

НОВЫЕ ЦИАНОАРИЛПОРФИРАЗИНЫ С ВЫСОКОЙ ВЯЗКОСТНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

© 2020 г. С. А. Лермонтова^a, Т. С. Любова^a, Е. Ю. Ладилина^a, В. И. Плеханов^b,
И. В. Балалаева^c, В. П. Боярский^d, Л. Г. Клапшина^{a,b,*}

^a Институт металлоорганической химии имени Г. А. Разуваева Российской академии наук,
ул. Троицкая 49, Нижний Новгород, 603137 Россия

^b Институт прикладной физики Российской академии наук, Нижний Новгород, 603950 Россия

^c Нижегородский государственный университет имени Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950 Россия

^d Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: klarisa@iomc.ras.ru

Поступило в Редакцию 24 июня 2019 г.

После доработки 24 июня 2019 г.

Принято к печати 27 июня 2019 г.

Ряд цианоарилпорфиразиновых пигментов проанализирован с точки зрения зависимости их фотофизических свойств и фотодинамической активности от природы заместителей в арильных группах, обрамляющих макроцикл, и их положения в ароматическом кольце. Показано, что замена атома фтора в *пара*-положении на метоксигруппу приводит к существенному увеличению соотношения величин темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности, т. е. потенциального терапевтического индекса порфиразина.

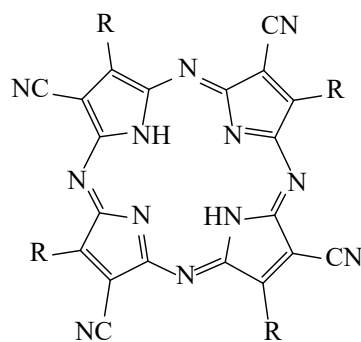
Ключевые слова: цианоарилпорфиразины, фотосенсибилизаторы, фотоиндуцированная и темновая цитотоксичность, флуоресцентные молекулярные ротаторы, оптические зонды внутриклеточной вязкости

DOI: 10.31857/S0044460X20020146

Фотодинамическая терапия рака является широко распространенным методом лечения онкологических заболеваний, основанным на использовании в качестве главного терапевтического компонента фотосенсибилизатора, избирательно накапливающегося внутри опухоли и активируемого видимым или инфракрасным светом с подходящей длиной волны [1–6]. Такая активация приводит к превращению возбужденного синглетного состояния фотосенсибилизатора в триплетное. Известно, что в триплетном состоянии некоторые пигменты способны генерировать активные формы кислорода: радикалы и/или синглетный кислород, обладающий малым временем жизни, но чрезвычайно

высокой цитотоксичностью [7, 8]. Таким образом, три нетоксичных компонента терапии (фотосенсибилизатор, кислород и свет) способны эффективно инициировать гибель раковых клеток в опухоли и/или разрушать ее кровеносную систему. Большая часть известных в настоящее время фотосенсибилизаторов принадлежит к семейству флуоресцентных тетрапиррольных пигментов, полученных, главным образом, на основе производных порфиринов и фталоцианинов [9, 10]. Недавно перспективность использования в качестве агентов фотодинамической терапии рака продемонстрирована и для порфиразинов [11–13]. В последние несколько лет в Институте металлоорганической химии РАН

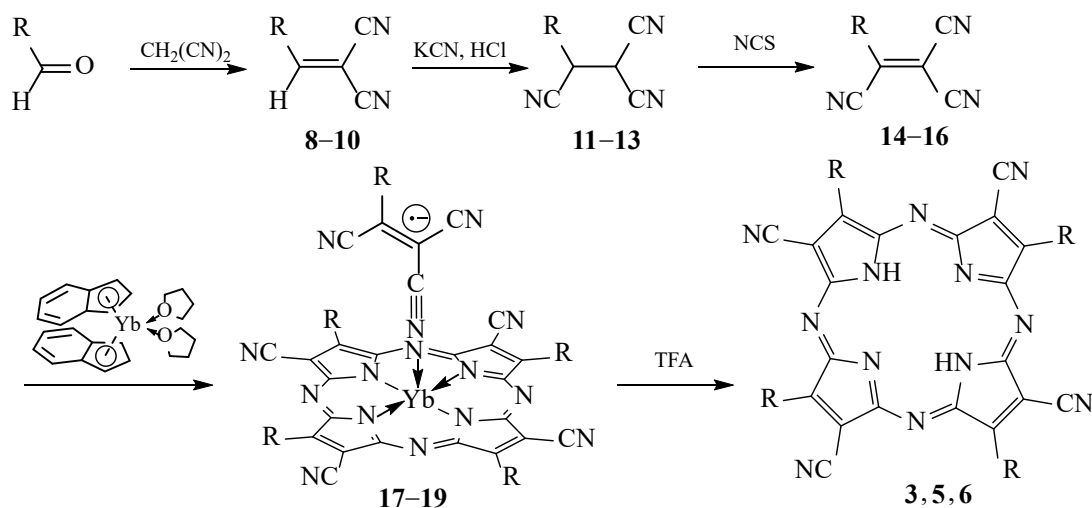
Схема 1.



