

СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ХЛОРИНА e₆ В РАЗЛИЧНЫХ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХКлименко И.В.¹, Лобанов А.В.²¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

²ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: avlobanov@mail.ru

Аннотация. С целью создания новых лекарственных средств, применяемых при фотодинамической терапии (ФДТ), исследованы оптическое поглощение и флуоресценция хлорина e₆ (Хе₆) в различных супрамолекулярных системах. Изучено влияние различных вспомогательных веществ, таких, как поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), бычий сывороточный альбумин (БСА), хитозан, тритон X-100 (ТХ-100), гексаметафосфат натрия (ГМФ), полидиметилдиаллиламмония хлорид (ПДДА) на спектральные характеристики данных систем. Установлено, что спектрально-флуоресцентные характеристики таких систем, как Хе₆-ПВП, Хе₆-ПЭГ, Хе₆-БСА, Хе₆-ТХ-100, Хе₆-ГМФ, Хе₆-ПДДА, свидетельствуют о дезагрегации молекул хлорина e₆, последовательном взаимодействии их со вспомогательными веществами в растворах и образовании молекулярных ассоциатов и молекулярных комплексов. Система Хе₆-хитозан характеризуется агрегацией пигмента в растворе, что уменьшает фотохимическую активность фотосенсибилизатора. Полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности метода управляемой агрегации фотосенсибилизаторов в составе супрамолекулярных комплексов для создания лекарственных препаратов для ФДТ с прогнозируемой фотодинамической активностью.

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

SPECTRAL AND FLUORESCENT PROPERTIES OF CHLORINE e₆ IN DIFFERENT SUPRAMOLECULAR SYSTEMSKlimenko I.V.¹, Lobanov A. V.²¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia

e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

²Semenov Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences,

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia

e-mail: avlobanov@mail.ru

Abstract. Optical absorption and fluorescence of different supramolecular systems based on chlorine e₆ (Ce₆) were investigated in order to create new medicines used in photodynamic therapy (PDT). The influence of different excipients as polyvinylpyrrolidone (PVP), polyethyleneglycol (PEG), bovine serum albumin (BSA), chitosan, triton X-100 (TX-100), sodium hexametaphosphate (GMP), polydimethyldiallilammonium chloride (PDDA) on spectral characteristics of these systems was studied. It is found out that spectral-fluorescence characteristics of such systems as Ce₆-PVP, Ce₆-PEG, Ce₆-BSA, Ce₆-TX-100, Ce₆-GMP, Ce₆-PDDA confirm disaggregation of molecules of chlorine e₆, their consecutive interaction with excipients in solutions and formation of molecular associates and molecular complexes. The system Ce₆-chitosan is characterized by aggregation of dye in solution that reduces photochemical activity of a photosensitizer. The obtained results allow to conclude promising method of controlled aggregation of photosensitizers in the composition of supramolecular complexes to create medicines for PDT of predictable photodynamic activity.

Key words: chlorine e₆, supramolecular systems, spectral characteristics, optical absorption, fluorescence.

Благодаря перспективности применения порфиринов в таких областях, как диагностика и лечение злокачественных новообразований, кожных и глазных болезней, важнейшей проблемой является исследование физико-химических свойств и биологической активности новых порфиринсодержащих объектов, в частности водорастворимого производного хлорофилла – хлорина e₆ (Хе₆), который относится к группе фотосенсибилизаторов (ФС) второго поколения, более эффективных и безопасных по сравнению с ФС первого поколения. Получают обычно Хе₆ в результате анаэробного щелочного гидролиза феофорбида *a*, образующегося, в свою очередь, при обработке хлорофилла *a* концентрированными кислотами, в результате чего происходит удаление из молекулы феофорбида *a* иона магния и отщепление этерифицирующего спирта.

Хе₆ – нетоксичный ФС и одновременно противораковый иммуномодулятор, сильно активирующий систему клеточного иммунитета и, особенно, клетки-киллеры, распознающие и уничтожающие опухолевые клетки. Он обладает следующими спектральными и энергетическими характеристиками: максимум поглощения Хе₆ находится в области 660±5 нм, что соответствует области наибольшей оптической прозрачности для биологических тканей, а квантовый выход синглетного кислорода достигает 0.7 [1, 2]. Три карбоксильные

группы обеспечивают молекуле Xe_6 гидрофильность, эффективный транспорт и накопление в опухолевых тканях. Для Xe_6 также характерны высокая фотодинамическая активность при использовании малых доз, низкая токсичность и быстрая, в течение 24-36 часов, элиминация из организма.

