

УДК 502.7+575

Н. С. БАБАЯН

### ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ЗАВИСИМОСТИ СТРУКТУРА/АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПОРФИРИНОВ КАК РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

В данной работе изучена зависимость радиосенсибилизирующих свойств порфиринов от их структуры. Цитотоксичность водорастворимых катионных порфиринов, зависящая от типа центрального атома металла, распределяется согласно следующему ряду:  $ZnTOEt4PyP > MnTOEt4PyP > AgTOEt4PyP > FeTOEt4PyP > H_2TOEt4PyP > CoTOEt4PyP > CuTOEt4PyP$ . Из них только  $AgTOEt4PyP$  и  $CuTOEt4PyP$  имеют выраженную радиосенсибилизирующую активность (фактор изменения дозы – 1,9). Выявлено, что целенаправленная модификация структуры порфиринов является способом повышения их радиосенсибилизирующей активности и, следовательно, улучшения их фармакологических свойств как потенциальных радиосенсибилизаторов для применения в радиотерапии.

**Введение.** Радиотерапия основана на использовании высоких доз ионизирующего излучения, которое поражает раковые клетки и препятствует их распространению в организме. Как известно, этот эффект охватывает также нормальные клетки, что приводит к негативным побочным явлениям. Для снижения последних используют химические соединения (радиосенсибилизаторы, радиопротекторы, хемотерапевтические агенты), которые избирательно усиливают поражающее действие радиации на опухолевые клетки и таким путем способствуют снижению радиационной нагрузки на нормальные ткани [1].

Ранее был выявлен радиосенсибилизирующий эффект порфиринов [2, 3], которые, как известно, способны селективно накапливаться в опухолевых клетках и сохраняться в них долгое время [4, 5]. Было показано также, что радиосенсибилизирующая активность порфиринов может меняться в зависимости от типа центрального атома металла в порфириновом кольце [6, 7]. Цель настоящей работы заключалась в исследовании зависимости фотосенсибилизирующей активности от структуры новых водорастворимых катионных пиридил-порфиринов и их металлокомплексов с целью улучшения радиомодифицирующих свойств. Для этого были исследованы цитотоксичность и радиосенсибилизирующая активность порфиринов *in vitro* по отношению к опухолевым клеткам молочной железы человека.

**Материалы и методы.** Исследовали следующие катионные водорастворимые порфирины, впервые синтезированные на кафедре общей и органической химии ЕГМУ: тетрахлорид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфин ( $H_2TOEtPyP$ ), тетранитрат 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато  $Ag(II)$  ( $AgTOEtPyP$ ), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато  $Zn(II)$  ( $ZnTOEtPyP$ ), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато  $Co(II)$  ( $CoTOEtPyP$ ), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато  $Mn(II)$  ( $MnTOEtPyP$ ), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато  $Fe(III)Cl$  ( $FeTOEtPyP$ ), тетрабромид 5, 10, 15, 20-тетра[4-N-(2'-оксиэтилпиридил)]порфинато  $Cu(II)$  ( $CuTOEtPyP$ ).

Использовалась клеточная линия молочной железы человека Cal-51. Клетки культивировали в культуральных пластиковых флаконах объемом  $75\text{ см}^2$  ("SPL Life Sciences", Корея) в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина ("Sigma-Aldrich" и "Biochrom AG", Германия). Клетки инкубировали в атмосфере 5%-го  $CO_2$  при  $37^{\circ}C$ .

*Определение цитотоксичности порфиринов.* Клетки высевали в 15 мл флаконы по 2 мл на флакон с плотностью  $5 \cdot 10^5$  кл./мл. После 24 ч инкубации добавляли порфирины в разных концентрациях и инкубировали еще 24 ч. Число живых клеток определяли с помощью метода исключения витального красителя трипанового синего (Trypan Blue, "Sigma-Aldrich") [8]. Жизнеспособность клеток выражали в процентах от контрольных значений. Для каждого порфирина определяли значение  $IC_{50}$  (концентрация вещества, подавляющая рост клеток на 50%).

