

УДК 544.52

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНОГО
БЕТА-ДИКЕТОНАТА ДИФТОРИДА БОРА**

© 2024 г. А. Е. Егоров^{а,*}, А. Г. Мирочник^б, Е. В. Федоренко^б,
Н. А. Любых^б, А. А. Костюков^а, А. А. Маркова^а, И. Д. Бурцев^а,
М. Т. Нгуен^а, В. И. Погонин^{а,с}, Е. А. Зевакин^с, В. А. Кузьмин^а

^аИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

^бИнститут химии ДВО РАН, проспект 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022 Россия

^сИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, ул. Косыгина, 19, Москва, 119334 Россия

*E-mail: ae.yegorov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.08.2023 г.

После доработки 18.09.2023 г.

Принята к публикации 19.09.2023 г.

Исследована фотосенсибилизирующая способность производного бета-дикетоната дифторида бора. Установлены спектрально-люминесцентные свойства красителя и спектрально-кинетические характеристики его триплетного состояния. Определена квантовая эффективность образования синглетного кислорода. Показана фотосенсибилизирующая активность красителя в отношении опухолевых клеток аденокарциномы толстой кишки *in vitro* и получены значения темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности.

Ключевые слова: бета-дикетонат дифторида бора, триплетное состояние, синглетный кислород

DOI: 10.31857/S0023119324010045 **EDN:** KBMZWP

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря выраженным люминесцентным свойствам бета-дикетонаты дифторида бора привлекают внимание для использования в клеточной визуализации [1–3] создания флуоресцентных проб [4–8]. Красители данного класса могут обладать термохромной [9, 10] и механохромной [11–13] люминесценцией. Данные красители используются для включения в полимерные материалы [14, 15]. Введение тяжелого атома в структуру соединений на основе бета-дикетонатов дифторида бора существенно увеличивает квантовый выход интеркомбинационной конверсии рассматриваемого класса соединений, что позволяет расширить применение за счет фотосенсибилизирующего действия [16, 17].

Данная работа посвящена исследованию фотосенсибилизирующих свойств **DBD** (2,2-дифторо-4-(4-бромфенил)-6-(4-метоксифенил)-1,3,2-диоксокарборина) в бесклеточных системах и в экспериментах *in vitro* на культуре опухолевых клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Регистрацию спектров поглощения производили на спектрофотометре Shimadzu UV3101PC (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветах 1 × 1 см. Эксперименты по импульсному фотолизу проводили

на установке лазерного фотолиза LKS 80 (Applied Photophysics, Великобритания), с использованием Nd:YAG лазера $\lambda_{\text{возб}} = 355$ нм, 5 нс). Регистрацию спектров флуоресценции и люминесценции синглетного кислорода проводили с помощью спектрофлуорометра FluoTime 300 (PicoQuant, Германия), с возбуждением ксеноновой лампой ($\lambda_{\text{возб}} = 355$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм соответственно). В качестве стандарта для измерения квантового выхода флуоресценции использовался антрацен в этаноле $\Phi_{\text{фл}} = 0.27$ [18]. Использовались растворы испытуемого образца и стандарта со значениями оптической плотности около 0.05 на 1 см в точке возбуждения.

ИК-спектры записывали на приборе «IR Prestige-21» («Shimadzu») в таблетках с KBr. Масс-спектры записывали в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов, источник ионизации ESI, масс-спектрометрический детектор «Shimadzu LCMS-2010EV». Образцы вводили в детектор в системе ацетонитрил—вода (9:1). Спектры ЯМР ¹H (400 МГц) и ¹³C (100 МГц) записаны на спектрометре «Bruker WH 400» с использованием тетраметилсилана в качестве стандарта.

Для экспериментов использована клеточная линия человека HCT116 (аденокарцинома толстой кишки). Она протестирована в American Type Culture Collection, США. Клетки HCT116 культивировали

в среде DMEM. В культуральную среду добавляли следующие компоненты до конечных концентраций: 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (среды и добавки производства Пан-Эко, Россия), инкубация проводилась при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использована культура в логарифмической фазе роста. Для профилактики микоплазменного заражения использовался препарат Мусокилл (GE, США). Перед началом экспериментов проводилось не менее трех пассажей на свободной от антимикоплазменного препарата среде.

