

ФОТОХИМИЯ  
И МАГНЕТОХИМИЯ

УДК 541.64:541.14:539.199

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ И ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА  
НА ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ХЛОРИНА е6 В РЕАКЦИИ  
ОКИСЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА

© 2019 г. А. Б. Соловьева<sup>a,\*</sup>, О. В. Хасанова<sup>a</sup>, Н. А. Аксенова<sup>a,b</sup>, А. В. Черняк<sup>c</sup>, В. И. Волков<sup>c</sup>,  
В. А. Тимофеева<sup>a</sup>, П. С. Тимашев<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Российская академия наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, Москва, Россия

<sup>b</sup> Институт регенеративной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

<sup>c</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики, Москва, Россия

\*e-mail: anna.solovieva@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2018 г.

После доработки 12.12.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Установлено влияние амфифильного полимера – поли-N-винилпирролидона (ПВП) и полисахаридов (ПС) – альгината натрия (АН) и гиалуроновой кислоты (ГК) на фотосенсибилизирующую активность хлорина е6 (Хн\_е6) в реакции окисления триптофана, которая рассматривается как модельная при поиске наиболее эффективных лекарственных форм фотосенсибилизатора для антимикробной фотодинамической терапии. Показано, что исходная фотосенсибилизирующая активность Хн\_е6, которая характеризуется эффективной константой  $k_{\text{eff}}$  скорости окисления триптофана, возрастает при формировании в водных растворах двойных систем, Хн\_е6 – ПВП и Хн\_е6 – АН (ГК), и в большей степени для тройных систем, Хн\_е6 – ПВП – АН и Хн\_е6 – ПВП – АН – ГК. Сделан вывод, что такое повышение активности связано с процессами дезагрегации ассоциатов молекул фотосенсибилизатора (ФС), исходно существующих в водных растворах, вследствие образования комплексных связей между молекулами ФС и фрагментами вводимых в раствор полимеров. Справедливость данного заключения для рассматриваемых в данной работе двойных и тройных систем подтверждена совокупными данными по электронным спектрам поглощения и спектрам флуоресценции хлорина е6 в отсутствие и при введении полимеров (ПВП, АН и ГК) в реакционную систему, а также данными <sup>1</sup>H-ЯМР исследования. С учетом последних данных, согласно которым каждый из полимерных компонентов (ПВП, АН и ГК) влияет на активность ФС, а непосредственное взаимодействие ПВП с ПС в ПМР спектрах практически не проявляется, тройные фотосенсибилизирующие системы в водной среде формируются при образовании взаимопереплетающихся полимерных цепей ПВП-ПС в условиях воздействий локальных гидродинамических потоков и при последующем образовании комплексных связей молекул ФС с фрагментами обоих полимеров.

**Ключевые слова:** хлорин е6, поли-N-винилпирролидон, хитозан, фотоокисление триптофана

**DOI:** 10.1134/S004445371911030X

В связи с наблюдающимся в последние годы ростом резистентности к антибиотикам возникают трудности с использованием целых групп антибактериальных препаратов для лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов, и довольно незначительные инфекции могут вновь стать неизлечимыми, как это было до открытия антибиотиков. Фактически, настоящее время было названо “концом антибиотической эры” [1]. Альтернативой антибиотикотерапии может оказаться антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ) – фотодинамическая инактивация пато-

генных микроорганизмов, которая заключается в окислительной деструкции патогенных клеток при воздействии лазерного излучения на такие клетки после предварительной обработки пораженных тканей фотосенсибилизатором (ФС). Наиболее активная и нетоксичная группа ФС – порфириновые фотосенсибилизаторы (ПФС), представляющие собой азотсодержащие макроциклические соединения – порфирины и их частично гидрированные аналоги – хлорины. ФС способны передавать энергию фотовозбуждения растворенному в клетках и тканях молекулярному кислороду, переводя его в синглетное <sup>1</sup>O<sub>2</sub> со-

стояние [2]. Генерируемый синглетный кислород является активным окислителем, разрушающим патологические (онкологические, инфицированные) участки тканей, воздействуя на клеточную стенку, нуклеиновые кислоты и мембранные белки бактерий [3]. Показано, что различные типы фотосенсибилизаторов, включая порфирины, фталоцианины и хлорины, эффективны *in vitro* против бактерий (включая резистентные к лекарственным средствам штаммы), дрожжей, вирусов [4]. Эффективность АФДТ продемонстрирована *in vivo* против локализованных инфекций на животных моделях [5]. Одно из основных преимуществ антимикробной ФДТ перед терапией с использованием антибиотиков заключается в окислительной деструкции микробных клеток-мишеней, что исключает выработку организмом устойчивости к последующим циклам фотодинамических воздействий [6]. В отличие от антибиотиков противомикробное действие ФДТ не убывает со временем. У патогенных микроорганизмов не развивается “устойчивости” к ФДТ, что важно при лечении хронических инфекционных процессов. Бактерицидный эффект метода ФДТ лимитируется зоной лазерного облучения сенсibilизированных тканей, что позволяет избежать при местной ФДТ генерализации побочных эффектов, наблюдаемых при применении антибиотиков [7]. АФДТ эффективен против лекарственно-устойчивых штаммов бактерий, и до сих пор не появилось никакого сообщения о том, что фотодинамическая обработка приводит к резистентности [8, 9].