*Определение радиосенсибилизирующей активности порфиринов.* Клетки высевали как указано выше. После 24 ч инкубации добавляли порфирины в концентрации  $IC_{50}/5$ , инкубировали 1 ч и облучали  $\gamma$ -лучами  $^{60}Co$  ("Rokus-M", Россия) в дозах от 1 до 4 Гр. После 48 ч инкубации определяли выживаемость клеток методом исключения витального красителя.

*Определение фактора изменения дозы.* Фактор изменения дозы (ФИД), равный отношению равноэффективных доз в опыте и контроле, определяли методом формирования колоний [9]. Клетки высевали во флаконы объемом  $25\text{ см}^2$  со следующими плотностями:  $10^3$  клеток на флакон (контроль),  $2 \cdot 10^3$  (для облучения в дозе 1 Гр),  $4 \cdot 10^3$  (2 Гр) и  $10 \cdot 10^3$  (4 Гр). Выбор плотности культур был основан на предварительных расчетах оптимальной концентрации клеток для каждой дозы облучения. После 12 ч инкубации добавляли порфирин в концентрации  $IC_{50}/5$  и инкубировали 1 ч. Клетки облучали  $\gamma$ -лучами  $^{60}Co$  и инкубировали 13 дней. Затем клетки фиксировали в смеси этанол–уксусная кислота (3:1) и окрашивали красителем Гимза. Подсчитывали число колоний, состоящих из 50 и более клеток. ФИД определяли как отношение доз облучения без порфирина и с порфирином для 30%-го уровня выживаемости клеток.

*Статистическая обработка данных.* Использовали по четыре клеточные культуры на каждый вариант опыта. Для статистической обработки результатов использовали  $t$ -тест Стьюдента.

### Результаты и обсуждение.

**Цитотоксичность порфиринов.** Было обнаружено, что цитотоксическая активность порфиринов зависит от типа центрального атома металла и распределяется согласно следующему ряду:  $ZnTOEt4PyP(IC_{50}=10\pm3,5) > MnTOEt4PyP(IC_{50}=30\pm1,4) > AgTOEt4PyP(IC_{50}=50\pm1,4) > FeTOEt4PyP(IC_{50}=50\pm1,4) > H_2TOEt4PyP(IC_{50}=60\pm3,5) > CoTOEt4PyP(IC_{50}=100\pm3,5) > CuTOEt4PyP(IC_{50}=120\pm2)$  (рис. 1). Согласно результатам экстраполяции значений  $IC_{50}$  в  $LD_{50}$  (доза вещества, вызывающая гибель половины популяции *in vivo*) на основе Международной системы классификации токсических веществ [10, 11], все порфирины относятся к группе умеренно опасных соединений (III группа).

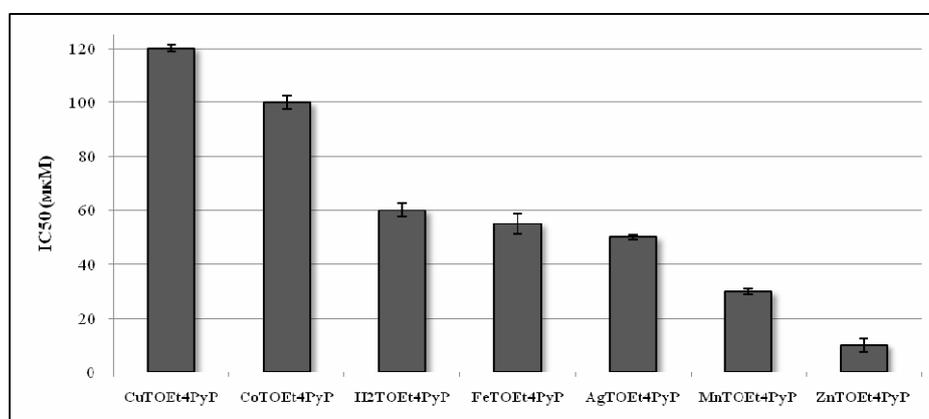


Рис. 1. Цитотоксичность исследованных порфиринов.

