследование
Димегин	—	617	679	Фосфатный буфер	Настоящее исследование
Фотодитазин	—	659	около 730	Фосфатный буфер	Настоящее исследование
Фотодитазин	—	около 670	около 740	Физиологический раствор	[73]

Таблица 4. Квантовые выходы флуоресценции (ϕ) исследуемых ФС и их аналогов

Название ФС	ϕ	Среда	Источник
ТКСКП	0,051	фосфатный буфер, pH = 7,0, концентрация ФС 5 мкМ	Настоящее исследование
	0,053	фосфатный буфер, pH = 7,0, концентрация ФС 10 мкМ	
	0,051	фосфатный буфер, pH = 7,0, концентрация ФС 20 мкМ	
Димегин	0,022	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 3,3 мкМ	[46, 47]
Димегин	0,025	H ₂ O, pH = 6,0, концентрация ФС 3,3 мкМ	[47]
Димегин	0,013	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 3,3 мкМ + BSA	[46]
Димегин	0,024	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ	[46, 47]
Димегин	0,016	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ + 8 мкМ BSA	[46]
	0,016	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ + 16 мкМ BSA	
	0,016	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ + 31 мкМ BSA	
	0,016	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ + 63 мкМ BSA	
	0,017	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ + 130 мкМ BSA	
	0,016	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ + 250 мкМ BSA	
	0,015	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 10 мкМ + 500 мкМ BSA	
Хлорин е6	0,05	H ₂ O, pH = 7–8	[74]
Хлорин е6	0,16–0,18	фосфатный буфер, pH = 6,3–8,5	[75]
Фотодитазин	0,033	фосфатный буфер, pH = 7,0, концентрация ФС 5 мкМ	Настоящее исследование
	0,033	фосфатный буфер, pH = 7,0, концентрация ФС 27 мкМ	
Фотодитазин	0,034	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 5 мкМ	[46, 47]
Фотодитазин	0,014	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 5 мкМ + BSA	[46]
Фотодитазин	0,017	H ₂ O, pH = 6,0, концентрация ФС 5 мкМ	[47]
Фотолон	0,16–0,22	—	[22]
Фотолон	0,016	H ₂ O, pH = 6,0, концентрация ФС 0,6 мкМ	[47]
Фотолон	0,04	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 0,6 мкМ	[46, 47]
Фотолон	0,014	фосфатный буфер, pH = 7,5, концентрация ФС 0,6 мкМ + BSA	[46]
Радахлорин	0,04	Этанол	[59, 60]
	0,04	0,01 М боратный буфер, pH = 9,18	

Квантовый выход ТКСКП и фотодитазина был определен по формуле (1); результаты вычислений представлены в табл. 4 в сравнении с данными других исследований. Полученные значения квантового выхода флуоресценции ТКСКП (0,05) и фотодитазина (0,03) незначительно отличаются друг от друга. Данные по фотодитазину хорошо

согласуются с данными, приведенными в работах [46, 47], и близки по значению к квантовому выходу флуоресценции радахлорина [59, 60].

Из табл. 4 видно, что значения квантового выхода флуоресценции, определенные разными группами исследователей, обладают достаточно большим разбросом. В частности, в работе [74] данный пара-

метр хлорина е6 составляет 0,05, а в исследовании [75] — 0,16–0,18. Аналогичный разброс значений ϕ наблюдается и у фотолонна [22, 46]. Возможно, упомянутое выше различие связано с особенностями экспериментальных методик, различными концентрациями ФС и свойствами среды.

На квантовый выход флуоресценции порфиринов и хлоринов может влиять агрегация ФС в среде. Так, нами [47] было показано, что квантовый выход флуоресценции фотодитазина и фотолонна в результате дезагрегации молекул ФС, вызванной повышением pH среды с 6,0 до 7,5, возрастал в 2,5 раза.

Комплексообразование с альбумином также заметно сказывается на квантовом выходе флуоресценции ФС. Так, например, в работе [46] показано, что добавление альбумина в раствор ФС в фосфатном буфере с pH = 7,5 снижало квантовый выход флуоресценции димегина, фотодитазина и фотолонна в 2–2,5 раза, при этом концентрация альбумина не влияла на квантовый выход ФС в комплексе.

В работах [74, 76], где изучали хлорин е6 и водорастворимые P(V)-порфирины, наблюдалось сокращение длительности флуоресценции ФС после образования комплекса с альбумином. В обоих случаях тушение флуоресценции было объяснено механизмом передачи электрона.