Цитотоксическое действие исследованного соединения оценивали методом МТТ-теста (по способности восстановления желтой соли 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтеразола в темносиний кристаллический формазан митохондриями живых клеток). По результатам исследования цитотоксичности построены кривые выживаемости.

Клетки рассевали в лунки 96-луночного планшета (NUNC, США) (5000 клеток в 190 мкл культуральной среды), инкубировали 24 ч при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. Вносили по 10 мкл раствора исследуемых веществ в культуральной среде, приготовленных серийными разведениями из исходных растворов, до конечных концентраций 1.6–50 мкмоль/л (конечная концентрация растворителя не превысила 0.5 об. %). Контролем служили клетки без препарата (интактный контроль). В темновом эксперименте клетки инкубировали 48 ч при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере и за 1 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл, ПанЭко, Россия). В световом эксперименте клетки инкубировали 24 ч при 37°C, 5% CO₂ с теми же концентрациями соединения, заменяли клеточную среду, после чего фотовозбуждали накопленное клетками соединение диодным источником света 400 нм (конечная плотность дозы 30 Дж/см²), инкубировали 24 ч в темноте для развития гибели и в лунки вносили по 20 мкл водного раствора МТТ (5 мг/мл, ПанЭко, Россия). После окончания инкубации клеток с МТТ-реагентом культуральную среду отбирали, клетки ресуспендировали в 100 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность раствора на планшетном спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 571 нм. Процент клеток, выживших при действии каждой концентрации исследуемых веществ, подсчитывали как частное от деления средней оптической плотности в лунках после инкубации с данной дозой к средней оптической плот-

ности контрольных лунок (значения последних приняты за 100%). Каждую концентрацию изучали с 3-х кратной статистикой по результатам трех независимых экспериментов.

2,2-Дифтор-4-(4'-бромфенил)-6-(4'-метоксифенил)-1,3,2-диоксаборин (DBD). Порошок желтого цвета, т. пл. 217–219°C. Спектр ЯМР ¹H (ацетон-d₆, δ, м.д., J/Гц): 3.96 (с, 3 H, CH₃O); 7.12 (д, 2 H, C₆H₄Br, J = 12.0); 7.69 (с, 1 H, γ-CH); 7.81 (д, 2 H, C₆H₄OMe, J = 8.6); 8.31 (д, 2 H, C₆H₄Br, J = 8.6); 8.35 (д, 2 H, C₆H₄OMe, J = 9.4). Спектр ЯМР ¹³C (ацетон-d₆, δ, м.д.): 57.28, 94.92, 116.61, 131.09, 132.08, 133.85, 134.14, 134.95, 136.34, 168.12, 206.85. ИК-спектр (KBr), ν/см⁻¹: 1605, 1589 (BrC₆H₄, CH₃OC₆H₄); 1555, 1523 (C=O, C=C); 1273 1253 (B–F); 1128, 1094 (B–O). Масс-спектр (ESI⁺), m/z (I_{отн} (%)): 417 [M + 2H₂O]⁺ (100), 366 [M–F]⁺ (40). Найдено (%): C, 50.27; H, 3.41. C₁₆H₁₂BrBF₂O₃. Вычислено (%): C, 50.89; H, 3.15.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Соединение **DBD** (2,2-дифторо-4-(4-бромфенил)-6-(4-метоксифенил)-1,3,2-диоксокарборин (рис. 1) был синтезирован ранее [19], однако его фотосенсибилизирующие свойства не были охарактеризованы.

Спектры поглощения и флуоресценции в ацетонитриле (рис. 2) соединения **DBD** характеризуются максимумом поглощения 410 и 456 нм соответственно. Квантовый выход флуоресценции **DBD** в ацетонитриле составил 0.80, что указывает на выраженные люминесцентные характеристики данного красителя.