1-7

R = Ph (1), 4-FC₆H₄ (2), 4-MeOC₆H₄ (3), 2-MeC₆H₄ (4),
2-MeOC₆H₄ (5), 3-MeO-4-EtOC₆H₃ (6), C₆F₅ (7).

Схема 2.



R = 4-MeOC₆H₄ (3, 8, 11, 14, 17), 2-MeOC₆H₄ (5, 9, 12, 15, 18), 4-MeOC₆H₄ (6, 10, 13, 16, 19).

им. Г.А. Разуваева проводятся исследования фотофизических и цитотоксических свойств новой группы тетрапирролов – цианоарилпорфиразиновых пигментов, демонстрирующих уникальный потенциал для разнообразных биомедицинских приложений (фотодинамическая терапия, бимодальная флуоресцентная/магнитно-резонансная диагностика, а также зондирование внутриклеточной вязкости) [14–20].

Как и другие тетрапиррольные фотосенсибилизаторы, эти соединения являются не только терапевтическими, но и диагностическими агентами, поскольку, селективно накапливаясь в опухоли, они способны ее визуализировать за счет флуоресценции. При этом использование одного фотосен-

сибилизатора без света или только света без фотосенсибилизатора не дает цитотоксического эффекта. Следует отметить, что использование активных форм кислорода в фотодинамической терапии рака имеет существенное преимущество по сравнению с другими видами лечения онкологии, поскольку подвергаются фотоиндуцированной атаке только клетки раковой опухоли, и, следовательно, в отсутствие облучения и при низкой собственной (темновой) цитотоксичности фотосенсибилизатора здоровые ткани практически не подвергаются повреждению. Это также означает важность соотношения величин темновой и фотоиндуцированной цитотоксичностей, поскольку оно является важным показателем безопасности использования

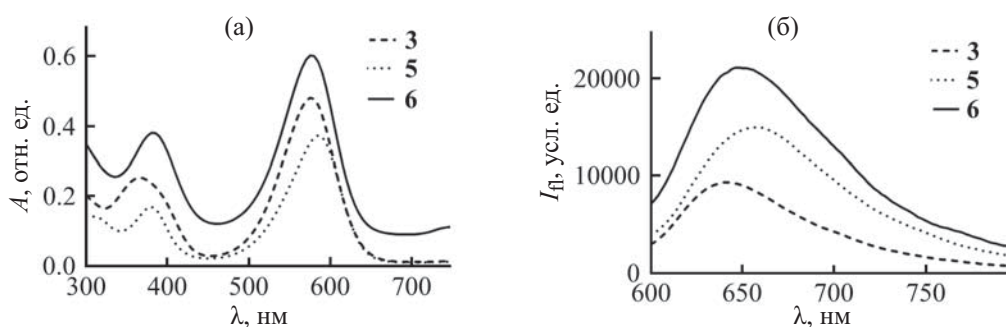


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и эмиссии (б) ($\lambda_{\text{ex}} = 580$ нм) в воде для порфиразинов 3, 5 и 6.

данного фотосенсибилизатора для здоровых тканей организма.

В настоящей работе мы представляем результаты исследования фотофизических и цитотоксических свойств некоторых новых цианоарилпорфиразиновых пигментов, а также синтезированных нами ранее [14, 17, 20], демонстрирующие сильное влияние как природы, так и положения различных заместителей в фенильном кольце на величину и соотношение фотоиндуцированной и темновой цитотоксичности.

На схеме 1 приведены структуры новых и ранее описанных [14, 18, 20] цианоарилпорфиразинов 1–7, исследованных в данной работе с точки зрения влияния ароматического обрамления макроцикла на фотодинамическую активность соединений. Синтез новых порфиразинов 3, 5 и 6 осуществляли согласно схеме 2.

На рис. 1 приведены спектры поглощения и эмиссии для впервые полученных порфиразинов

3, 5, 6. Все новые порфиразины имеют спектры поглощения, типичные для тетрапиррольных макроциклов.

В табл. 1 приведены фотофизические свойства, важные для оценки потенциального применения в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии рака, для всего ряда представленных в данной работе порфиразинов. Интересно, что в большинстве рассмотренных случаев наличие заместителей в фенильном кольце не оказывает существенного влияния на положение Q-полосы. Это говорит о том, что введенные заместители не вносят существенного вклада в систему π -сопряжения макроцикла. Исключение составляют пентафторфенильные заместители в соединении 7, которые обеспечивают существенный сдвиг Q-полосы этого порфиразина в красную область спектра, природа которого пока остается неясной.

Характерной особенностью всего ряда рассматриваемых порфиразинов является сильная

Таблица 1. Максимумы поглощения (Q-полоса) и флуоресценции в красной области, квантовый выход флуоресценции, молярный коэффициент экстинкции ($\lg \epsilon$) порфиразинов 1–7 в воде^a

№	Q-полоса, нм	$\lg \epsilon$	λ_{em} , нм	Φ , % ^б	$\alpha^в$	Ссылка
1	579	4.23	650	0.3	0.5	[10]
2	579	4.42	650	0.3	0.6	[4, 7, 10]
3	576	4.63	645	0.7	0.5	
4	585	4.53	650	0.4	0.3	[4, 10]
5	586	4.62	655	0.6	0.5	
6	576	4.68	650	0.5	0.6	
7	606	4.52	695	0.1	0.4	[10]

^a $c = 5$ мкмол/л. ^б Квантовый выход рассчитан относительно крезоло фиолетового, $\lambda_{\text{возб}} = 580$ нм. ^в Значение параметра α в уравнениях Ферстера–Хоффмана.