В последние годы появился ряд работ, посвященных применению антибактериальной фотодинамической терапии (АФДТ) при лечении гнойных заболеваний мягких тканей, в частности трофических язв с использованием фотосенсибилизаторов хлоринового ряда. Хлорины оказывают положительное воздействие на течение раневого процесса, что проявляется выраженным антибактериальным действием, ускорением очищения ран от гнойно-некротического детрита и сокращением сроков заживления раневых дефектов [10, 11].

Для повышения эффективности АФДТ фотосенсибилизаторы используют в составе конъюгатов, то есть при связывании ФС с биологически-активными фрагментами нативных или синтетических систем (антителами, аминокислотами, фрагментами полимеров и биополимеров) [12–17]. Полагается, что в подобных конструкциях полимер уменьшает связывание ФС с нормальными тканями, повышая тем самым биодоступность и эффективность АФДТ [10, 15]. Формируемые полимерные комплексы могут адсорбироваться на липидном бислое и встраиваться в мембраны клеток патологических тканей, облегчая их непосредственное фотоиндуцированное

разрушение и последующий транспорт в ткани разрушающих их реагентов. В частности, в [18] описано преодоление резистентности раковых клеток к противоопухолевым препаратам при фотодинамической терапии с использованием солиобилизованного плюроником F-127 хлорина еб и противоопухолевого антибиотика доксирубицина. Было показано, что в условиях слабого лазерного облучения в раковых клетках усиливалось поглощение доксирубицина через частично деструктированную продуцируемым синглетным кислородом клеточную мембрану.

Ранее нами [19] было показано, что некоторые амфифильные полимеры (АП), в том числе плюроник F-127 и поливинилпирролидон образуют комплексы с ПФС. Такие комплексы оказались активнее исходных ПФС как в модельных процессах фотоокисления, так и в 10–30 раз более эффективные при фотодинамическом и, осложненных ожогов, сосудистых воспалительных заболеваний.

Эффективность антибактериальной фотодинамической терапии труднозаживающих гнойных ран возрастает при одновременном воздействии на рану некоторых биологически активных молекул – протеолитических ферментов, антиоксидантов [20, 21]. Бактерицидные биодеградируемые покрытия на основе полисахаридов (ПС) часто применяются для облегчения состояния больных при лечении длительно незаживающих ран [22]. В работе [23] были представлены наши результаты по ФДТ модельных ран у крыс при использовании в качестве ФС комплексов хлорина еб с поливинилпирролидоном и хитозаном. Было показано, что при наличии в системе хитозана усиливаются антибактериальные противовоспалительные и прорегенераторные эффекты комплекса “Хн\_еб–ПВП”. Такой результат отчасти был неожиданным, поскольку в модельных условиях – при фотоиндуцированном окислении в водном растворе триптофана хитозан уменьшал фотокаталитическую активность комплекса “Хн\_еб–ПВП”. Поэтому были инициированы исследования новых композиций “Хн\_еб–ПВП–ПС”, в которых молекулы ПС не подавляли бы собственную фотосенсибилизированную активность ФС в модельных процессах окисления триптофана. С этой точки зрения потенциальный интерес для АФДТ могут представлять в качестве ПС компонентов в ФС-АП-ПС композициях и другие, помимо хитозана, природные полисахариды, проявляющие противовоспалительные, иммуностропные, противоопухолевые, противомикробные, противовирусные и другие свойства [24]. Однако необходимой стадией таких разработок является поиск и исследование указанных композиций с растительными ПС, прежде всего, с альгинатом натрия (АН) и гиалуроновой кислотой (ГК), которые широко используются в насто-

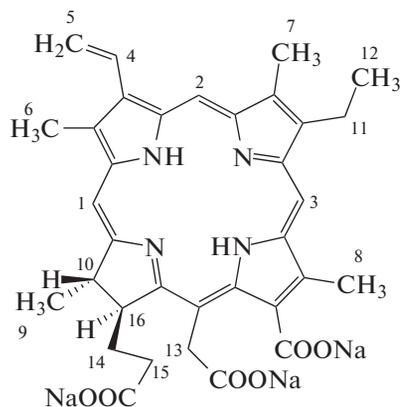


Рис. 1. Тринатриевая соль хлорина е6.