Результаты изучения спектров флуоресценции комплексов ФС с альбумином и плуроником представлены на рис. 10. Из рисунка видно, что взаимодействие ФС как с плуроником, так и с альбумином приводит к bathochromному сдвигу спектров испускания ФС. При этом наблюдается значительная разница в структуре комплексов порфирина-плуроник и порфирина-альбумин, которая проявляется в изменении интенсивности флуоресценции комплексов по сравнению с флуоресценцией исходных ФС. Так, увеличение интенсивности флуоресценции ФС при добавлении плуроника свидетельствует о разрушении агрегатов ФС. Снижение интенсивности флуоресценции комплексов ФС с альбумином, по всей видимости, связано с разрушением ФС в составе комплекса, вызванным ФД процессами, причем у принципиально менее фотостабильной молекулы фотодитазина данный процесс проявляется более явно (рис. 10б).

ФОТОСТАБИЛЬНОСТЬ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

Фотостабильность играет одну из ключевых ролей в определении эффективности ФС. Именно поэтому авторы данного исследования уделяют особое внимание изучению данного параметра. Действительно, в работе [45] показано, что фотостабильность димегина значительно выше, чем фотостабильность фотодитазина и радахлорина при прочих равных условиях. Причина столь высокой разницы в фотостабильности, прежде всего, заключается в различии их химической структуры: основной химической структуры димегина является порфириновое кольцо, что относит данный ФС к циклическим ароматическим аминам, характеризующимся высокой симметрией. Высокая симметрия химической структуры, вероятно, определяет его относительно низкую реакционную способность в реакциях с синглетным кислородом. В то же время в основе хлоринов фотодитазина и радахлорина — пиррольный цикл с одной гидрированной углерод-углеродной двойной связью, которая вызывает нарушение симметрии хлоринового ядра этих ФС и, как следствие, его устойчивости к внешним воздействиям (в частности, к облучению светом), что приводит к разрушению молекулы. Также отмечается, что основным элементом, разрушающим молекулы ФС при облучении их видимым светом, может являться синглетный кислород.

В настоящей работе было изучено влияние транспортных добавок на фотостабильность димегина и фотодитазина. Фотостабильность комплексов ФС с транспортными добавками оценивалась по изменению концентрации ФС в растворе при облучении светодиодной матрицей с излучением $\lambda_m \approx 395\text{--}405\text{ нм}$ с плотностью мощности 250 мВт/см^2 .

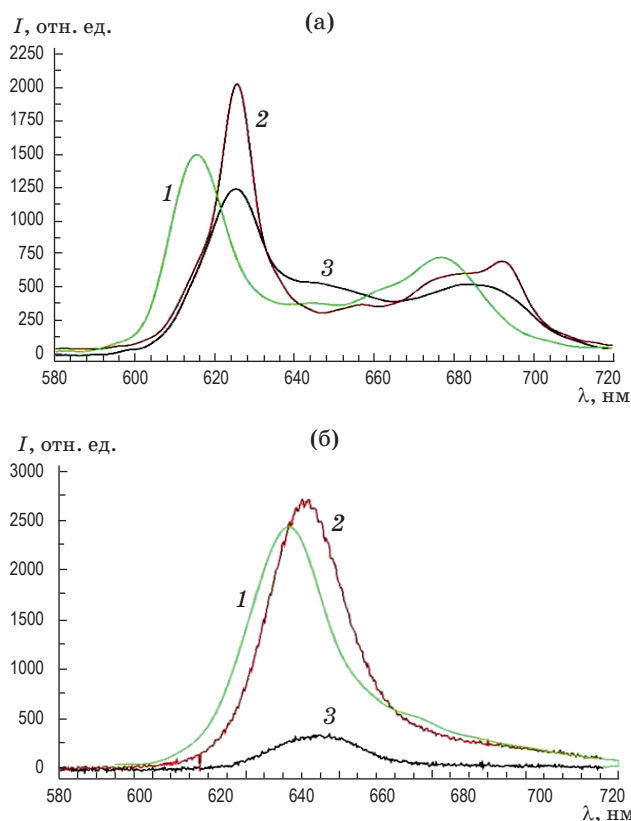


Рис. 10. Спектры флуоресценции димегина и его комплексов (а) и фотодитазина и его комплексов (б). 1 — ФС без добавок, 2 — ФС-плуроник, 3 — ФС-альбумин.