В настоящее время в клинической практике в России применяется целый ряд фотосенсибилизаторов второго поколения на основе Xe_6 . Среди них можно отметить, например, «Фотодитазин» - смесь ди-N-метил-D-глюкозаминовых комплексов хлорина e_6 , хлорина r_6 и пурпуринов 7 и 18 (разработан компанией VETA-GRAND CO, Россия), «Радахлорин» (ООО «РАДАФАРМА», Россия), представляющий собой смесь натриевых солей хлорина e_6 , хлорина r_6 , пурпурина 5, «Фотолон» - молекулярный комплекс хлорина e_6 с низкомолекулярным поливинилпирролидоном (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), «Фоскан» (производство «Biolitec AG», Германия) - мезо-тетра-(гидроксифенил)-хлорина, синтезированный Боннет в Великобритании в 1989 г. Для них характерны различные физико-химические и фармакологические свойства, а так же различная коммерческая стоимость. Однако данные препараты имеют высокую степень фототоксичности, связанную с высоким квантовым выходом синглетного кислорода, образующегося под действием света при проведении ФДТ. Кроме того, хлорин e_6 имеет ряд недостатков, которые ограничивают его широкое потребление, например, небольшой срок хранения и потерю оптических свойств, выведение из организма в течение 48 и более часов. Поэтому поиски других, более эффективных лекарственных препаратов и способов их получения в настоящее время продолжаются. Так, например, сейчас нет или недостаточно информации о комплексообразовании и образовании агрегированных состояний Xe_6 с высокомолекулярными соединениями, такими как поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), бычий сывороточный альбумин (БСА), хорошо себя зарекомендовавшими в качестве вспомогательных веществ в различных лекарственных средствах. Поэтому, с целью создания новых лекарственных средств для фотодинамической терапии исследованы оптическое поглощение и фотолюминесценция различных супрамолекулярных систем на основе хлорина e_6 .

Материалы и методы исследования. В процессе работы были изучены спектральные свойства (оптическое поглощение и фотолюминесценция) супрамолекулярных систем на основе Xe_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в различных вспомогательных веществах (поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), бычий сывороточный альбумин (БСА), хитозан, тритон X-100 (ТХ-100), гексаметафосфат натрия (ГМФ), полидиметилдиаллиламмония хлорид (ПДДА).

Спектры оптического поглощения (220-900 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 «Льюмэкс». Длина волны возбуждения составляла 410 нм. Все измерения проводили при комнатной температуре в стандартных кварцевых кюветках К10 с длиной оптического пути 1 см.

Результаты и выводы. Спектр поглощения хлорина e_6 (см. рис. 1) в видимой области спектра характеризуется наличием высокоинтенсивной полосы Core (Soret) с $\lambda = 403$ нм, характерной для всех порфиринов [3], наличием плато в интервале длин волн $\lambda = 450-615$ нм с небольшими пиками в области 504 нм, 533 нм и 599 нм, а также явно выраженным пиком с $\lambda = 653$ нм, что практически совпадает с данными по спектрам поглощения хлорина e_6 , представленными в литературе [4-6]. Следует заметить, что смещение спектра хлорина e_6 в длинноволновую область позволяет повысить проницаемость тканей для видимого света и снизить поглощение света гемоглобином крови в области 500-600 нм, что играет существенную роль для повышения эффективности ФДТ.

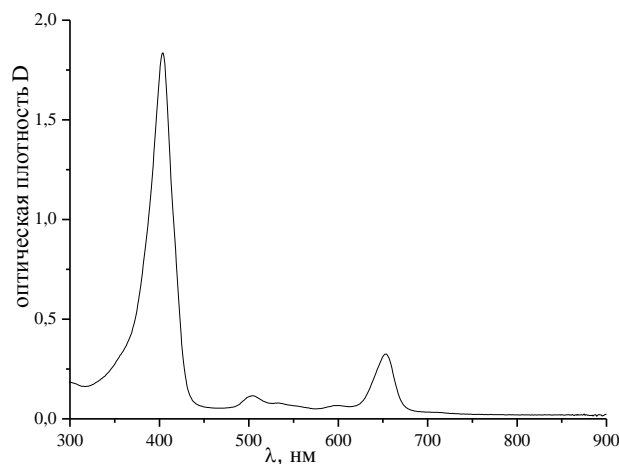


Рисунок 1 – Спектр оптического поглощения водного раствора Xe_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ М)

При изучении спектральных свойств всех представленных супрамолекулярных систем на основе хлорина e_6 не было обнаружено "голубого" сдвига в области пика Сорэ (см. рис. 2). Согласно представлениям о спектральных сдвигах в биополимерах [5, 7], "голубой" сдвиг связан с переходом хромофора в более полярную среду, в нашем случае – полярный растворитель воду. Отсутствие "голубого" сдвига в области пика Сорэ свидетельствует об одинаковой гидрофобности всех супрамолекулярных систем, подобной гидрофобности хлорина e_6 .