ящее время в клинической практике, так как обладают хорошей ранозаживляющей способностью и ускоряют реабилитацию после травм, хирургических операций, останавливают местные кровотечения и стимулируют заживление язвенных поражений слизистой оболочки желудка и кишечника [24–27]. Результаты такого поиска с введением в водную среду при исследовании фотосенсибилизированного окисления триптофана помимо комплекса Хн\_е6-ПВП указанных ПС – альгината натрия (АН) и гиалуроновой кислоты (ГК) представлены в данной работе.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались фотосенсибилизатор – хлорин е6, (Frontier Scientific Великобритания) (рис. 1). Водорастворимость хлорина е6 достигалась использованием его в виде тринатриевой со-

ли. Порошок хлорина е6 (0.033 г) растворяли в 5 мл водного раствора гидрокарбоната натрия с концентрацией  $2 \times 10^{-2}$  М. В качестве амфифильного полимера использовали поли-N-винилпирролидон (ПВП) ( $M_w 40000$ ) (Dr. Theodor Schuchardt, Германия) (рис. 2), в качестве полисахаридов использовали альгинат натрия (АН) ( $M_w 80000$  до 100000) и гиалуроновую кислоту (ГК) ( $M_w 800000$ -900000, Sigma-Aldrich, США) (рис. 2). Для исследования фотокаталитической активности ПФС использовали модельную реакцию фотоокисления триптофана (Реахим, Россия).

**Фотоокисление триптофана в присутствии порфириносодержащих систем.** Реакцию фотоокисления триптофана (Трп) в водной среде в присутствии хлорина и его комплексов с полимерами осуществляли следующим образом. К раствору триптофана в воде ( $1 \times 10^{-4}$  М) добавляли водный раствор Хн\_е6 ( $5 \times 10^{-6}$  М) и полимеров – ПВП, АН, ГК. Полученную смесь перемешивали (магнитная мешалка “Heidolph”, скорость, 650 об./мин) в течение 10 минут, затем включили освещение реакционной смеси светодиодным аппаратом АФС (производства ООО “Полироник”) с длиной волны  $\lambda = 400$  нм при мощности 210 мВт и начинали отсчет времени реакции, сохраняя режим перемешивания. Концентрацию альгината натрия и гиалуроновой кислоты в двойных и тройных системах варьировали от  $1 \times 10^{-6}$  до  $5 \times 10^{-5}$  моль/л, при этом концентрация ПВП изменялась от  $3 \times 10^{-5}$  до  $5 \times 10^{-4}$  моль/л. Следует отметить, что порядок прибавления полимеров не влиял на эффективную константу скорости процесса в тройных системах. За кинетикой процесса следили по изменению концентрации триптофана, которую определяли по

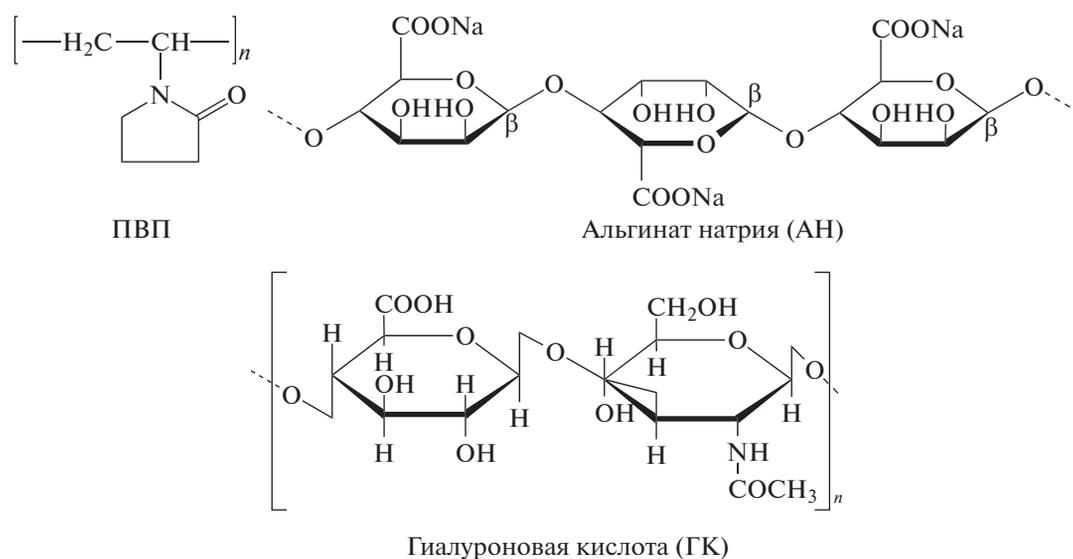
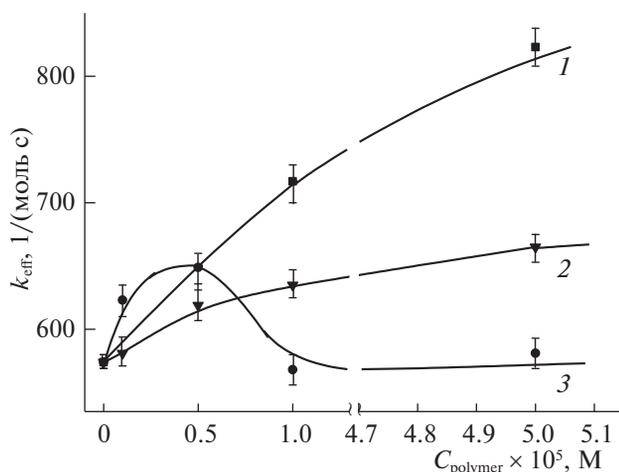


Рис. 2. Структура используемых полимеров.