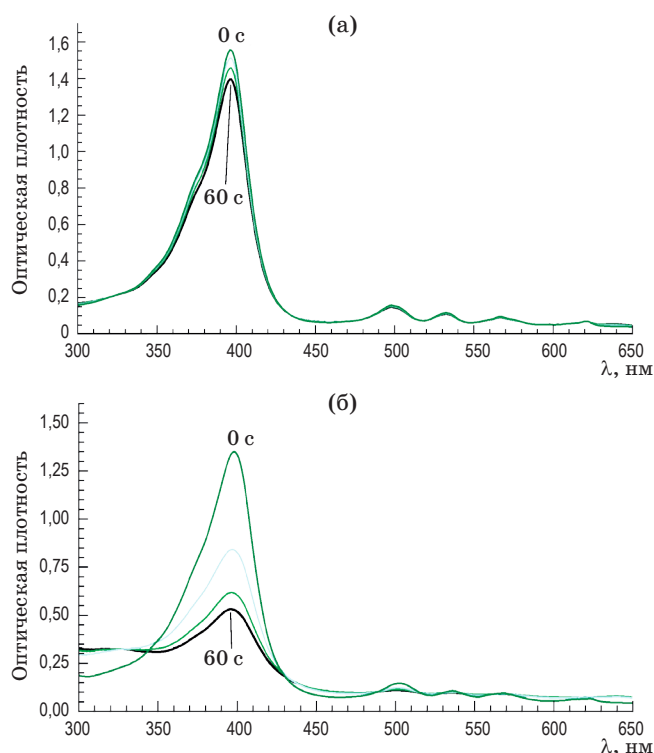


Рис. 11. Изменение спектров оптического поглощения растворов димегин + плюроник (а) и димегин + альбумин (б) при облучении на $\lambda_m \approx 395\text{--}405$ нм с шагом по времени в 20 с.

На рис. 11 представлено изменение спектра оптического поглощения димегина с плюронином и димегина с альбумином при облучении в течение минуты. Как видно из рисунка, фотостабильность раствора комплекса димегина с альбумином значительно ниже, чем раствора комплекса димегина с плюронином. Похожая зависимость наблюдалась и для фотодитазина. О возможных причинах снижения фотостабильности комплекса ФС-альбумин, связанных, вероятно, с образованием активных форм кислорода при облучении ФС в составе комплекса, в данной работе написано выше.

Результаты по фотостабильности ФС с различными транспортными добавками представлены на рис. 12 в виде изменения концентрации ФС при облучении растворов. Представленные результаты еще раз подчеркивают различное состояние ФС в результате взаимодействия с транспортными добавками полимерной и белковой природы, а также свидетельствуют о более высокой фотостабильности димегина, связанной с его химической структурой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что низкотоксичные фотосенсибилизаторы эндогенной природы, такие как тетракалие-

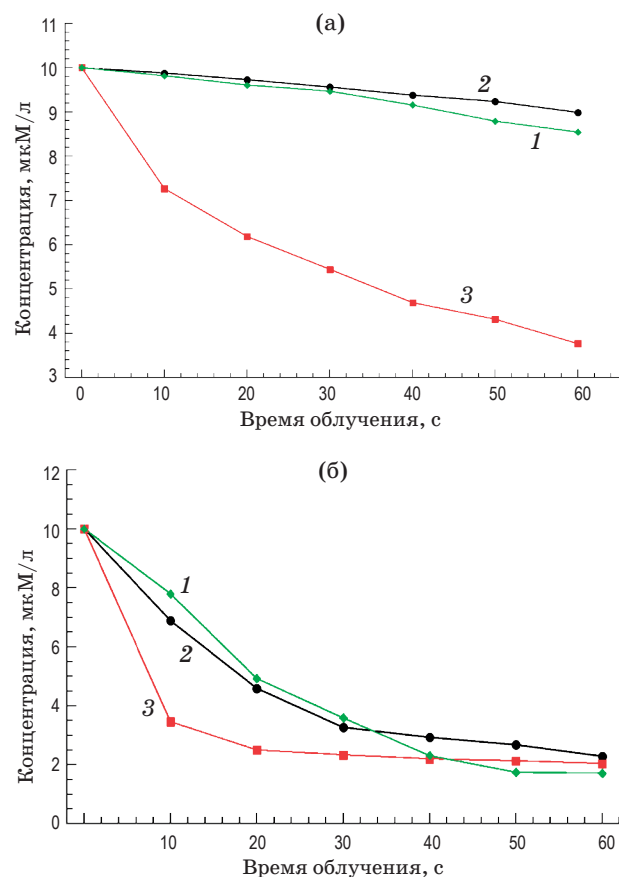


Рис. 12. Зависимости концентрации димегина (а) и фотодитазина (б) в растворе от времени облучения (фотостабильность). 1 – ФС без добавок, 2 – ФС + плюроник, 3 – ФС + альбумин.