чувствительность фотофизических параметров к локальной вязкости. Это связано с возможностью безызлучательной релаксации возбужденного состояния молекулы цианоарилпорфиразина (темновое состояние), когда вследствие возбуждения порфиразина светом и переноса заряда с π -донорных арильных групп на электроно-акцепторные CN-группы имеет место диссипация энергии возбуждения за счет внутримолекулярного вращения мобильных сегментов молекулы красителя [18, 21–23]. Чем выше вязкость среды, тем более затруднено такое внутримолекулярное вращение, выше квантовый выход флуоресценции и время ее затухания. Зависимость этих фотофизических параметров от вязкости для таких флуорофоров, определяемых в литературе термином «флуоресцентные молекулярные ротаторы», описывается известными уравнениями Ферстера–Хоффмана (1).

$$\lg \Phi = z + \alpha \lg \eta, \quad (1)$$

где Φ – квантовый выход, z и α – константы, η – вязкость.

Аналогичное уравнение существует и для другого параметра флуоресценции – времени жизни [24].

$$\lg \tau = \lg(z/k_r) + \alpha \lg \eta, \quad (2)$$

где τ – время жизни возбужденного состояния, η – вязкость, z и α – константы, k_r – константа скорости излучательного перехода.

Для порфиразинов константы скорости излучательных и безызлучательных переходов рассчитывали из значений параметров флуоресценции (квантового выхода Φ_f и времени жизни τ_{av}), уравнение 3) [23].

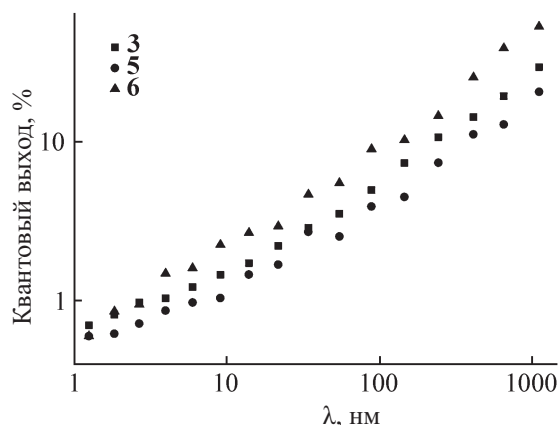


Рис. 2. Зависимость квантового выхода и времени жизни флуоресценции порфиразинов 3, 5 и 6 от вязкости среды (модельные этанольно-глицериновые смеси).

$$\Phi_f = \frac{k}{k_r + k_{nt}} = k_r \tau_{av}. \quad (3)$$

Все впервые полученные в данной работе цианоарилпорфиразины (3, 5, 6), так же как и ранее полученные соединения 1, 2, 4 и 7 [14, 20], являются типичными флуоресцентными молекулярными ротаторами, что подтверждается хорошим соответствием уравнениям Ферстера–Хоффмана зависимостей интенсивности флуоресценции и ее времени жизни от вязкости среды (рис. 2).

Представленные на рис. 3 зависимости констант скорости излучательных и безызлучательных переходов от вязкости среды являются убедительным доказательством принадлежности новых порфиразиновых пигментов к ряду флуоресцентных молекулярных ротаторов. Как видно из рисунка, константа скорости безызлучательного перехода резко снижается при увеличении вязкости, тогда

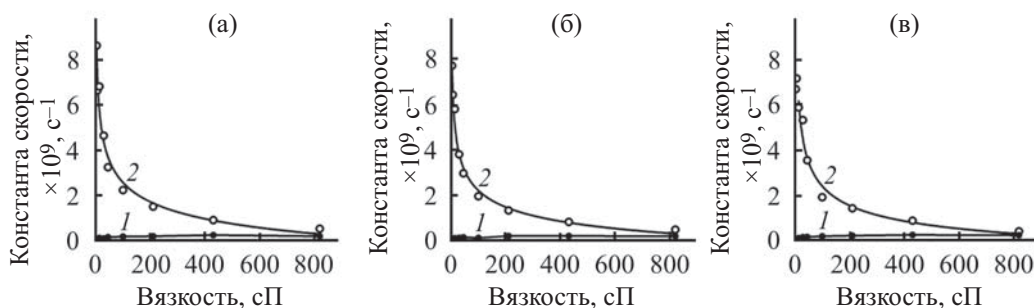


Рис. 3. Зависимость констант скорости излучательного (1) и безызлучательного (2) переходов от вязкости этанольно-глицериновой смеси при 25°C для порфиразинов 3 (а), 5 (б) и 6 (в).