**Рис. 3.** Зависимости эффективной константы скорости фотоокисления триптофана в присутствии систем Хн\_е6-ПВП (1), Хн\_е6-АН (2), Хн\_е6-ГК (3) от концентрации полимеров.  $C_{\text{Cl}_e6} = 5.0 \times 10^{-6}$  моль/л,  $C_{0\text{Tr}} = 1.0 \times 10^{-4}$  моль/л.

уменьшению оптической плотности полосы поглощения ( $\lambda = 280$  нм) в УФ-спектре триптофана, окисляющегося до эндоперекиси триптофана [28]. УФ- и электронные спектры поглощения (ЭСП) растворов снимали на спектрофотометре Cary50 (Varian, Австрия). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian, Австрия).

Для сопоставительной оценки активности порфириносодержащих систем в тестовой реакции фотоокисления триптофана в водной среде вводили эффективную удельную константу скорости  $k_{\text{eff}}$ , определяемую по начальному линейному участку кинетической зависимости  $C_i = C_i(t)$ :

$$k_{\text{eff}} = (1/t) \ln(C_{0i}/C_i)/C_{\text{PS}}, \quad (1)$$

где  $C_{0i}$  – начальная концентрация субстрата  $i$ ,  $C_i(t)$  – концентрация субстрата  $i$  на момент времени  $t$  (с) фотоокисления,  $C_{\text{PS}}$  – концентрация фотосенсибилизатора. Погрешность определения  $k_{\text{eff}}$  составляла 10%. Погрешность определялась на основе кинетических данных, при которых каждое значение  $C_i(t)$  устанавливалось как среднее значение пяти измерений.

<sup>1</sup>H ЯМР-спектры регистрировали с использованием спектрометра Bruker AVANCE III 500 МГц. В стандартные ампулы (с наружным диаметром 5 мм) помещали образцы, растворов Хн\_е6, полимеров и систем Хн\_е6–ПВП (АН, ГК), Хн\_е6–ПВП–АН (ГК) (в соотношении 1 : 1 по массе) в D<sub>2</sub>O (Aldrich, 99 атом. % D). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР были получены при температуре  $20.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$  и рабочей частоте прибора 500 МГц. Частоты сдвигов ЯМР калибровали с использовани-

ем остаточных сигналов протонов из дейтерированной воды (4.71 м.д.).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Системы ФС-полимер

На рис. 3 представлены зависимости эффективной константы скорости реакции фотоокисления  $k_{\text{eff}}$  триптофана, катализируемой хлорином е6 в присутствии ПВП, АН и ГК (рис. 3), от концентрации каждого из этих полимеров. Как следует из рис. 3, наибольшее возрастание  $k_{\text{eff}}$  реализуется для системы Хн\_е6–ПВП. В частности, при  $C_{0\text{PVP}} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л величина  $k_{\text{eff}}$  возрастает на 40%, что мы связываем, как указывалось выше с образованием комплексов ПВП–ПФС и, как следствие, дезагрегацией ассоциатов ПФС, исходно существующих в водном растворе [29–31]. Для систем Хн-АН и Хн\_е6-ГК было зафиксировано меньшее возрастание  $k_{\text{eff}}$  – на 15 и 13% при  $C_{0\text{АН}} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л и  $C_{0\text{ГК}} = 5 \times 10^{-6}$  моль/л, соответственно. При этом зависимость  $k_{\text{eff}} = k_{\text{eff}}(C_{0\text{ГК}})$  убывает при концентрациях  $C_{0\text{ГК}}$  более  $5 \times 10^{-6}$  моль/л и выходит на постоянное значение, равное величине  $k_{\text{eff}}(C_{0\text{ГК}})$  при  $C_{0\text{ГК}} = 0$ .