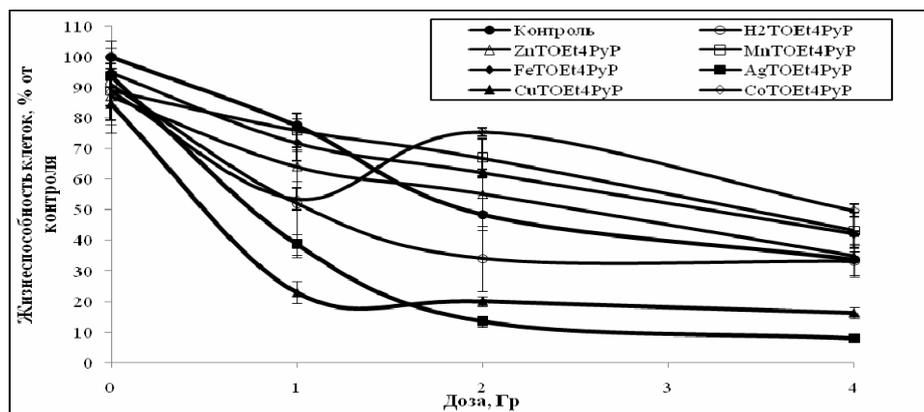


Рис. 2. Радиосенсибилизирующее действие исследованных порфиринов.

*Исследование радиомодифицирующих свойств порфиринов* показало (рис. 2), что при равных дозах облучения жизнеспособность клеток по сравнению с контрольной группой (облученные культуры без порфирина) достоверно понижалась в культурах, обработанных порфиринами AgTOEt4PyP и CuTOEt4PyP. Таким образом, только эти два порфирина из всех синтезиро-

ванных обладают радиосенсибилизирующей активностью: ФИД при уровне 30% выживаемости клеток для наиболее активного порфирина AgTOEt4PyP был равен 1,9 (рис. 3), т.е. при субтоксической концентрации почти в 2 раза увеличивается чувствительность опухолевых клеток к облучению.

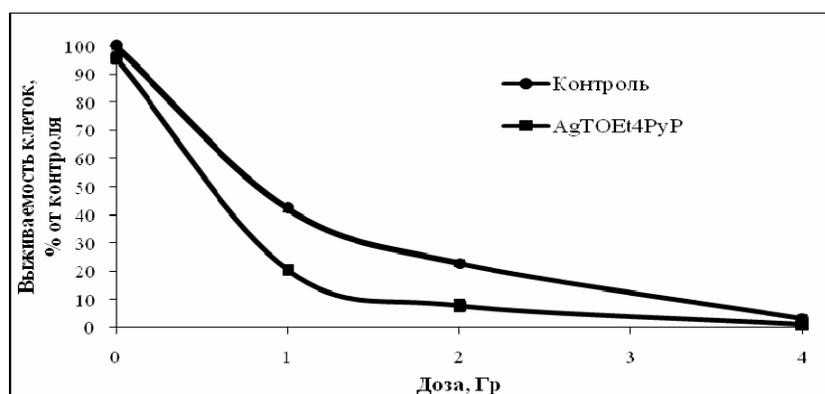


Рис. 3. Радиомодифицирующий эффект порфирина AgTOEt4PyP.

Таким образом, изменение структурных характеристик порфиринов является эффективным путем повышения их биологической активности и фармакологических свойств.

Работа была частично выполнена в лаборатории радиобиологии ОИЯИ (Дубна, Россия). Автор приносит искреннюю благодарность Е.А. Красавину, Н.Л. Шамаковой, А.Г. Товмасыану, Г.Г. Гаспаряну и Р.М. Арутюняну за содействие в работе.

