

БИОСОВМЕСТИМЫЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ХЛОРИНА e₆: ПОЛУЧЕНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**Клименко И.В.¹, Лобанов А.В.^{1,2}**¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: avlobanov@mail.ru

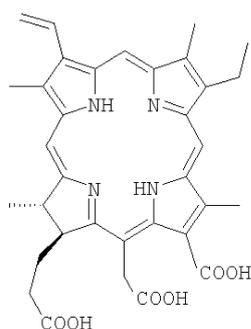
Поступила в редакцию: 30.09.2019

Аннотация. В работе описаны методы синтеза, а также представлены данные изучения спектрально-флуоресцентных свойств новых супрамолекулярных систем на основе хлорина e₆ (Хе₆) с различными биосовместимыми вспомогательными веществами, такими, как поливиниловый спирт гидролизованный, поли-N-винилпирролидон, *натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы*, диметилсульфоксид, кремофор® PEG-40. Выбор данных вспомогательных соединений объясняется их широким использованием в качестве биологически совместимых веществ, применяемых как часть фармакологических препаратов. Отмечена высокая эффективность применения таких систем, как кремофор® PEG-40 – Хе₆ и поли-N-винилпирролидон – Хе₆ для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Установлено, что спектрально-флуоресцентные характеристики данных систем свидетельствуют о дезагрегации молекул Хе₆, последовательном взаимодействии их со вспомогательными веществами в растворах и образовании молекулярных ассоциатов и молекулярных комплексов типа пигмент-пигмент и пигмент-солюбилизатор. Полученные результаты доказывают перспективность создания метода управляемой агрегации фотосенсибилизаторов (ФС) в составе супрамолекулярных комплексов, его использования при разработке лекарственных препаратов для фотодинамической терапии с прогнозированной фотодинамической активностью и тестирования *in vivo* эффективных ФС.

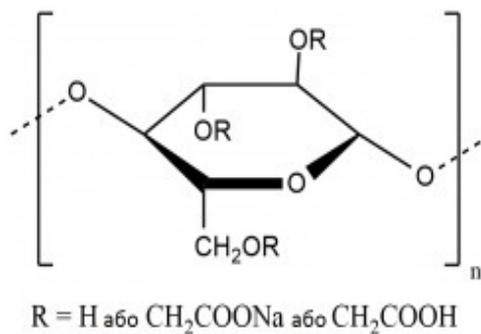
Ключевые слова: хлорин e₆, супрамолекулярные системы, спектральные характеристики, оптическое поглощение, флуоресценция.

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) клинически используется в качестве метода нехирургического лечения при онкологических, офтальмологических и других заболеваниях и основан на генерации синглетного кислорода в результате фотохимических реакций, происходящих в патологических участках под действием энергии видимого диапазона. Избирательное уничтожение клеток опухоли достигается в результате реакции, происходящей при длине волны облучаемого света, соответствующей максимальной восприимчивости фотосенсибилизатора (ФС). К числу перспективных ФС относится хлорин e₆ (водорастворимое производное хлорофилла) [1], обладающий избирательной способностью накапливаться в опухоли и активирующий систему клеточного иммунитета, в том числе, клетки-киллеры, распознающие и уничтожающие раковые клетки. Хлорин e₆ (Хе₆) имеет следующие спектральные и энергетические характеристики: максимум поглощения находится в области 660±5 нм, что соответствует области наибольшей оптической прозрачности для биологических тканей, а квантовый выход синглетного кислорода достигает 0,7 [2, 3]. Большую роль в разработке соединений на основе хлорина играет доступность сырья, так как предшественник хлоринов хлорофилл *a* производится, например, из микроводоросли *Spirulina platensis* или листьев крапивы [1, 4, 5]. Хлорин e₆ (Хе₆) образуется при анаэробном щелочном гидролизе феофорбида *a*, полученного, в свою очередь, при обработке хлорофилла *a* концентрированными кислотами [6]. Хлорофилл, как элемент обычных питательных сред, не является ядом для человека. Энергетический потенциал Хе₆, как производного хлорофилла, идентичен здоровым клеткам организма, и избирательное накопление его в опухолевых тканях происходит из-за захвата его в качестве «питательной среды» для них.