вая соль копропорфирина III (ТКСКП) и динатриевая соль 2,4-ди(1-метоксиэтил) дейтеропорфирина IX (димегин), относящиеся к классу порфиринов, *in vitro* обладают высокой способностью к генерации синглетного кислорода и флуоресценцией при облучении их растворов светом видимого диапазона. Определены и изучены квантовые выходы данных процессов эндогенных ФС, которые незначительно отличаются от таковых для хлориновых ФС, например, фотодитазина, радахлорина и фотолонна. Отмечено влияние pH среды на фотосенсибилизирующие и флуоресцентные характеристики ФС, которое обусловлено различной степенью ассоциации молекул ФС в растворе.

В работе значительное внимание уделено влиянию транспортных агентов полимерной (плюроник F-127) и белковой (альбумин) природы на характеристики ФС в составе комплекса. Различное состояние ФС в комплексе с плюронином и альбумином, вызванное принципиальным отличием в формировании полимерных и белковых комплексов, приводит к различному изменению спектров оптического поглощения и флуоресценции, фотосенсибилизирующих свойств и фотостабиль-

ности комплексов. Отмечено улучшение (или стабилизация) всех изученных свойств при контакте ФС с плуроником в результате дезагрегации ФС и ухудшение эффективности флуоресценции, генерации синглетного кислорода и фотостабильности при образовании комплексов ФС-альбумин, имеющее более сложные причины, связанные с влиянием аминокислот альбумина, образуемым при облучении ФС синглетным кислородом, геометрией специфических сайтов связывания молекул порфирина (хлорина) и альбумина.

Ухудшение характеристик при образовании комплексов ФС с альбумином в большей степени проявляется в ФС хлориновой природы, например, фотодитазине, чем в порфириновых ФС (димегине и ТКСКП), что, вероятно, связано с менее стабильной химической природой молекул хлорина.

Полученные результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования порфириновых ФС в процессах в медицинской практике. Порфириновая природа ФС определяет их высокую фотостабильность по сравнению с ФС на

основе хлоринов, особенно в комплексе с транспортным белком — альбумином. При этом амфифильность молекулы димегина вызывает высокую селективность данного ФС к патологическому очагу (16–30 раз), что значительно повышает его шансы на медицинское использование в ФД процессах по сравнению с тетракалиевой солью копропорфирина III, которая по своей химической природе более гидрофильна.

Дополнительным преимуществом димегина и ТКСКП является их низкая токсичность и относительная дешевизна, что в значительной степени расширяет сферы использования данных ФС, поскольку нередко именно эти параметры тормозят внедрение в медицинскую практику новых и уникальных ФС.

Авторы благодарят фирму ЭЛЕСТ, Санкт-Петербург, за предоставленные ТКСКП для исследований, а также группу компаний «Люмэкс», Санкт-Петербург, за предоставление родамина В в комплексе со спектрометром «Флюорат-02-Панорама» для изучения флуоресценции ТКСКП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каплан М.А., Капинус В.Н., Попучиев В.В., Романко Ю.С., Ярославцева-Исаева Е.В., Спиченкова И.С., Шубина А.М., Боргуль О.В., Горанская Е.В. Фотодинамическая терапия: результаты и перспективы // Радиация и риск. 2013. Т. 22. № 3. С. 115–123.
2. Странадо Е.Ф., Коробов Е.М., Толсты М.П. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей // Хирургия. 2000. № 9. С. 67–70.
3. Медведев И.Б., Беликова Е.И., Сямичев М.П. Фотодинамическая терапия в офтальмологии. М.: Москва, 2006. 145 с.
4. Khanna R. Fluorescence diagnostics: A forthcoming noninvasive screening adjunct in oral cancer // J. Res. Med. Den. Sci. 2016. V. 4. № 2. P. 79–82.
5. Fritsch C., Ruzicka T. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy of skin diseases // Handbook and Atlas, 1st ed. / Springer, 2003. 128 p.
6. Kriz M., Hegyi J., Ruzicka T., Berking C. Fluorescence diagnostics as a guide for demarcation and biopsy of suspected anal cancer // Int. J. Dermatol. 2012. V. 51. № 1. P. 31–34.
7. Stepp H., Waidelich R. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in urology // Aktuelle Urol. 2007. V. 38. № 6. P. 455–464.
8. Zelickson B.D. Mechanisms of action of topical aminolevulinic acid // Photodynamic Therapy, 1st ed. / Ed. by Goldman M.P. Philadelphia: Elsevier. Saunders, 2005. P. 1–12.
9. Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R. Photodynamic therapy: Update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2007. V. 21. P. 2933–2935.
10. Деев С.М., Лебедево Е.Н. Супрамолекулярные агенты для тераностики // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 5. С. 539–552.
11. Баранова О.В. Фотодинамическая терапия псориаза препаратами тетрасульфоталочининового ряда // Канд. дис. М.: ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, 2009. 122 с.
12. Бутон Ю.С., Ахтямов С.Н., Демина О.М. Фотодинамическая терапия в лечении угревой болезни // Тез. докл. VI Междунар. конгр. «Kosmetik International». М., 2007. С. 105–106.
13. Дадвани С.А., Зуев В.М., Харнас С.С., Беляева Л.А., Лощенов В.Б. Фотодинамическая терапия в гинекологии // Лазерная медицина. 2000. Т. 4. № 4. С. 72–79.
14. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В., Смирнова З.С., Оборотова Н.А. Фотодинамическая терапия — способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13. № 3. С. 109–118.
15. Кудинова Н.В., Березов Т.Т. Фотодинамическая терапия рака: поиск идеального фотосенсибилизатора // Биомедицинская химия. 2009. Т. 55. № 5. С. 558–569.