Таблица 2. Значения IC_{50} в условиях облучения светом ($\lambda = 615\text{--}635$ нм) и темновой цитотоксичности цианоарилпорфиразинов с различными арильными группами в обрамлении макроцикла

№	$IC_{50}(\text{light})$, моль/л	$IC_{50}(\text{dark})$, моль/л	$IC_{50}(\text{dark})/IC_{50}(\text{light})$
1	3.7×10^{-6}	1.1×10^{-5}	3.0
2	8.0×10^7	6.9×10^{-6}	8.6
3	1.3×10^6	2.1×10^5	16.1
4	3×10^6	1.4×10^5	4.7
5	2.4×10^6	1.1×10^5	4.6
6	2.4×10^6	1.2×10^5	5.0
7	9×10^7	3.6×10^6	4.0

как на константу скорости излучательного перехода вязкость практически не влияет.

Описанные выше фотофизические особенности цианоарилпорфиразиновых фотосенсибилизаторов открывают возможность использования их в качестве зондов локальной вязкости, в том числе и внутриклеточной. Вязкость является важным параметром, определяющим функциональный статус клетки и ее жизнеспособность. Именно внутриклеточная вязкость определяет скорость диффузии различных молекул, а, следовательно, и скорость внутриклеточных бимолекулярных реакций, связанных с ее питанием, энергетическим обменом, а также разнообразными сигнальными процессами, отвечающими за ее жизнеспособность.

Для оценки новых цианоарилпорфиразинов как потенциальных фотосенсибилизаторов нами проведено измерение их темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431. Известно, что широко распространенным экспериментальным методом такой оценки является метод МТТ-тестирования [25], т. е. измерение концентрации препарата, вызывающей снижение роста клеток (или их гибель) на 50% (IC_{50}). Эта величина измерялась как в темновых условиях, так в условиях облучения светом. Полученные величины IC_{50} приведены в табл. 2. Приведенные данные демонстрируют заметную фотодинамическую активность всего ряда рассмотренных соединений. Самую высокую фотоиндуцированную цитотоксичность показывают цианоарилпорфиразины с

атомами фтора в арильных группах, обрамляющих макроцикл. Замена атома фтора (**2**) в *para*-положении фенильной группы на группу OMe (**3**) лишь несущественно снижает фотоиндуцированную цитотоксичность IC_{50} , но в то же время значительно (почти в 2 раза) уменьшает цитотоксичность порфиразина в темноте. Это позволяет надеяться на более высокую эффективность соединения **3** в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии рака, поскольку уменьшается собственное токсическое воздействие этого порфиразина на здоровые ткани, не подвергавшиеся облучению. Отношение ингибирующих концентраций в темновых условиях и после облучения $IC_{50}(\text{dark})/IC_{50}(\text{light})$ заметно увеличивается. Другими словами, наблюдается существенный рост потенциального терапевтического индекса соединения **3**. В целом, исходя из полученных данных (табл. 2), можно предположить, что заместители в *meta*- и *ortho*-положениях не приводят к усилению фотодинамической активности. При этом интересно отметить, что при отсутствии заместителей в фенильной группе был получен наиболее слабый результат с точки зрения величины терапевтического индекса.

Таким образом, проведенные исследования позволили выяснить детали тонкой настройки фотофизических и фотодинамических свойств цианоарилпорфиразинов для повышения их потенциала при использовании в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака, а также оптических зондов внутриклеточной вязкости.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК спектры соединений в виде суспензий в вазелиновом масле регистрировали на ИК Фурье-спектрометре ФСМ 1201. Спектры поглощения в УФ и видимой области снимали на спектрометре PerkinElmer Lambda 25. Спектры ЯМР ^1H записывали на приборе Bruker Avance DPX-200 (200 МГц) при 25°C. Исследования флуоресценции в стационарном режиме были проведены на спектрометре PerkinElmer LS 55 в диапазоне длин волн 300–800 нм. Масс-хроматограммы получены на хромато-масс-спектрометре PolarisQ/TraceGCUltra. Динамическую вязкость каждой из бинарных этанол(метанол)глицериновых смесей измеряли с использованием вискозиметра Штабингера (SVM 3000, Anton Paar) с точностью $\pm 0.35\%$. Растворение порфиразинов осуществляли механическим перемешиванием и обработкой раствора ультразвуком в течение не менее 15 мин.

Все операции по синтезу и анализу соединений проводили с использованием абсолютированных растворителей. 2-Метоксибензальдегид, 4-метоксибензальдегид, 3-метокси-4-этоксibenзальдегид, малонодинитрил, *N*-хлорсукцинимид – коммерческие продукты (Sigma Aldrich). Бис(инденил)иттербий был синтезирован по методике [26].

Синтез порфиразинов **1**, **2**, **4** и **7** проводили методами, описанными ранее [14, 17, 20]. Арилтрицианэтилены получали методом трехстадийного синтеза, используя в качестве стартового соединения соответствующие замещенные бензальдегиды [27].

Синтез 2-арил-1,1-дицианоэтиленов 8–10. К раствору 15 ммоль замещенного бензальдегида в 100 мл EtOH добавляли 0.99 г (15 ммоль) малонодинитрила и 2 капли пиперидина. Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, промывали водой (4×80 мл) и сушили при комнатной температуре и пониженном давлении.

2-(4-Метоксифенил)-1,1-дицианоэтилен (8). Выход 75%, желтое твердое вещество. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 2223 ($\text{C}\equiv\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J , Гц): 3.91 с (3H, CH_3O), 7.01 д (2H, CH_{Ar} , $^3J = 8.9$), 7.90 д (2H, CH_{Ar} , $^3J = 8.9$), 7.65 с [1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CN})_2$]. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 184 (100).