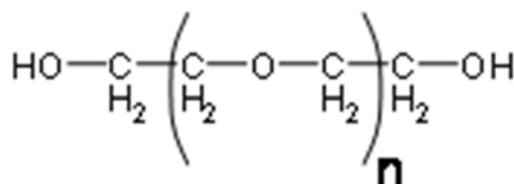
Принципиально важным при разработке препаратов для ФДТ является отсутствие агрегации ФС в растворах, которая, в свою очередь, приводит к падению квантового выхода генерации синглетного кислорода. Известно, однако, что молекулы Хе₆ образуют агрегаты в водных растворах, что значительно снижает его фотодинамическую активность. С целью оптимизации фотофизических и фармакологических свойств, а также создания новых лекарственных средств, применяемых при ФДТ, в данной работе получены новые супрамолекулярные системы на основе Хе₆ (2·10⁻⁵ М). В качестве вспомогательных веществ в этой работе были использованы поливиниловый спирт гидролизованный (ПВС, [-CH₂CH(OH)-]_n, Aldrich, 130 кДа, 0,1% раствор), поли-N-винилпирролидон (ПВП, Sigma, 10 кДа, 1% раствор), *натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы* (Na-КМЦ, пищевая добавка E466, [C₆H₇O₂(OH)_x(CH₂COONa)_y]_n, Acros, 250 кДа, 0,1% раствор), диметилсульфоксид (ДМСО, M = 78,13 г/моль, ρ = 1,1004 г/см³, 1% раствор), кремофор® PEG-40 (ПЭГ, солюбилизатор гидрогенизированного касторового масла, полиэтиленгликоль ПЭГ-40, 0,1% раствор). Все они являются биологически совместимыми веществами, применяемыми как часть фармакологических препаратов. Хлорин e₆ был любезно предоставлен сотрудниками кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет». Структурные формулы используемых в работе веществ приведены на рисунке 1.



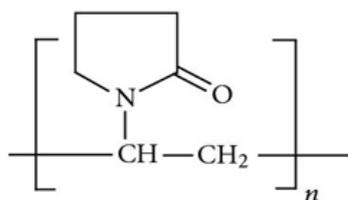
... Хлорин e₆



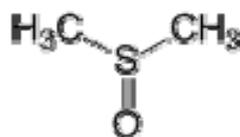
Na-KMЦ



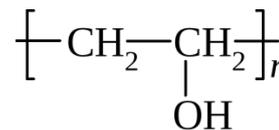
..... ПЭГ, n=40



ПВП



ДМСО



ПВС

Рисунок 1. Структурные формулы используемых в работе веществ

Спектры оптического поглощения (200-900 нм) регистрировали с помощью UV-VIS спектрофотометра TU-1901 фирмы "Beijing Purkinje General Instrument Co, Ltd". Анализ плохо разрешенных спектров поглощения проводили на основе разложения его на гауссовы составляющие. Регистрация спектров флуоресценции в области 550-800 нм проводили с использованием спектрофлуориметра «Флюорат-02 Панорама» фирмы «Люмэкс». Длина волны возбуждения составляла 410 нм. Все измерения проводили при 20°С.

На рисунке 2 представлены спектры оптического поглощения исследуемых супрамолекулярных систем на основе Хе₆ в различных вспомогательных веществах. Для сравнения спектр оптического поглощения Хе₆. Спектр поглощения хлорина e₆ содержит характерную полосу Soret (В-полосу) в области ~404 нм, три малоинтенсивных пика в области 500-600 нм и, благодаря частично гидратированным порфириновым кольцам, ярко выраженный пик при λ=653 нм, соответствующий максимуму Q-полосы. Анализ спектров в области пика Soret свидетельствует об одинаковой гидрофобности всех представленных систем. Кроме того, гипохромные изменения спектра в области полосы Soret, скорее всего, можно объяснить появлением в растворе комплексов ПВП- Хе₆, ДМСО- Хе₆, ПЭГ- Хе₆ и Na-KMЦ - Хе₆. Вероятно, в них хромофор находится в более упорядоченной форме по сравнению со своим свободным состоянием в водном растворе Хе₆. Смещение спектра оптического поглощения Хе₆ в длинноволновую область при использовании всех представленных в данной работе вспомогательных веществ является хорошей предпосылкой повышения проницаемости тканей для видимого света и снижения поглощения света гемоглобином крови в области 500-600 нм, что играет существенную роль для увеличения эффективности ФДТ.