16. Решетников А.В., Швец В.И., Пономарев Г.В. Водорастворимые тетрапиррольные фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии рака (обзор) // Успехи химии порфиринов. Т. 2. Гл. 4. СПб.: НИИ Химии СПбГУ. 1999. С. 70–114.
17. Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C.J., Sibata C.H. Photosensitizers in clinical PDT // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2004. V. 1. № 1. P. 27–42.
18. MacDonald I.J., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy // Porphyrins Phthalocyanines. 2001. V. 5. № 2. P. 105–129.
19. Ali H., van Lier J.E. Metal complexes as photo- and radiosensitizers // Chem. Rev. 1999. V. 99. № 9. P. 2379–2450.
20. Moreira L.M., dos Santos F.V., Lyon J.P., Maftoun-Costa M., Pacheco-Soares C., and da Silva N. Photodynamic therapy: Porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers // Aust. J. Chem. 2008. V. 61. P. 741–754.
21. Josefsen L.B. and Boyle R.W. Photodynamic therapy: Novel third-generation photosensitizers one step closer? // British J. Pharmacology. 2008. V. 154. P. 1–3.
22. Трухачева Т.В., Шляхтин С.В., Исаков Г.А., Истомин Ю.П. Фотолон – новое средство для фотодинамической терапии. Минск: РУП «Белмедпрепараты», 2009. 64 с.
23. Курочкина А.Ю., Плавский В.Ю., Юдина Н.А. Классификации фотосенсибилизаторов антимикробной фотодинамической терапии заболеваний периодонта // Медицинский журнал. 2010. № 2. С. 131–133.
24. Полатовская О.Г., Барабанищикова Г.В., Малков М.А., Быховский В.Я., Лукина О.А. Штамм бактерий *arthrobacter globiformis* – продуцент копропорфирина III и способ получения копропорфирина III // Патент России № 2078138. 1993.
25. Пономарев Г.В., Трухин В.П., Красильников И.В., Муравьева Т.Д., Койфман О.И., Кириллова Г.В., Дадеко А.В. Способ получения динатриевой соли 2,4-ди (1-метоксиэтил) дейтеропорфирина IX (димегина) // Патент России № 2647588. 2018.
26. Belousova I.M., Dobrun M.V., Galebskaya L.V., Gorelov S.I., Kislyakov I.M., Kolbasov S.E., Kris'ko A.V., Kris'ko T.K., Malkov M.A., Murav'eva T.D., Petrishchev N.N. New preparation based on coproporphyrin III for photoluminescence diagnostics and photodynamic therapy // Proc. SPIE. 2010. V. 7822 P. 78220W-1–78220W-6.
27. Малков М.А., Петрищев Н.Н., Мишуткин С.Н. Разработка способа фотодинамической терапии для лечения неопластических новообразований с использованием фотосенсибилизатора на основе препарата копропорфин // Фундаментальные исследования. 2008. № 1. С. 142–145.
28. Барабанищикова Г.В., Курнаков А.М., Малков М.А., Мельников А.С. Эффективность фотодинамической терапии экспериментальной лимфосаркомы Плисса с использованием копропорфирина III // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 2004. Т. XI. № 4. С. 68–70.
29. Барабанищикова Г.В., Кузьмин Д.Н., Кувалдин Э.В., Малков М.А., Мельникова А.С. Влияние лазериндуцированной фотохимической реакции копропорфирина III на функциональные свойства сосудов микроциркулярного русла // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2004. № 3. С. 64–67.
30. Petrishchev N.N., Malkov M.A., Galebskaya L.V., Solovtsova I.L., Melnikov A.S. Photodynamic effects of coproporphyrin III // Тез. докл. 12 Intern. Congr. EMLA, WALT, ELA & CSULM-CLSJEP. Praha. 2007. P. 17.
31. Жамкочан Г.А., Кириллова Г.В., Пономарев Г.В., Романычев Ю.А., Сухин Г.М., Черненко О.В., Ярцев Е.И., Яшунский В.Г. Водорастворимые соли 2,4-ди-(α -метоксиэтил)-дейтеропорфирина IX, обладающие способностью локализоваться в раковых тканях // Патент России № 1160710. 1996.
32. Красновский А.А. мл., Егоров С.Ю., Назарова О.В., Ярцев Е.И., Пономарев Г.В. Фотогенерация синглетного молекулярного кислорода водорастворимыми порфиринами // Биофизика. 1987. Т. 32. № 6. С. 982–993.
33. Глаголев Н.Н., Роговина С.Ж., Соловьева А.Б., Аксенова Н.А., Котова С.Л. Фотокаталитическая активность водорастворимых тетрапиррольных соединений в присутствии аминоксодержащих полимеров // Журнал физ. химии. 2006. Т. 80. № 1. С. 72–76.
34. Миславский О.В., Алексеев Ю.В., Пономарев Г.В. Сравнительное исследование фотодинамического эффекта фотосенсибилизаторов, производных гематопорфирина и хлорина е6 с поглощением в полосе Core // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12. № 2. С. 57–57.
35. Пономарев Г.В., Егоров С.Ю., Стрижаков А.А., Козлов А.С., Красновский А.А. мл. Фотогенерация синглетного кислорода сенсбилизаторами тетрапиррольного ряда в связи с проблемами фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12. № 2. С. 68.
36. Gorelov S.I., Dobrun M.V., Murav'eva T.D., Starodubtsev A.M., Kris'ko A.V., Kiselev V.M., Bagrov I.V., Dadeko A.V., Kolbasov S.E., Ponomarev G.V. Study of photophysical properties of the “Dimegin” and its preclinical studies // Fotodin. Terap. Fotodiagn. (Biomedical Photonics). 2014. № 1. P. 18.
37. Решетников А.В., Жигальцев И.В., Коломейчук С.Н., Каплун А.П., Швец В.И., Жукова О.С., Карменян А.В., Иванов А.В., Пономарев Г.В. Получение и некоторые свойства липосомного препарата 2,4 –ди (1-метил-3-гидроксибутил) дейтеропорфирина IX // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. № 10. С. 782–790.
38. Центр лазерной медицины, лекция 5: «Оценка биологических свойств новых фотосенсибилизаторов хлоринового ряда» [Электронный ресурс] – Режим доступа: oncologic.narod.ru.