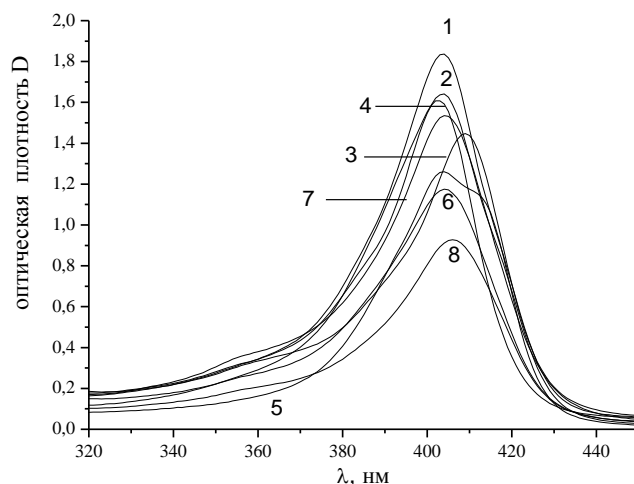


Рисунок 2 – Спектры оптического поглощения супрамолекулярных систем на основе He_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ M) с различными вспомогательными веществами в области пика Сорэ: 1. He_6 в водном растворе, 2. He_6 -ГМФ, 3. He_6 -БСА, 4. He_6 -хитозан, 5. He_6 -ПЭГ, 6. He_6 -ПДДА, 7. He_6 -ТХ-100, 8. He_6 -ПВП

На рисунке 3 представлены спектры оптического поглощения супрамолекулярных систем на основе He_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ M) в различных вспомогательных веществах в области Q-полосы. При сравнении полученных спектров со спектром поглощения He_6 выявлено, что при добавлении хитозана, ПДДА, ПВП, тритон ТХ-100, БСА к He_6 максимум поглощения длинноволновой Q-полосы ($\lambda = 653$ nm) претерпевает батохромный сдвиг (1-13 nm), тогда как в системах He_6 с ПЭГ и ГМФ наблюдается гипсохромное смещение соответствующего максимума Q-полосы (1-14 nm). Максимум поглощения Q-полосы меняется в ряду ПЭГ (639 nm) < ГМФ (652 nm) < хитозан (654 nm) < ПДДА (659 nm) < ПВП (663 nm) < ТХ-100 (665 nm) < БСА (666 nm). Симбатно меняется и максимум полосы флуоресценции. Смещение максимума поглощения в красную область может свидетельствовать том, что при проведении фотодинамической терапии с системами, имеющими в качестве вспомогательных веществ ПДДА, ПВП, тритон ТХ-100 и БСА существует большая вероятность поглощения проникающего света и большие перспективы по проникновению данных систем через ткани по сравнению с He_6 .

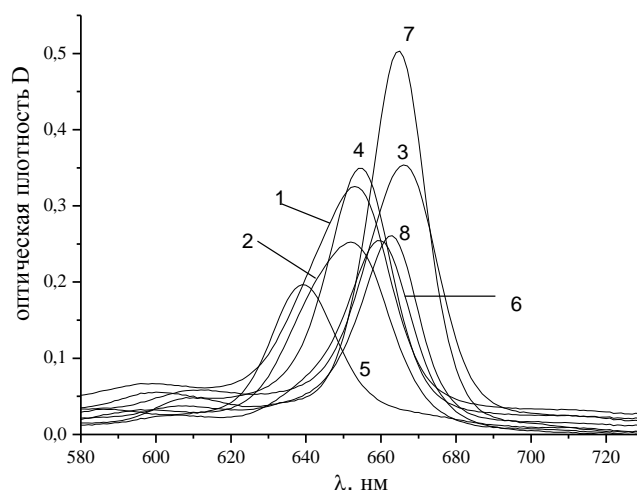


Рисунок 3 – Спектры оптического поглощения супрамолекулярных систем на основе He_6 ($2 \cdot 10^{-5}$ M) с различными вспомогательными веществами: 1. He_6 в водном растворе, 2. He_6 -ГМФ, 3. He_6 -БСА, 4. He_6 -хитозан, 5. He_6 -ПЭГ, 6. He_6 -ПДДА, 7. He_6 -ТХ-100, 8. He_6 -ПВП

Спектральные изменения в области Q-полосы, связанные с батохромным смещением длинноволновой полосы поглощения сенсibilизатора и существенным уменьшением полуширины, также свидетельствуют о дезагрегации молекул хлорина e_6 , взаимодействии их со вспомогательными веществами в растворах и

образовании молекулярного комплекса. Подтверждением этого является появление полосы молекулярного комплекса порфирина с тритоном TX-100, БСА и ПВП при 615 нм. Подтверждением разрушения агрегатов порфиринов и переход сенсibilизатора в молекулярные ассоциаты, а в дальнейшем, возможно, и молекулярные комплексы с такими вспомогательными веществами, как ПЭГ, ПДДА и ГМФ является также исчезновение поглощения в области 680-700 нм, характерного для агрегатов порфиринов [8].