В области Q-полосы представленных оптических спектров поглощения всех биосовместимых систем наблюдается батохромный сдвиг максимума поглощения, при этом максимальный сдвиг в область длинных волн наблюдается у систем ПВП- Хе₆ и ПЭГ- Хе₆ на 12 и 13 нм, соответственно. Данные изменения спектра поглощения в присутствии вспомогательных веществ, вероятно, связаны с сольватохромным эффектом, вызванным присутствием менее полярного, в отличие от только водного раствора, окружения хлорина e₆. Нельзя

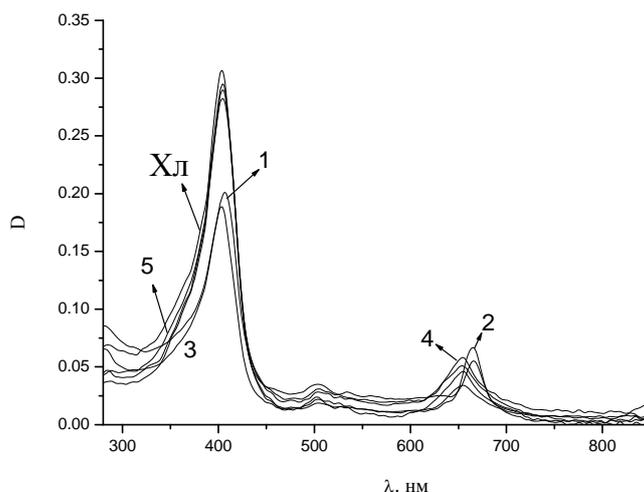


Рисунок 2. Спектры оптического поглощения супрамолекулярных систем на основе Xe_6 (2×10^{-5} М) в различных вспомогательных веществах: 1. Хл – водный раствор Xe_6 , 1. ПЭГ-40 - Xe_6 , 2. ПВП - Xe_6 , 3. Na-КМЦ - Xe_6 , 4. ПВС - Xe_6 , 5. ДМСО - Xe_6

также отрицать и мономеризацию агрегированных молекул Xe_6 в присутствии вспомогательных веществ. взаимодействии Xe_6 со вспомогательными веществами в растворах и образовании молекулярного комплекса. Подтверждением этому является появление в области ~600-640 нм спектров всех супрамолекулярных систем линий комплекса молекул порфирина с вспомогательными веществами.

Анализ спектрально-люминесцентных свойств представленных в данной работе систем показал (рис. 3), что добавление всех вспомогательных веществ приводит к увеличению интенсивности люминесценции Xe_6 . Максимальное увеличение интенсивности люминесценции характерно для систем ПЭГ- Xe_6 , ПВП - Xe_6 , Na-КМЦ - Xe_6 и ПВС - Xe_6 . Следует отметить, что наблюдаемый сильный bathochromный сдвиг максимума люминесценции, особенно в присутствии таких биосовместимых вспомогательных веществ, как кремофор® PEG-40 и ПВП, также свидетельствует о появлении комплекса “вспомогательное вещество - Xe_6 ”.

На основании всех представленных данных можно с уверенностью утверждать, что применение таких биосовместимых супрамолекулярных систем, как *кремофор® PEG-40 - Xe_6* и *ПВП - Xe_6* для ФДТ и диагностики является очевидным. При этом солиubilization во всех растворах представленных вспомогательных веществ препятствует агрегации хлорина e_6 , обеспечивает его эффективную стабилизацию либо в мономерной флуоресцентно-активной форме, либо в виде комплекса с переносом заряда. Полученные результаты также свидетельствуют о перспективности создания метода управляемой агрегации ФС в составе супрамолекулярных комплексов и его использования при разработке лекарственных препаратов для фотодинамической терапии с

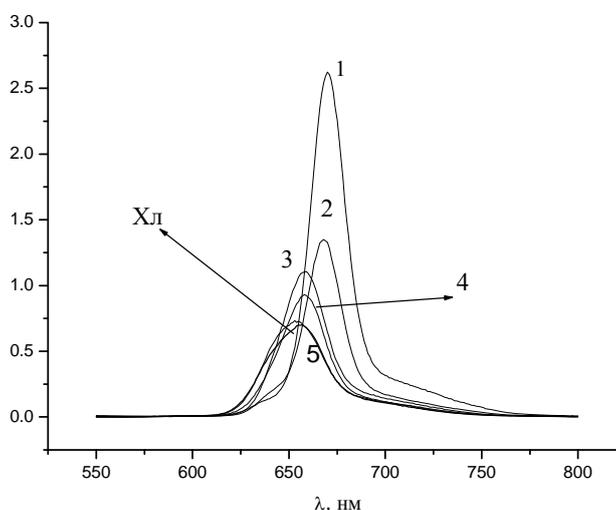


Рисунок 3. Спектры флуоресценции супрамолекулярных систем на основе Xe_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в различных вспомогательных веществах: 1. Хл – водный раствор Xe_6 , 1. ПЭГ-40 - Xe_6 , 2. ПВП - Xe_6 , 3. Na-КМЦ - Xe_6 , 4. ПВС - Xe_6 , 5. ДМСО - Xe_6

прогнозированной фотодинамической активностью. Кроме того, простота синтеза лекарственных препаратов и простота выполнения процедуры ФДТ делает возможным проведение тестирования *in vivo* эффективных ФС.