39. Lagoda T.S., Kaplan M.A., Bondar A.M., Ponomarev G.V., Zubov B.V., Nikitin A.P., Egorova S.V., Ivanov E.A., Glushkova A.F., Kirichenko A.V., Iskra E.V., Lepikhin N.P., Brovin A.I., Spichenkova O.N. Study of photodynamic treatment for P-388 lympho-leukemia in mice // *Vopr. Onkol.* 2011. V. 57. № 1. P. 75–80.
40. Бондаренко В.М., Алексеев Ю.В., Миславский О.В., Пономарев Г.В. Перспективы применения динатриевой соли 2,4-ди(1-метоксиэтил)-дейтеропорфирина-IX («димерина») для фотодинамической терапии неонкологических заболеваний // *Биомедицинская химия*. 2014. Т. 60. № 3. С. 338–347.
41. Генина Э.А. Методы биофотоники: фототерапия. Саратов: Новый ветер, 2012. 119 с.
42. Magde D., Rojas G.E., and Seybold P.G. Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes // *Photochemistry and Photobiology*. 1999. V. 70. P. 737–744.
43. Gaigalas A., Wang L. Measurement of the fluorescence quantum yield using a spectrometer with an integrating sphere detector // *J. Research National Institute of Standards and Technology*. 2008. V. 113. P. 17–28.
44. Эмануэль Н.М., Кузьмин М.Г. Экспериментальные методы химической кинетики: учебн. пособие. М.: изд. МГУ, 1985. С. 384.
45. Дадеко А.В., Муравьева Т.Д., Стародубцев А.М., Горелов С.И., Добрун М.В., Крисько Т.К., Багров И.В., Белоусова И.М., Пономарев Г.В. Фотофизические свойства фотосенсибилизаторов порфириновой природы // *Опт. спектр.* 2015. Т. 119. № 4. С. 617–622.
46. Zarubaev V.V., Kris'ko T.C., Kriukova E.V., Muraviova T.D. Effect of albumin on the fluorescence quantum yield of porphyrin- based agents for fluorescent diagnostics // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017. V. 20. P. 137–143.
47. Багров И.В., Белоусова И.М., Дадеко А.В., Крисько Т.К., Крюкова Е.В., Мартыненко И.В. и Савченко М.Р. Оптические и фотофизические свойства фотосенсибилизатора хлориновой природы Фотолон в водных растворах разной кислотности // *Опт. спектр.* 2017. Т. 123. № 3. С. 364–371.
48. Kriukova E.V., Belousova I.M., Dadeko A.V., Kris'ko T.K., Martynenko I.V., Savchenko M.R. Porphyrinic photodiagnosis agents: Comparative studies in aqueous, buffer and albumin-containing solutions // *IEEE: 2017 Progress in Electromagnetics. Research Symposium. Spring (PIERS)*. 2017. P. 3412–3417.
49. Ponomarev G.V., Tavrovsky L.D., Zaretsky A.M., Ashmarov V.V., Baum R.Ph. Photosensitizer and the method of its preparation // *Патент России № 2276976*. 2004.
50. Reshetnikov A.V., Ponomarev G.V., Abakumova O.Yu., Tsvetkova T.A., Karmenyan A.V., Rebeko A.G., Baum R.Ph. Novel drug form of chlorine E6 // *Proc. SPIE*. 2000. V. 3909 P. 124–130.