2-(2-Метоксифенил)-1,1-дицианоэтилен (9). Выход 78%, светло-желтое твердое вещество.

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 2224 ($\text{C}\equiv\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J , Гц): 3.93 с (3H, CH_3O), 6.99 д (1H, $^3J = 8.5$ Гц), 7.08 т (1H, $^3J = 7.7$ Гц), 7.59 т (1H, $^3J = 7.2$ Гц), 8.18 д (1H, $^3J = 9.1$ Гц), 8.31 с [1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CN})_2$]. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 184 (100).

2-(3-Метокси-4-этоксифенил)-1,1-дицианоэтилен (10). Выход 65%, желтое твердое вещество. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 2220 ($\text{C}\equiv\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J , Гц): 1.52 т (3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $^3J = 7.0$), 3.93 с (3H, CH_3O), 4.21 к (2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $^3J = 7.0$), 6.94 д (1H, CH_{Ar} , $^3J = 8.4$), 7.39 д (1H, CH_{Ar} , $^3J = 7.4$), 7.63 с (1H, CH_{Ar}), 7.68 с [1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CN})_2$]. Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 228 (100).

Синтез 2-арил-1,1,2-трицианоэтанов 11–13. Соответствующий 2-арил-1,1-дицианоэтилен (10 ммоль) растворяли в 150 мл EtOH, добавляли 1.30 г (20 ммоль) KCN, предварительно растворенного в 80 мл воды, затем в реакционную смесь добавляли 240 мл воды. Полученную смесь перемешивали в течение 45 мин при комнатной температуре. Далее добавляли 6 мл 37%-ной HCl. После этого реакционную смесь охлаждали на ледяной бане. Осадок отфильтровывали, тщательно промывали водой и сушили при комнатной температуре и пониженном давлении.

2-(4-Метоксифенил)-1,1,2-трицианоэтан (11). Выход 76%, белое вещество. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 2250 ($\text{C}\equiv\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J , Гц): 7.42 д (2H, $^3J = 8.7$), 7.01 д (2H, $^3J = 8.7$), 4.42 д [1H, $\text{CH}(\text{CN})-\text{CH}(\text{CN})_2$, $^3J = 5.9$], 4.23 д [1H, $\text{CH}(\text{CN})-\text{CH}(\text{CN})_2$, $^3J = 5.9$], 3.85 с (3H, CH_3O). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 211 (5).

2-(2-Метоксифенил)-1,1,2-трицианоэтан (12). Выход 83%, белое вещество. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 2257 ($\text{C}\equiv\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J , Гц): 3.94 с (3H, CH_3O), 4.45 д [1H, $\text{CH}(\text{CN})-\text{CH}(\text{CN})_2$, $^3J = 5.8$], 4.82 д [1H, $\text{CH}(\text{CN})-\text{CH}(\text{CN})_2$, $^3J = 5.8$], 7.00 д (1H, CH_{Ar} , $^3J = 8.3$), 7.50 т (1H, CH_{Ar} , $^3J = 7.9$), 7.58 д (1H, CH_{Ar} , $^3J = 6.3$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 211 (8).

2-(3-Метокси-4-этоксифенил)-1,1,2-трицианоэтан (13). Выход 88%, белое вещество. ИК спектр, ν , cm^{-1} : 2255 ($\text{C}\equiv\text{N}$). Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д. (J , Гц): 1.49 т (3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $^3J = 7.0$), 3.92 с (3H, CH_3O), 4.21 к (2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $^3J = 7.0$), 4.21 д [1H, $\text{CH}(\text{CN})-\text{CH}(\text{CN})_2$, $^3J = 5.8$], 4.39 д [1H, $\text{CH}(\text{CN})-\text{CH}(\text{CN})_2$, $^3J = 5.8$], 6.91–7.05 м (3H, CH_{Ar}). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 255 (10).

Синтез 1-арил-1,1,2-трицианоэтиленов 14–16. К полученному 2-арил-1,1,2-трицианоэтану (6.4 ммоль), растворенному в 100 мл Et₂O, добавляли 1.20 г (9.0 ммоль) *N*-хлорсукцинимид. Реакционную смесь перемешивали, охлаждая колбу ледяной баней. Через 1 ч добавляли 150 мл воды, отделяли органический слой и промывали его водой (3×150 мл). Растворитель удаляли при пониженном давлении. Продукт возгоняли при пониженном давлении.

2-(4-Метоксифенил)-1,1,2-трицианоэтилен (14). Выход 69%, желтое твердое вещество. ИК спектр, ν , см⁻¹: 2226 (C≡N). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м. д. (*J*, Гц): 3.96 с (3H, CH₃O), 7.08 д (2H, CH_{Ar}, ³*J* = 9.1), 8.10 д (2H, CH_{Ar}, ³*J* = 9.1). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 209 (100).