Список литературы / References:

1. Клименко И.В., Лобанов А.В. Спектрально-флуоресцентные свойства супрамолекулярных систем на основе хлорина e_6 . *Химическая физика*, 2018, т. 37, № 1, с. 13-20. DOI: 10.7868/S0207401X18010077. [Klimenko I.V., Lobanov A.V. Spectral-fluorescent properties of supramolecular systems based on E6 chloride. *Himicheskaya fizika*, 2018, vol. 37, no. 1, pp. 13-20. DOI: 10.7868/S0207401X18010077. (In Russ.)]
2. Zenkevich E., Sagun E., Knyukshto V., Shulga A., Mironov A. et al. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT. *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1996, vol. 33, no 2, pp. 171-180.
3. Пархоц М.В., Галиевский В.А., Стасhevский А.С., Трухачева Т.В., Джагаров Б.М. Динамика и эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода хлорином e_6 : влияние pH раствора и поливинилпирролидона. *Оптика и спектроскопия*, 2009, т. 107, № 6, с. 1026-1032. [Parkhots M.V., Galievsky V.A., Stashevsky A.S., Trukhacheva T.V., Jagarov B.M. Dynamics and efficiency of photosensitized formation of singlet oxygen by e_6 chloride: effect of pH solution and polyvinylpyrrolidone. *Optika i spektroskopiya*, 2009, vol. 107, no. 6, pp. 1026-1032. (In Russ.)]
4. Klimenko I.V., Lobanov A.V. Photosensitizing properties of supramolecular systems based on chlorin e_6 . *J. of Biomedical Photonics & Eng.*, 2016, vol. 2, no. 4, p. 040310-1-5. DOI: 10.18287/JBPE16.02.040310.
5. Клименко И.В., Лобанов А.В. Спектрально-флуоресцентные свойства хлорина e_6 в различных супрамолекулярных системах. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, № 1-2, с. 71-75. [Klimenko I.V., Lobanov A.V. Spectral-fluorescent properties of E6 chloride in various supramolecular systems. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, vol. 1-2, pp. 71-75. (In Russ.)]
6. Шляхтин С.В., Трухачева Т.В. Возможности и перспективы использования производных хлорофилла для создания эффективных и безопасных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Обзор литературы. *Вестник фармации*, 2010, № 2 (48), с. 87-106. [Shlyakhtin S.V., Trukhacheva T.V. Possibilities and prospects of using chlorophyll derivatives to create effective and safe photosensitizers for photodynamic therapy. Literature review. *Vestnik farmacii*, 2010, No. 2 (48), pp. 87-106. (In Russ.)]

BIOCOMPATIBLE SUPRAMOLECULAR SYSTEMS BASED ON CHLORIN e_6 : PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

Klimenko I.V.¹, Lobanov A.V.^{1,2}

¹ N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Kosygin str, 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

² N.N. Semenov Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences, Kosygin str, 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: avlobanov@mail.ru

Abstract. The paper presents the methods of synthesis, as well as data of spectral-fluorescent study for new supramolecular systems based on chlorin e_6 (Ce_6) with various biocompatible excipients, such as hydrolyzed polyvinyl alcohol, poly-N-vinylpyrrolidone, sodium salt of carboxymethyl cellulose, dimethylsulfoxide, Cremophor® PEG-40. The choice of these excipients is due to their high use as biocompatible materials treated as a part of pharmacological drugs. High efficiency of such systems as cremophore® PEG-40- Ce_6 and poly-N-vinylpyrrolidone- Ce_6 for fluorescent diagnostics and photodynamic therapy is shown. Spectral-fluorescent characteristics of these systems have been found to indicate the disaggregation of Ce_6 molecules, their sequential interaction with excipients in solutions and a formation of molecular associates and molecular complexes of pigment-pigment and pigment-solubilizer types. The obtained results can be useful for creation a method of controlled aggregation of photosensitizers (PS) as a part of supramolecular complexes, its application in the development of medicines with predicted photodynamic activity for photodynamic therapy and diagnostics and testing *in vivo* effective PS.

Key words: chlorin e_6 , supramolecular systems, spectral characteristics, optical absorption, fluorescence.