51. Дадеко А.В. Влияние альбумина на фотофизические свойства фотосенсибилизатора димерина // *Опт. спектр.* 2016. Т. 121. № 6. С. 45–48.
52. Gyulkhandanyan G.V., Gyulkhandanyan A.G., Gyulkhandanyan L.Zh., Ghazaryan R.K., Amelyan G.V., Gevorgyan E.S., Kevorkian G.A., Sakanyan V.A. Binding of some cationic porphyrins with serum albumin // *Biolog. J. Armenia*. 2010. V. 1. № 62. P. 15–22.
53. Ibrahim H., Kasselouri A., You C., Maillard P., Rosilio V., Pansu R., Prognon P. Meso-tetraphenyl porphyrin derivatives: The effect of structural modifications on binding to DMPC liposomes and albumin // *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2011. V. 217. P. 10–21.
54. Mishra P.P., Patel S., Datta A. Effect of increased hydrophobicity on the binding of two model amphiphilic chlorin drugs for photodynamic therapy with blood plasma and its components // *J. Phys. Chem. B*. 2006. V. 110. P. 21238–21244.
55. Golovina G.V., Rychkov G.N., Ol'shevskaya V.A., Zaitsev A.V., Kalinin V.N., Kuzmin V.A., Shtil A.A. Differential binding preference of methylpheophorbide a and its diboronated derivatives to albumin and low density lipoproteins // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2013. V. 13. № 4. P. 639–646.
56. Karapetyan N.H., Madakyan V.N. The interaction of new pyridylporphyrins with bovine serum albumin // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2004. V. 30. № 2. P. 191–196.
57. Багров И.В., Белоусова И.М., Горелов С.И., Добрун М.В., Киселев В.М., Кисляков И.М., Крисько А.В., Крисько Т.К. Сравнительные исследования процессов генерации синглетного кислорода при облучении водных растворов препаратов на основе хлорина е6 и копропорфирина III // *Опт. спектр.* 2017. Т. 122. № 2. С. 179–184.
58. Privalov V.A., Lappa A.V., Kochneva E.V. Five years' experience of photodynamic therapy with new chlorin photosensitizer // *Proc. SPIE*. 2005. V. 5863. P. 186–198.
59. Privalov V.A., Lappa A.V., Seliverstov O.V., Faizrahmanov A.B., Yarovoy N.N., Kochneva E.V., Evnevich M.V., Anikina A.S., Reshetnicov A.V., Zalevsky I.D., Kemov Y.V. Clinical trials of a new chlorin photosensitizer for photodynamic therapy of malignant tumors // *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XI: Proc. SPIE*. Ed. by Dougherty T.J. 2002. V. 4612. P. 178–190.
60. Решетников А.В., Иванов А.В., Абакумова О.Ю., Градюшко А.Т., Залевский И.Д., Карменян А.В., Лантнев В.П., Неугодова Н.П. Оценка биологических свойств новых фотосенсибилизаторов хлоринового ряда // *Использование лазеров для диагностики и лечения заболеваний. Научно-информационный сборник (приложение к бюллетеню «Лазер-информ»)*. 2001. № 3. С. 34–40.