Здесь, прежде всего, следует обсудить сам факт увеличения  $k_{\text{eff}}$  при введении в реакционную среду молекул полисахаридов, поскольку, как известно [32], другой полисахарид – хитозан (ХТЗ) приводил к уменьшению фотосенсибилизируемой активности ФС при окислении триптофана в подкисленном водном растворе. В [32] было показано, что снижение активности ФС в присутствии ХТЗ связано с образованием агрегатов молекул ФС, инициируемом взаимодействием протонируемых аминогрупп полисахаридов с ФС. Но в структуре молекул АН и ГК первичные аминогруппы отсутствуют. Следует указать, что они отсутствуют в структуре еще одного полисахарида – в структуре карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), введение которой в реакционную водную среду приводило к повышению эффективной константы фотосенсибилизируемого окисления триптофана [33]. В силу указанных причин, а также приводимых на рис. 3 зависимостей, АН и ГК не только не инициируют образование ассоциатов ФС, но и обуславливают дополнительную (наряду с АП) дезагрегацию таких ассоциатов, исходно существующих в водных растворах. Справедливость этого заключения будет подтверждена ниже совокупными данными по электронным спектрам поглощения (ЭСП) и спектрам флуоресценции хлорина е6 в отсутствии и присутствии полимеров (ПВП, АН и ГК), а также данными ПМР исследования.

В связи с рис. 3, возникают также вопросы о причинах немонотонности зависимости 3. Такой

характер зависимости  $k_{\text{eff}} = k_{\text{eff}}(C_{\text{ОГК}})$  естественно связать с природой ГК как основным полисахаридным компонентом синовиальной жидкости, используемой в организме для смазки подвижных сочленений костей. Известно, что протяженные макромолекулы ГК, прежде всего, из-за наличия в структуре вторичных аминогрупп, посредством которых формируются межмолекулярные и внутримолекулярные связи, приобретают в водных растворах “червеобразные” спиралевидные структуры типа закрученной ленты, рыхлого клубка [26]. В общем, в разбавленных растворах полимеров при наличии гидродинамических потоков свернутые в спираль молекулы “расширяются” при движении. При увеличении концентрации червеобразные молекулы могут начать объединяться в цепи, образуя при этом динамическую нестационарную пространственную сеть, что обуславливает резкое возрастание вязкости таких водных растворов с концентрацией [34].

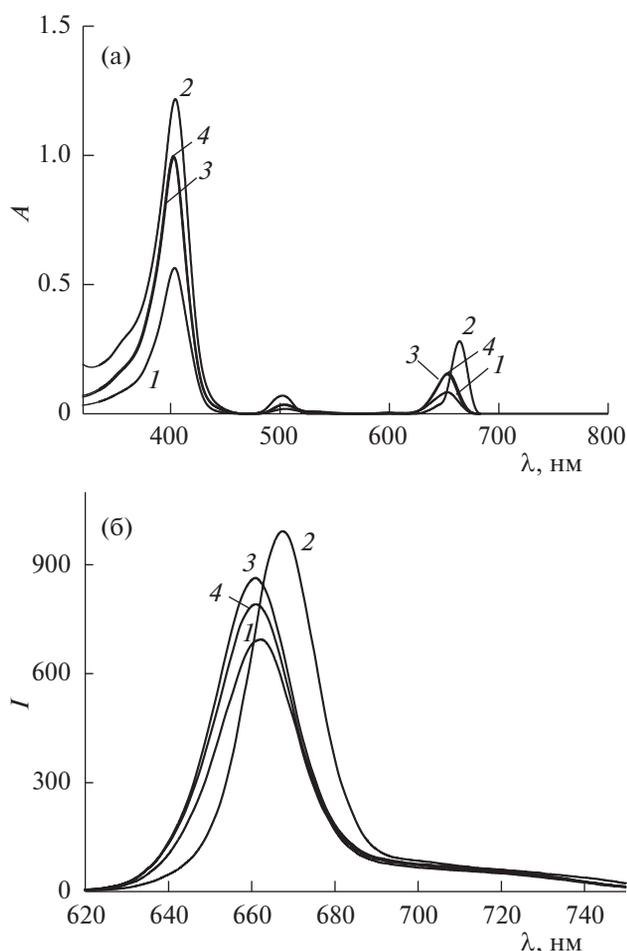
Необходимо указать, что протяженные макромолекулы АН тоже могут образовывать, как и макромолекулы ГН, но в меньшей степени выраженности, трехмерную структуру типа “молекулярного сита” [35] за счет образования водородных связей между карбоксильными и гидроксильными группами. Поэтому можно полагать, что в присутствии АН и ГК в водной среде молекулы ФС оказываются встроенными в формируемые макромолекулами АН и ГК подвижные структуры. При этом за счет слабых ион-дипольных взаимодействий между боковыми карбоксилсодержащими заместителями в молекуле ФС и подвижными гидрофильными фрагментами макромолекул полисахаридов АН и ГК через структурные перестройки гидратных оболочек могут опосредованно формироваться “на время” координационные связи, которые влияют на дезагрегацию ассоциатов ФС, определяющую некоторое возрастание величин  $k_{\text{eff}}$ . Причем фрагменты макромолекул ГК при концентрациях  $C_{\text{ОГК}}$  до  $2 \times 10^{-6}$  моль/л оказываются более эффективными при таком опосредствованном связывании с фрагментами Хн\_еб для дезагрегации их ассоциатов, как это следует из рис. 3. Однако при повышении концентрации ГК выше указанной величины начинают в большей мере проявляться (в условиях эксперимента, при максимальной скорости вращения магнитной мешалки) эффекты, инициированные локальными гидродинамическими потоками повышения вязкости ГК. В этих случаях уменьшается вероятность формирования указанного типа координационных связей фрагментов ГК с молекулами ФС, и процессы дезагрегации ассоциатов ФС подавляются. Как следует из рис. 3, уже при  $C_{\text{ОГК}} \approx 1 \times 10^{-5}$  моль/л величина  $k_{\text{eff}}$  определяется только передачей син-