Следует отметить, что спектрально-флуоресцентные характеристики системы хитозан – хлорин e_6 остаются практически неизменными по сравнению с подобными характеристиками водного раствора He_6 , что, объясняется, возможно, агрегацией красителя в растворе и уменьшением фотохимической активности фотосенсibilизатора.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования спектрально-флуоресцентных характеристик различных супрамолекулярных систем на основе хлорина e_6 позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших исследований для поиска новых сенсibilизаторов в фотодинамической терапии. Выводы, сделанные в работе, позволяют в перспективе разработать метод управляемой агрегации для создания лекарственных препаратов для ФДТ, прогнозировать их фотодинамическую активность и целенаправленно исследовать только предположительно эффективные композиции супрамолекулярных систем.

Список литературы / References:

1. 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.

2. Пархоц М.В., Галиевский В.А., Стасhevский А.С., Трухачева Т.В., Джагаров Б.М. Динамика и эффективность фотосенсibilизированного образования синглетного кислорода хлорином e_6 : влияние pH раствора и поливинилпирролидона. *Оптика и спектроскопия*, 2009, т. 107, № 6, с. 1026-1032. [Parkhats M.V., Galievsky V.A., Stashevsky A.S., Trukhacheva T.V., Dzhagarov B.M. Dynamics and efficiency of the photosensitized singlet oxygen formation by chlorin e_6 : the effects of the solution pH and polyvinylpyrrolidone. *Optics and Spectroscopy*, 2009, vol. 107, no. 6, pp. 974-980. (In Russ.)]

3. Гуринович Г.П., Севченко А.И., Соловьев К.Н. Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. *Минск, Наука и техника*, 1978, 323 с. [Gurinovich G.P., Sevchenko A.I., Solov'ev K.N. Spectroscopy of a chlorophyll and related compounds. *Minsk: Science and equipment*, 1978, 323 p. (In Russ.)]

4. Visheratina A.K., Martynenko I.V., Orlova A.O., Maslov V.G., Baranov A.V., Fedorov A.V. Energy transfer efficiency in quantum dot/chlorin e_6 complexes. *Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging IV*, edited by Quincy Brown, SPIE-OSA Proceedings (Optical Society of America), 2015, vol. 9537, paper 95372C.

5. Федорук С.Л., Трухачева Т.В., Соколов С.Н., Фроленков К.А., Хейдоров В.П. Изучение спектральных свойств диметилового эфира хлорина e_6 : в присутствии поливинилпирролидона. *Вестник фармации*, 2014, т. 65, № 3, с. 82-88. [Fiedaruk S.L., Trukhacheva T.V., Sakalov S.N., Fralenkov K.A., Kheidorov V.P. The study of optical properties of dimethylester of chlorine e_6 in the presence of polyvinylpyrrolidone. *Vestnik Farmacii*, 2014, vol. 65, no. 3, pp. 82-88. (In Russ.)]

6. Плавский В.Ю., Мостовников В.А., Мостовникова Г.Р., Третьякова А.И., Микулич А.В. Спектрально-люминесцентные свойства комплексов хлорина e_6 и малатдегидрогеназы. *Журн. Прикл. спектр.*, 2004, т. 71, № 6, с. 749-758. [Plavskii V.Yu., Mostovnikov V.A., Mostovnikova G.R., Tret'yakova A.I., Mikulich A.V. Spectral-luminescent properties of chlorine e_6 and malate dehydrogenase complexes. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2004, vol. 71, no. 6, pp. 818-823. (In Russ.)]

7. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. *Киев, Наукова думка*, 1981, с. 208. [Demchenko A.P. Ultra-violet spectroscopy and structure of proteins. *Kiev, Naukova dumka*, 1981, pp. 208. (In Russ.)]

8. Головина Г.В., Ольшевская В.А., Варгин В.В., Кузьмин В.А., Шевелев А.Б. Исследования растворимости производных фотосенсibilизаторов порфиринового ряда in vivo в условиях образования мультимолекулярных агрегатов и комплексов с альбумином. *Здоровье населения и среда обитания*, 2013, № 12, с. 41-43. [Golovina G.V., Ol'shevskaya V.A., Vargin V.V., Kuzmin V.A., Shevelev A.B., Solubility of porphyrin derivatives in vivo affected by aggregate formation and complex formation with serum albumin. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*, 2013, no. 12, pp. 41-43. (In Russ.)]