Кафедра генетики и цитологии

Поступила 21.01.2011

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Wasserman T.H., Chapman J.D., Coleman C.N., Kligerman M.M.** Chemicals as Modifiers of Radiation. Philadelphia: Lipincot Raven Publisher, 1997, p. 685–704.
2. **O'Hara J., Douple E.B., Abrams M.J., Picker D.J., Giandomenico M., Vollano J.** Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1993, v. 16, p. 1049–1052.
3. **Picard N., Ali H., Lier J.E., Klarskov K., Paquette B.** Photochem. Photobiol. Sci., 2009, v. 8, p. 224–232.
4. **Luksiene Z.** Medicina (Kaunas), 2004, v. 40, p. 868–874.
5. **Luksiene Z., Juzenas P., Moan J.** Cancer Letters, 2006, v. 235, p. 40–47.
6. **Mukherjee S., Abraham J., Brewster A., Hardwick R., Havard T., Lewis W., Askill C., Manson J., Williamst G.T., Roberts S.A., Court J., Crosby T.** Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol), 2006, v. 99, p. 2379–2450.
7. **Strober W.** Current Protocols in Immunology. USA: John Wiley & Sons, 1997, v. 21, A.3B.1–A.3B.2.
8. **Kulka U., Schaffer M., Siefert A., Schaffer P.M., Olsner A., Kasseb K., Hofstetter A., Duhmke E., Joric G.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 2003, v. 311, p. 98–103.
9. **Wind M.** Current ICCVAM Recommendations for the Use of *in vitro* Test Methods to Estimate Acute Systemic Toxicity. USA, Maryland, 2008, Feb. 7.
10. A Guide to the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). 2008, <http://www.osha.gov/dsg/hazcom/ghsguideoct05.pdf>

Ն. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ

ՆՈՐ ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ (ՈՐՊԵՍ  
ՃԱՌԱԳԱՅԹԱԶԳԱՅՈՒՆԱՐԱՐՆԵՐԻ) ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻՑ ԿԱԽՎԱԾ  
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ *IN VITRO* ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ամփոփում

Աշխատանքում ուսումնասիրել է պորֆիրինների ակտիվության կախվածությունը կառուցվածքից նրանց ճառագայթազգայունացնող ազդեցությունը մեծացնելու նպատակով: Յույց է տրվել, որ ջրալուծ կատիոնային պորֆիրինների ցիտոտոքսիկ ազդեցությունը կախված է կենտրոնական մետաղի ատոմից և բաշխվում է հետևյալ կերպ.  $ZnTOEt4PyP > MnTOEt4PyP > AgTOEt4PyP > FeTOEt4PyP > H_2TOEt4PyP > CoTOEt4PyP > CuTOEt4PyP$ : Միայն  $AgTOEt4PyP$  և  $CuTOEt4PyP$  պորֆիրինները ցուցաբերել են ճառագայթազգայունացնող ակտիվություն և դոզայի փոփոխության գործակիցը կազմել է 1,9: Այսպիսով, ցույց է տրվել, որ պորֆիրինների ճառագայթազգայունացնող ակտիվությունը կախված է կառուցվածքից, որի ուղղորդված փոփոխությունը կարող է բարելավել նրանց հակաքաղցկեղային ակտիվությունը և դեղաբանական հատկությունները:

N. S. BABAYAN

*IN VITRO* STUDY OF STRUCTURE/ACTIVITY DEPENDENCE OF NEW  
PORPHYRINES AS RADIOSENSITIZERS

Summary

The aim of this work has been the investigation of structure/activity dependence of new porphyrines to improve their radiosensitizing effects. In this work it was shown that the cytotoxicity of water-soluble porphyrines depends on the type of central metal atom and ranges in the following order:  $ZnTOEt4PyP > MnTOEt4PyP > AgTOEt4PyP > FeTOEt4PyP > H_2TOEt4PyP > CoTOEt4PyP > CuTOEt4PyP$ . Only  $AgTOEt4PyP$  and  $CuTOEt4PyP$  porphyrines demonstrated the radiosensitizing activity (DMF=1,9). Thus, the radiosensitizing activity of porphyrines depends on the structure, and structure modifications can be a way to improve their anticancer activity and pharmacological features.