глетного кислорода на молекулу субстрата без участия в процессе ГК. Именно этими обстоятельствами и определяется характер зависимости 3 на рис. 3.

Как указывалось выше, на дезагрегацию ФС, определяющую повышение констант скорости  $k_{\text{eff}}$  окисления триптофана в присутствии полимеров ПВП, АН и ГК, указывают изменения в электронных спектрах поглощения и спектрах флуоресценции хлорина еб в присутствии ПВП, АН и ГК (рис. 4а,б). Здесь, прежде всего, имеется в виду возрастание интенсивности основной полосы (400 нм) в ЭСП (~ в 2.4 и 1.6 раза для ПВП и ПС, соответственно) и полосы флуоресценции (~ в 1.5, 1.3 и 1.2 раза для ПВП и АН и ГК, соответственно) при введении в водный раствор Хн\_еб указанных полимеров. Приводимые спектры были получены при концентрациях полимеров, при которых наблюдаются максимальные значения эффективной константы фотоокисления триптофана (см. рис. 3). Необходимо также указать, что в спектрах хлорина в присутствии ПВП наблюдается не только рост интенсивности полос, но и длинноволновый сдвиг на 5–10 нм, что свидетельствует об изменении микроокружения молекул ФС [31], т.е. о непосредственном взаимодействии фрагментов хлорина еб с фрагментами ПВП. Поэтому можно полагать, что взаимодействие между Хн\_еб и фрагментами ПВП приводит к более интенсивной дезагрегации ФС (наибольший рост интенсивности полос в спектрах) по сравнению с системами Хн\_еб-АН и Хн\_еб-ГК, когда в силу указанных выше причин может реализоваться лишь опосредованное, не прямое воздействие макромолекул АН и ГК на дезагрегацию ассоциатов Хн\_еб.

Независимая информация о формирующихся координационных связях в системах Хн\_еб-ПВП, Хн\_АН и Хн\_еб-ГК была получена на основе данных  $^1\text{H}$ -ЯМР. Ранее [29] при сравнении ПМР-спектров ПВП в отсутствие и в присутствии хлорина еб было установлено образование водородных связей и наличие гидрофобных взаимодействий в системе хлорин еб-ПВП (в присутствии хлорина наблюдались хим. сдвиги сигналов протонов метиленовых групп гидрофильных пирролидоновых фрагментов ПВП в слабом поле).

В данной работе было зафиксировано изменение ПМР-спектров хлорина еб в присутствии ПВП и полисахаридов – АН и ГК. В присутствии полимеров в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР хлорина наблюдается сдвиг ( $\Delta$ ) сигналов мезо-протонов цикла при 9.21 м.д., 9.04 м.д. и 6.94 м.д. на  $\Delta = 0.4, 0.27$  и 1.05 м.д. в присутствии ПВП, на  $\Delta = 0.16, 0.08, 0.3$  м.д. для АН, и на  $\Delta = 0.24, 0.46$  м.д. для ГК в сильное поле. Сдвиг периферийных метильной группы при 1.14 м.д. на  $\Delta = 0.31$  м.д. для ПВП, на  $\Delta = 0.13$  м.д. в случае АН и на  $\Delta = 0.15$  м.д. для ГК



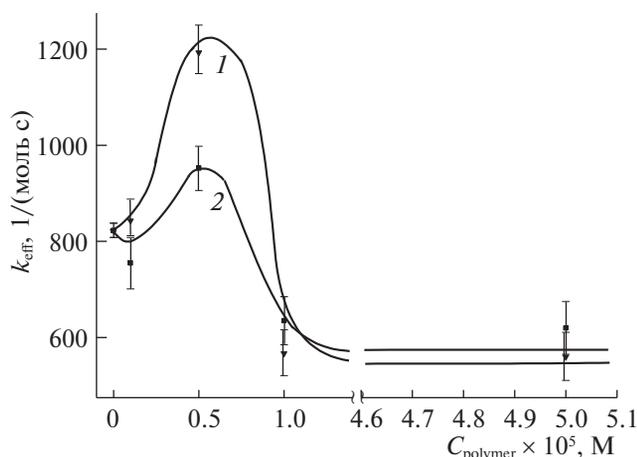
**Рис. 4.** Спектральные характеристики систем Хн<sub>е6</sub> (1), Хн<sub>е6</sub>-ПВП (2), Хн<sub>е6</sub>-АН (3) и Хн<sub>е6</sub>-ГК (4): электронные спектры поглощения (а) и спектры флуоресценции (б) при  $C_{Cl_{e6}} = 5.0 \times 10^{-6}$  моль/л,  $C_{PVP} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л,  $C_{AN} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л и  $C_{GA} = 5 \times 10^{-6}$  моль/л.