Введение атома брома в молекулу дибензоилметанатдифторида бора приводит к ускорению интеркомбинационной конверсии в результате усиления спин-орбитального взаимодействия. В экспериментах по импульсному фотолизу, при фотовозбуждении раствора соединения **DBD** в ацетонитриле в присутствии кислорода наблюдается выцветание основного состояния около 400 нм, соответствующего полосе синглет-синглетного поглощения вещества, и по-

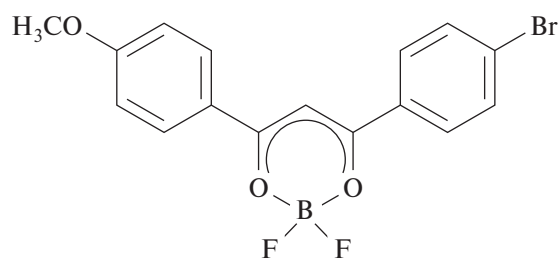


Рис. 1. Структурная формула **DBD**.

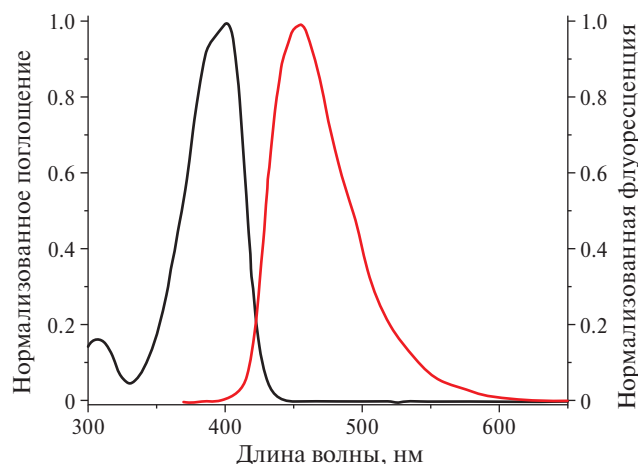


Рис. 2. Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции соединения **DBD** в ацетонитриле.

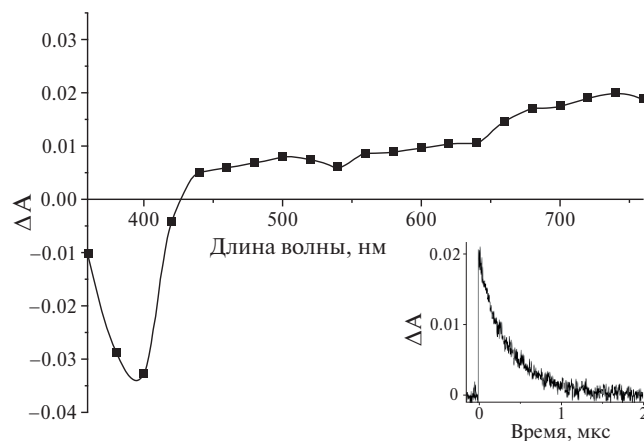
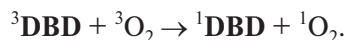


Рис. 3. Дифференциальный спектр поглощения соединения **DBD** ($C = 3.0 \times 10^{-5}$ M) в ацетонитриле в присутствии кислорода, 100 нс после вспышки ($\lambda_{\text{возб}} = 355$ нм). Вставка: кинетика гибели триплетного состояния при 700 нм ($k_T = 2.5 \times 10^6$ с $^{-1}$).

поглощение триплетного состояния в более длинноволновой области (450–750 нм) (рис. 3, вставка). Полученная константа скорости гибели триплетного состояния **DBD** в обескислороженном ацетонитриле составила $k_T = 2.0 \times 10^4$ с $^{-1}$. С учетом растворимости кислорода в ацетонитриле [20], константа тушения триплетного состояния кислородом составила 1.0×10^9 M $^{-1}$ с $^{-1}$.

В результате переноса энергии с триплетного состояния красителя **DBD** на молекулярный кислород происходит образование синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), который является цитотоксическим интермедиатом:



Регистрация люминесценции синглетного кислорода проводится в ближнем ИК-диапазоне электромагнитного спектра ($\lambda_{\text{макс}} \approx 1275$ нм) (рис. 4).