2-(2-Метоксифенил)-1,1,2-трицианоэтилен (15). Выход 72%, желтое твердое вещество. ИК спектр, ν , см⁻¹: 2240 (C≡N). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м. д. (*J*, Гц): 3.99 с (3H, CH₃O), 7.07 т (1H, ³*J* = 8.3), 7.15 д (1H, CH_{Ar}, ³*J* = 7.6), 7.55 д (1H, CH_{Ar}, ³*J* = 6.6), 7.64 т (1H, CH_{Ar}, ³*J* = 7.1). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 209 (100).

2-(3-Метокси-4-этоксифенил)-1,1,2-трицианоэтилен (16). Выход 95%, оранжевое твердое вещество. ИК спектр, ν , см⁻¹: 2220 (C≡N). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м. д. (*J*, Гц): 1.54 т (3H, CH₃CH₂O, ³*J* = 7.0), 3.95 с (3H, CH₃O), 4.25 к (2H, CH₃CH₂O, ³*J* = 7.0), 7.00 д (1H, CH_{Ar}, ³*J* = 8.3), 7.70–7.75 м (2H, CH_{Ar}). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 253 (50).

Синтез комплексов иттербия 17–19. Раствор 2.3 ммоль соответствующего 2-арил-1,1,2-трицианоэтилена 14–16 в предварительно дегазированном ТГФ (5 мл) в инертной атмосфере небольшими порциями добавляли к раствору 0.25 г (0.46 ммоль) бисинденильного комплекса иттербия(II) в 5 мл ТГФ. Через 1 сут раствор фильтровали в вакууме. Для удаления из смеси не вступившего в реакцию 2-арил-1,1,2-трицианоэтилена и его комплекса с иттербием полученный раствор промывали предварительно дегазированным толуолом до исчезновения окраски. Продукт реакции сушили при пониженном давлении.

Синтез порфиразинов 3, 5, 6. Раствор 0.14 ммоль соответствующего комплекса иттербия 17–19 в 2 мл трифторуксусной кислоты перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин.

Далее добавляли 30 мл воды, образовавшийся осадок центрифугировали и тщательно промывали водой до нейтральной среды. Продукт реакции очищали с помощью колоночной хроматографии (силикагель 60, 40–60 мкм, элюент – ТГФ).

Тетра(4-метоксифенил)тетрацианопорфиразин (3). Выход 30%, черное твердое вещество. ИК спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3406 (N–H), 2840 (O–CH₃), 2201 (C≡N), 1603 (C=N), 1512, 1497 (C_{Ar}–C_{Ar}); 1255, 1217, 1043, 1028 (C_{Ar}–O–C_{Alk}). УФ спектр (H₂O), λ_{\max} , нм: 365 (полоса Core), 576 (Q-полоса). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м. д. (*J*, Гц): 3.87 с (12H, CH₃O), 7.02 д (8H, CH_{Ar}, ³*J* = 8.8), 7.44 д (8H, CH_{Ar}, ³*J* = 8.8), 7.56 с (2H, NH). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 838 [*M*]⁺, 857 [*M* + H₂O]⁺, 808 [*M* – CH₃O]⁺.

Тетра(2-метоксифенил)тетрацианопорфиразин (5). Выход 28%, черное твердое вещество. ИК спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3435 (N–H), 3066 (C_{Ar}–H), 2838 (O–CH₃), 2205 (C≡N), 1598 (C=N); 1504, 1493 (C_{Ar}–C_{Ar}); 1253, 1216, 1043, 1023 (C_{Ar}–O–C_{Alk}). УФ спектр (H₂O), λ_{\max} , нм: 312, 380 (полоса Core), 586 (Q-полоса). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м. д. (*J*, Гц): 3.77 с (12H, CH₃O), 7.05 т (4H, CH_{Ar}, ³*J* = 7.5), 7.15 д (8H, CH_{Ar}, ³*J* = 8.2), 7.52 т (4H, CH_{Ar}, ³*J* = 8.8), 8.47 с (2H, NH). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 838 [*M*]⁺, 824 [*M* – CH₃]⁺, 808 [*M* – CH₃O]⁺.

Тетра(3-метокси-4-этоксифенил)тетрацианопорфиразин (6). Выход 34%, черное твердое вещество. ИК спектр (KBr), ν , см⁻¹: 3403 (N–H), 2853 (O–C_{Alk}), 2201 (C≡N), 1597 (C=N); 1515, 1500 (C_{Ar}–C_{Ar}); 1257, 1217, 1030 (C_{Ar}–O–C_{Alk}). УФ спектр (H₂O), λ_{\max} , нм: 383 (полоса Core), 576 (Q-полоса). Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ , м. д. (*J*, Гц): 1.42 т (12H, CH₃CH₂O, ³*J* = 6.9), 3.76 с (12H, CH₃O), 4.13 к (8H, CH₃CH₂O, ³*J* = 7.0), 6.97–7.09 м (12H, CH_{Ar}), 7.50 с (2H, NH). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 1014 [*M*]⁺.

Измерение фотоиндуцированной IC₅₀(light) и темновой IC₅₀(dark) цитотоксичности. Жизнеспособность клеточной культуры оценивали с помощью МТТ-теста [25]. Измерение оптической плотности проводили на планшетном спектрофотометре Synergy MX (BioTek, США) на длине волны 570 нм. Жизнеспособность клеток оценивали по отношению величины оптической плотности раствора формазана в каждой пробе к контролю (без облучения). В случае определения

темновой цитотоксичности облучения клеток не проводили.