в сильное поле, метиновой группы при 6.73 м.д. на  $\Delta = 0.23, 0.56$  м.д. в присутствии АН и ГК в зону сильных полей. Сдвиги остатков пропионовой кислоты при 4.46, 2.66 и 2.82 м.д. на  $\Delta = 0.02, 0.08$  и 0.04 м.д. для ПВП, на  $\Delta = 0.04, 0.14$  и 0.08 м.д. в присутствии АН, на  $\Delta = 0.06, 0.16$  и 0.12 м.д. в случае с ГК в сильное поле. Это, как показано ранее в [31], свидетельствует об ослаблении взаимного влияния хлориновых циклов, т.е. свидетельствует о дезагрегации ассоциатов Хн<sub>е6</sub>. При этом изменений в ПМР спектрах АН и ГК в присутствии хлорина еб не было зафиксировано, что подтверждают высказанное выше предположение об опосредованном, не прямом воздействии макромолекул АН и ГК с хлорином еб, которое, тем не менее, проявлялось при изменении интенсивности основной полосы ЭСП и полосы спектра флуо-

ресценции хлорина еб в присутствии ПВП, АН и ГК (рис. 4а,б).

### Тройные системы

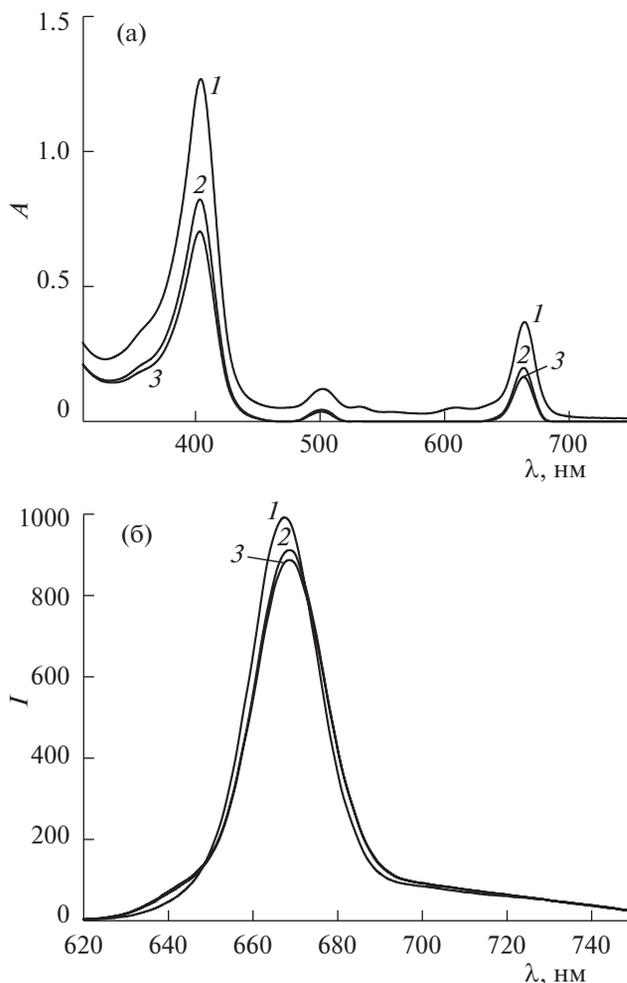
На рис. 5 представлены зависимости эффективной константы  $k_{eff}$  фотоокисления триптофана в присутствии тройных систем Хн<sub>е6</sub>-ПВП-АН (зависимость 1) и Хн<sub>е6</sub>-ПВП-ГК (зависимость 2) от концентрации полисахаридов  $C_{ps}$  при фиксированных концентрациях  $C_{Cl_{e6}} = 5.0 \times 10^{-6}$  моль/л и  $C_{PVP} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л в реакционной среде. Прежде всего, обращает внимание качественное изменение характера зависимости  $k_{eff} = k_{eff}(C_{AN})$  при наличии в реакционной среде ПВП. Если при отсутствии ПВП, т.е. при  $C_{PVP} = 0$ , мы имели для  $k_{eff}$  монотонную зависимость (зависимость 2, рис. 3), то при  $C_{PVP} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л соответствующая зависимость (зависимость 1, рис. 5) оказывается немонотонной, с выраженным максимумом, подобной зависимости  $k_{eff} = k_{eff}(C_{GA})$  как при отсутствии в среде ПВП (зависимость 3, рис. 3), так и при  $C_{PVP} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л (зависимость 2, рис. 5). При этом максимумы всех указанных немонотонных зависимостей достигаются при  $C_{ps} \approx 5.0 \times 10^{-6}$  моль/л. Как указывалось выше, немонотонный характер зависимости 3 на рис. 3 связан с особенностями червеобразной спиралевидной структуры макромолекул ГК, которые при воздействии локальных гидродинамических потоков могут принимать различные формы и объединяться в цепи. Вследствие нестационарной динамики таких образований резко возрастает вязкость таких водных растворов с увеличением концентрации макромолекул. Именно с последним фактором, реализующемся в условиях наших экспериментов при  $C_{GA} = 5 \times 10^{-6}$  моль/л, связано фиксируемое падение величины  $k_{eff}$ , представленное на рис. 3 (зависимость 3). На основе данных, представленных на рис. 5, естественно полагать, что указанный фактор проявляется и при фотосенсибилизированном окислении триптофана в системе Хн<sub>е6</sub>-ПВП-АН (рис. 5, зависимость 1) при концентрациях  $C_{AN}$ , превышающих  $C_{AN} = 5 \times 10^{-6}$  моль/л. По-видимому, при таких концентрациях АН макромолекулы ПВП ( $C_{PVP} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л) при индуцированном воздействии локальных гидродинамических потоков могут, принимая различные формы, объединяться в цепи с молекулами АН, так что вязкость формирующегося раствора этих полимеров резко возрастает, обуславливая фиксируемое падение величины  $k_{eff}$ .