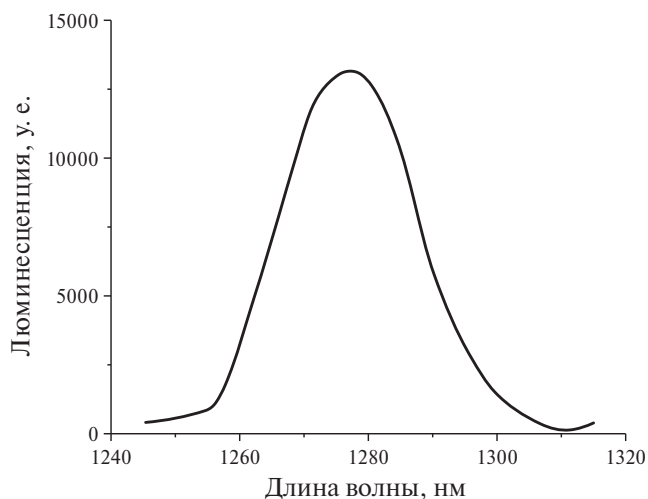


Рис. 4. Спектр люминесценции синглетного кислорода в растворе **DBD** ($C = 3.5 \times 10^{-6}$ M) в ацетонитриле ($\lambda_{\text{возб}} = 410$ нм).

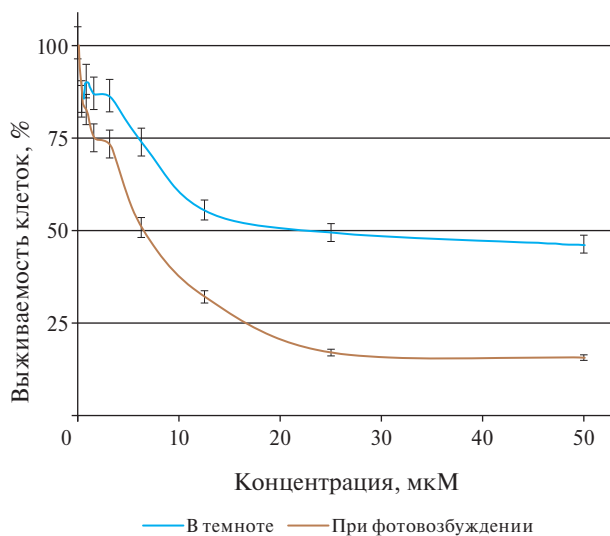
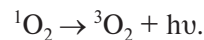


Рис. 5. Кривые выживаемости клеток HCT116 при действии исследованного соединения: в темноте после 48 ч инкубации и после 24 ч накопления, освещения (400 нм, 30 Дж/см 2 и 24 ч инкубации клеток) в эксперименте по фотовозбуждению.



Для оценки эффективности процесса переноса энергии проводили определение квантового выхода синглетного кислорода с использованием раствора тетрафенилпорфирина в ацетонитриле в качестве стандарта ($\Phi_\Delta = 0.60$) [21]. Для соединения **DBD** в ацетонитриле квантовый выход синглетного кислорода составил 0.13.

Для проверки фотосенсибилизирующих свойств **DBD** на культивированных клетках *in vitro* был использован метод определения выживаемости клеток МТТ-тест. Исследована цитотоксическая активность

синтезированного соединения на опухолевых клетках карциномы толстой кишки человека НСТ116 в условиях темнового эксперимента и эксперимента с фотовозбуждением красителя (рис. 5).