Измерение среднего времени затухания флуоресценции соединений 3, 5 и 6. Серия измерений времени затухания флуоресценции порфиразинов была проведена в пикосекундном временном интервале с использованием техники кореллированного по времени счета единичных фотонов (Time-correlated Single Photon Counting, TCSPC). В измерительной схеме были применены компоненты системы TCSPC производства компании «Becker & Hickl, GmbH». Окно времени снятия данных было установлено в диапазоне 0–50 нс с числом каналов 1024. Для возбуждения использовали пикосекундный волоконный лазер SC-450 (Fianium Ltd, Великобритания) с настраиваемым спектральным фильтром выходного сигнала в диапазоне 580–595 нм (Chroma Tech., США). Флуоресцентный сигнал детектировали в спектральном диапазоне 640–700 нм. Экспоненциальный характер затухания сигнала флуоресценции обусловлен фундаментальными свойствами кинетики релаксации возбужденного состояния молекул флуорофора. Анализ кривых затухания и подбор наиболее адекватной мультиэкспоненциальной модели выполняли с помощью программного обеспечения SPCImage (Becker & Hickl, GmbH) с последующей обработкой данных в Excel. Времена затухания (τ_{av}) рассчитывали как средние времена жизни компонентов флуоресценции, взвешенные на их интегральную интенсивность.

$$\tau_{av} = \frac{\sum_i a_i \tau_i^2}{\sum_i a_i \tau_i} \quad (4)$$

Здесь a_i and τ_i – амплитуды и времена жизни временных компонент, полученные при аппроксимации экспериментальных кривых затухания флуоресценции в рамках выбранной мультиэкспоненциальной модели. Серию измерений скорости затухания проводили в стандартных 96-луночных планшетах. Лабораторный термостат ThermoStat plus (Eppendorf, GmbH) использовали для контроля и стабилизации температуры измеряемых растворов цианоарилпорфиразинов в этанольно-глицериновых смесях.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Президента РФ (грант МК-1469.2019.3, синтез и исследование свойств порфиразина **1**) с использованием оборудования Аналитического центра Института металлоорганической химии РАН в рамках госзадания (№ АААА-А16-116122110055-5).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Henderson B.W., Dougherty T.J.* // Photochem. Photobiol. 1992. Vol. 55. P. 145. doi 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x
2. *Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Prasmickaite L., Bonsted A., Engesaeter B.O., Angell-Petersen E., Warloe T., Frandsen N., Hogset A.* // J. Microsc. 2005. Vol. 218. P. 133. doi 10.1111/j.1365-2818.2005.01471.x
3. *Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K.* // Nat. Rev. Cancer 2003. Vol. 3. P. 380. doi 10.1038/nrc1071
4. *Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q.* // J. Natl. Cancer Inst. 1998. Vol. 90. P. 889. doi 10.1093/jnci/90.12.889
5. *Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F.* // Int. J. Cancer. 2015. Vol. 136. P. E359. doi 10.1002/ijc.29210
6. *Niedre M., Patterson M.S., Wilson B.C.* // Photochem. Photobiol. 2002. Vol. 75. n 4. P. 382. doi 10.1562/0031-8655(2002)0750382DNILDO2.0.CO2
7. *Hoorelbeke D., Decrock E., Van Haver V., De Bock M., Leybaert L.* // Biochim. Biophys. Acta. 2018. Vol. 1865. P. 1805. doi 10.1016/j.bbamcr.2018.07.022
8. *Benov L.* // Med. Principles and Practice. 2015. Vol. 24. Suppl. 1. P. 14. doi 10.1159/000362416
9. *Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.* // Photodiagn. Photodyn. Ther. 2004. Vol. 1. P. 279. doi 10.1016/S1572-1000(05)00007-4
10. *Hoorelbeke D., Decrock E., Van Haver V., De Bock M., Leybaert L.* // Biochim. Biophys. Acta. 2018. Vol. 1865. P. 1805. doi 10.1016/j.bbamcr.2018.07.022