61. Пархоц М.В., Галиевский В.А., Сташевский А.С., Трухачева Т.В., Джагаров Б.М. Динамика и эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода хлорином е6: влияние pH раствора и поливинилпирролидона // *Опт. спектр.* 2009. Т. 107. № 6. С. 1026–1032.
62. Красновский А.А., мл. Синглетный молекулярный кислород и первичные механизмы фотодинамического действия оптического излучения // *Итоги науки и техники. Современные проблемы лазерной физики.* М.: ВИНТИ, 1990. Т. 3. С. 63–135.
63. Aksenova N.A., Oles T., Sarna T., Glagolev N.N., Chernjak A.V., Volkov V.I., Kotova S.L., Melik-Nubarov N.S., Solovieva A.B. Development of novel formulations for photodynamic therapy on the basis of amphiphilic polymers and porphyrin photosensitizers. Porphyrin-polymer complexes in model photosensitized processes // *Laser Physics.* 2012. V. 22. № 10. P. 1642–1649.
64. Дадеко А.В., Муравьева Т.Д., Стародубцев А.М., Белоусова И.М. Изучение фотофизических свойств водорастворимого фотосенсибилизатора порфириновой природы – димегина // *Оптический журнал.* 2016. Т. 83. № 3. С. 71–75.
65. Жиеннтаев Т.М., Мелик-Нубаров Н.С., Литманович Е.А., Аксенова Н.А., Глаголев Н.Н., Соловьева А.Б. Влияние плуроников на фотокаталитическую активность водорастворимых порфиринов // *Высокомолекулярные соединения. Сер. А.* 2009. Т. 51. № 5. С. 757–767.
66. Горюх Ю.А., Аксенова Н.А., Соловьева А.Б., Ольшевская В.А., Зайцев А.В., Лагутина М.А., Лузгина В.Н., Миронов А.Ф., Калинин В.Н. Влияние амфифильных полимеров на фотокаталитическую активность водорастворимых порфириновых фотосенсибилизаторов // *ЖФХ.* 2011. Т. 85. № 5. С. 959–963.
67. Соловьева А.Б., Мелик-Нубаров Н.С., Аксенова Н.А., Глаголев Н.Н., Встовский Г.В., Бугрин В.С., Лузгина В.Н., Ольшевская В.А., Белкова Г.В. Солюбилизованные плурониками порфириновые фотосенсибилизаторы окисления триптофана // *ЖФХ.* 2006. Т. 80. № 1. С. 137–143.
68. Gyulkhandanyan A.G., Parkhats M.V., Knyukshto V.N., Lepeshkevich S.V., Dzhangarov B.M., Zakoyan A.A., Gyulkhandanyan A.G., Sheyranyan M.A., Kevorkian G.A., Gyulkhandanyan G.V. Binding of cationic porphyrins and metalloporphyrins to the human transferrin for photodynamic therapy of tumors // *Proc. SPIE.* 2018. V. 10685. P. 1068504-1–1068513.
69. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin // *Pharmacol. Rev.* 1981. V. 33. № 1. P. 17–53.
70. Wardell M., Wang Z., Ho J.X., Robert J., Ruker F., Ruble J., Carter D.C. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 291. № 4. P. 813–819.
71. Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьёв К.Н. Спектроскопия порфиринов // *УФН.* 1963. Т. 79. № 2. С. 173–234.
72. Polo C.F., Frisardi A.L., Resnik E.R., Schoua A.E.M., Batlle A.M.C. Factors influencing fluorescence spectra of free porphyrins // *Clin. Chem.* 1988. V. 34. № 4. P. 757–780.
73. Булгакова Н.Н., Ягудаев Д.М., Сорокатый А.Е., Гейниц А.В., Маркова М.В. Изучение накопления фотосенсибилизатора фотодитазин в гиперплазированной ткани предстательной железы человека // *Физическая медицина.* 2005. Т. 15. С. 15–21.
74. Zhang Y., Gorner H. Photoprocesses of chlorin e6 bound to lysozyme or bovine serum albumin // *Dyes Pigm.* 2009. V. 83. P. 174–179.
75. Isakau H.A., Parkhats M.V., Knyukshto V.N., Dzhangarov B.M., Petrov E.P., Petrov P.T. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer-polymer interaction *in vitro* // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2008. V. 92. № 3. P. 165–174.
76. Hirakawa K., Umemoto H., Kikuchi R., Yamaguchi H., Nishimura Y., Arai T., Okazaki S., Segawa H. Determination of singlet oxygen and electron transfer mediated mechanisms of photosensitized protein damage by phosphorus (V) porphyrins // *Chem. Res. Toxicol.* 2015. V. 28. P. 262–267.