В течение 48 ч инкубации в темноте цитотоксичность исследованного соединения была незначительна — показатель IC_{50} составил 23 ± 2.2 мкМ. В световом эксперименте после накопления соединения 24 ч и фотовозбуждения диодным источником на 400 нм, 30 Дж/см² с последующей инкубацией клеток 24 ч произошло усиление гибели клеток — фотоиндуцированный показатель цитотоксичности IC_{50} составил 6.0 ± 0.5 мкМ. Так, исследованное соединение проявляет свойства фотосенсибилизатора, вызывая дозозависимую гибель опухолевых клеток НСТ116 в субмикромольном диапазоне концентраций после фотовозбуждения большей, чем при инкубации в темноте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы фотохимические свойства производного бета-дикетоната дифторида бора. В результате фотовозбуждения молекул **DBD** установлено образование триплетного состояния красителя. Определена квантовая эффективность образования синглетного кислорода в растворе **DBD**. В клеточных экспериментах соединение **DBD** проявляет свойства фотосенсибилизатора, вызывая дозозависимую гибель опухолевых клеток НСТ116 в субмикромольном диапазоне концентраций за счет образования активных форм кислорода.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-23-00461. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН. Эксперименты на клетках проводились на базе ЦКП “Новые материалы и технологии” Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН при поддержке Государственной программы Российской Федерации для Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (проект № 122041400114-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang J., Chen Q., Fan Y., Qiu H., Ni Z., Li Y., Yin S. // *Dye. Pigment.* 2021. V. 193. P. 109500.
2. Mirochnik A.G., Puzyrkov Z.N., Fedorenko E. V., Svis-tunova I. V., Markova A.A., Shibaeva A.V., Burtsev I.D., Kostyukov A.A., Egorov A.E., Kuzmin V.A. // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2023. V. 291. P. 122319.
3. Kerr C., DeRosa C.A., Daly M.L., Zhang H., Palmer G.M., Fraser C.L. // *Biomacromolecules.* 2017. V. 18. P. 551–561.
4. Shen Z., Gao Y., Li M., Zhang Y., Xu K., Gong S., Wang Z., Wang S. // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022. V. 281. P. 121609.
5. Park K., Kim M.K., Seo Y., Ha T., Yoo K., Hyeon S.J., Hwang Y.J., Lee J., Ryu H., Choo H.A. // *ACS Chem. Neurosci.* 2017. V. 8. pp. 2124–2131.
6. DeRosa C.A., Kolpaczynska M., Kerr C., Daly M.L., Morris W.A., Fraser C.L. // *Chempluschem.* 2017. V. 82. pp. 399–406.
7. Ma Q., Zhang Y., Jiao Y., Zhang T., Chu Q., Xiao H., Zhou Z., Liu Y. // *Analyst.* 2021. V. 146. P. 5873–5879.
8. Liu X., Sun H., Shu W., Zhai Z., Xiao H., Zhang T., Liu Y. // *ChemistrySelect.* 2022. V. 7. P. e202202272.
9. Wang J.-X., Yu Y.-S., Niu L.-Y., Zou B., Wang K., Yang Q.Z. // *Chem. Commun.* 2020. V. 56. pp. 6269–6272.
10. Jimenez R., Duarte F., Nuti S., Campo J.A., Lodeiro C., Cano M., Cuerva C. // *Dye. Pigment.* 2020. V. 177. P. 108272.
11. Poggi B., Lopez E., Métivier R., Bodelot L., Allain C. // *Macromol. Rapid Commun.* 2022. V. 43. P. 2200134.
12. Mehiaoui N., Leleu S., Kibou Z., Choukchou-Braham N., Franck X., Gallavardin T. // *Dye. Pigment.* 2022. V. 208. pp. 110829.
13. Butler T., Zhuang M., Fraser C.L. // *J. Phys. Chem. C* 2018. V. 122. P. 19090–19099.
14. Gong W., Dong K., Liu L., Hassan M., Ning G. // *Catal. Sci. Technol.* 2021. V. 11. pp. 3905–3913.
15. Mirochnik A.G., Fedorenko E.V., Shlyk D.K. // *Russ. Chem. Bull.* 2016. V. 65. pp. 806–810.
16. Li J., Wang X., Pan Y., Sun Y., Wang G., Zhang K. // *Chem. Commun.* 2021. V. 57. pp. 8794–8797.
17. Samonina-Kosicka J., DeRosa C.A., Morris W.A., Fan Z., Fraser C.L. // *Macromolecules.* 2014. V. 47. pp. 3736–3746.
18. Demasa J.N., Crosby G.A. // *J. Chem. Phys.* 1968. V. 48. P. 4726.
19. Gukhman E. V., Reutov V. A. // *Russ. J. Gen. Chem.* 1999. V. 69. P. 1608.
20. Franco C., Olmsted III, J. // *Talanta.* 1990. V. 37. pp. 905–909.
21. Reinhard S., Ebrahim A. // *J. Phys. Chem.* 1990. V. 94. pp. 4377–4378.