11. *Vesper B.J., Lee S., Hammer N.D., Elseth K.M., Barrett A.G.M., Hoffman B.M., Radosevich J.A.* // *J. Photochem. Photobiol. (B)*. 2006. Vol. 82. P. 180. doi 10.1016/j.jphotobiol.2005.11.006
12. *Trivedi E.R., Harney A.S., Olive M.B., Podgorski I., Moin K., Sloane B.F., Hoffman B.M.* // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107. N 4. P. 1284. doi 10.1073/pnas.0912811107
13. *Michel S.L.J., Hoffman B.M., Baum S.M., Barrett A.G.M.* // *Progr. Inorg. Chem.* 2001. Vol. 50. P.473. doi 10.1002/0471227110
14. *Izquierdo M.A., Vysniauskas A., Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Kuimova M.K.* // *J. Mater. Chem. (B)*. 2015. Vol. 3. P. 1089. doi 10.1039/c4tb01678e
15. *Yuzhakova D.V., Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Muravieva M.S., Gavrina A.I., Shirmanova M.V., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Zagaynova E.V.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. Vol. 1861. N 12. P. 3120. doi 10.1016/j.bbagen.2017.09.004
16. *Shilyagina N.Yu., Peskova N.N., Lermontova S.A., Brilkina A.A., Vodeneev V.A., Yakimansky A.V., Klapshina L.G., Balalaeva I.V.* // *J. Biophotonics.* 2017. Vol. 10. N 9. P. 1189. doi 10.1002/jbio.201600212
17. *Yakimansky A.V., Meleshko T.K., Ilgach D.M., Bauman M.A., Anan'eva T.D., Klapshina L.G., Lermontova S.A., Balalaeva I.V., Douglas W.E.*, // *J. Polym. Sci. (A)*. 2013. Vol. 51. P. 4267. doi 10.1002/pola.26846
18. *Лермонтова С.А., Григорьев И.С., Ладиллина Е.Ю., Балалаева И.В., Шилягина Н.Ю., Клапишина Л.Г.* // *Коорд. хим.* 2018. Т. 44. № 2. С. 151; *Lermontova S.A., Grigor'ev, I.S., Ladilina E.Y., Balalaeva I.V., Shilyagina N.Y., Klapshina L.G.* // *Russ. J. Coord. Chem.* 2018. Vol. 44. P. 301. doi 10.1134/s1070328418040061
19. *Лермонтова С.А., Григорьев И.С., Пескова Н.Н., Ладиллина Е.Ю., Балалаева И.В., Клапишина Л.Г., Боярский В.П.* // *ЖОХ.* 2017. Т. 87. Вып. 3. С. 474; *Lermontova S.A., Grigor'ev I.S., Peskova N.N., Ladilina E.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Boyarskii V.P.* // *Russ. J. Gen. Chem.* 2017. Vol. 87. N 3. P. 479. doi 10.1134/s1070363217030173
20. *Лермонтова С.А., Григорьев И.С., Шилягина М.Ю., Пескова Н.Н., Балалаева И.В., Ширманова М.В., Клапишина Л.Г.* // *ЖОХ.* 2016. Т. 86. Вып. 6. С. 1000; *Lermontova S.A., Grigorev I.S., Shilyagina N.Yu., Peskova N.N., Balalaeva I.V., Shirmanova M.V., Klapshina L.G.* // *Russ. J. Gen. Chem.* 2016. Vol. 86. N 6. P. 1330. doi 10.1134/S1070363216060189
21. *Haidekker M.A., Theodorakis E.A.* // *J. Biol. Eng.* 2010. Vol. 4. P. 11. doi 10.1186/1754-1611-4-11
22. *Kuimova M.K., Botchway S.W., Parker A.W., Balaz M., Collins H.A., Anderson H.L., Suhling K., Ogilby P.R.* // *Nat. Chem.* 2009. Vol. 1. P. 69. doi 10.1038/nchem.120
23. *Kuimova, M. K.* // *Chimia.* 2012ю Vol. 66. N 4. P. 159. doi 10.2533/chimia.2012.159
24. *Förster, T., Hoffmann, G.* // *Zeitschrift Für Physikalische Chemie.* 1971. Vol. 75. N 1–2. P. 63. doi 10.1524/zpch.1971.75.1_2.063
25. *Фрешни Р.* *Культура животных клеток.* М.: Бином, 2010. 691 с.
26. *Гудиленков И.Д., Фукин Г.К., Баранов Е.В., Трифонов А.А.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2008. № 1. С. 39; *Gudilenkov I.D., Fukin G.K., Baranov E.V., Trifonov A.A.* // *Russ. Chem. Bull.* 2008. Vol. 57. N 1. P. 40. doi 10.1007/s11172-008-0006-y
27. *Harvey M.D., Pace J.T., Yee G.T.* // *Polyhedron.* 2007. Vol. 26. P. 2037. doi 10.1016/j.poly.2006.09.097
28. *Шилягина Н.Ю., Плеханов В.И., Шкунов И.В., Шилягин П.А., Дубасова Л.В., Брилкина А.А., Соколова Е.А., Турчин И.В., Балалаева И.В.* // *Современные технологии в медицине.* 2014. Т. 6. № 2. С. 15.

New Cyanoarylporphyrazines with High Sensitivity of Photophysical Parameters to Viscosity As Perspective Agents for Photodynamic Therapy

S. A. Lermontova^a, T. S. Lyubova^a, E. Yu. Ladilina^a, V. I. Plekhanov^b, I. V. Balalaeva^c, V. P. Boyarskii^d, and L. G. Klapshina^{a,b,*}

^a Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^b Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^c Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^d St. Petersburg State University, St. Petersburg, 198504 Russia

*e-mail: klarisa@iomc.ras.ru

Received June 24, 2019; revised June 24, 2019; accepted June 27, 2019

A series of cyanoarylporphyrazine pigments was analyzed from the point of view of their photophysical properties and photodynamic activity dependence on the nature of the substituents and their position in the aromatic ring. Replacement of the fluorine atom in the *para*-position with the methoxy group leads to a significant increase in the ratio of the dark and photo-induced cytotoxicities, i.e. potential therapeutic index of porphyrazine as photosensitizer on photodynamic cancer therapy.

Keywords: cyanoarylporphyrazines, photosensitizers, photo-induced and dark cytotoxicity, fluorescent molecular rotors, optical probes of intracellular viscosity