**Рис. 5.** Зависимость константы скорости фотосенсибилизированного окисления триптофана в присутствии комплекса Хн\_еб-ПВП-ПС от концентраций АН (1) и ГК (2) при содержании ПВП ( $C_{PVP} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л) в реакционной среде ( $C_{Cl_{e6}} = 5.0 \times 10^{-6}$  моль/л,  $C_{0Tr} = 1.0 \times 10^{-4}$  моль/л).

Здесь следует указать, что величина фиксируемой для данной системы Хн\_еб-ПВП-АН максимальной эффективной константы  $k_{eff}$  скорости окисления триптофана превышает в 1.5 раза соответствующую величину для системы Хн\_еб-ПВП при тех же значениях концентраций хлорина еб и ПВП. Заметим при этом, что концентрация АН, вводимого в тройную систему, на порядок меньше концентрации ПВП как основного полимерного компонента. Максимальная величина константы  $k_{eff}$  скорости окисления триптофана в другой исследуемой системе — Хн\_еб-ПВП-ГК оказалась в 1.1 раза большей, нежели в системе Хн\_еб-ПВП (см. рис. 5, зависимость 2), но в 1.5 раза превосходила соответствующую величину для системы Хн\_еб-ГК (см. рис. 3, зависимость 3). Наблюдаемое возрастание константы скорости  $k_{eff}$  в рассматриваемых экспериментах по фотосенсибилизированному окислению триптофана, которое мы связывали с возрастанием степени дезагрегации ассоциатов Хн\_еб при введении в реакционную систему молекул ПС, может возрастать и вследствие не обсуждаемых здесь факторов, в частности, вследствие повышенного химического сродства субстрата (триптофана, в данном случае) к фрагментам вводимых полимеров, около которых координируются молекулы ФС.

На рис. 6 (а, б) представлены ЭСП и спектры флуоресценции двойных систем Хн\_еб-ПВП (кривые 1), а также тройных систем Хн\_еб-ПВП-АН (кривые 2) и Хн\_еб-ПВП-АН-ГК (кривые 3). Помимо проявляемого на рис. 4 некоторого снижения оптической плотности полос в ЭСП и ин-



**Рис. 6.** Спектральные характеристики систем Хн\_еб-ПВП (1) и систем Хн\_еб-ПВП-АН (2) и Хн\_еб-ПВП-ГК (3): электронные спектры поглощения (а) и спектры флуоресценции (б) при  $C_{Cl_{e6}} = 5.0 \times 10^{-6}$  моль/л,  $C_{PVP} = 5 \times 10^{-5}$  моль/л,  $C_{AN} = 5 \times 10^{-6}$  моль/л и  $C_{GA} = 5 \times 10^{-6}$  моль/л.

тенсивности флуоресценции, указывающих на происходящие в этих более сложных системах процессы дезагрегации ФС ассоциатов, в полосах поглощения и флуоресценции зафиксированы “батохромные” сдвиги (на 5–10 нм) относительно полос в спектрах чистого хлорина еб, что свидетельствует о связывании хлорина еб с ПВП в тройных системах, как это проявлялось и на спектрах, представленных на рис. 4.

О протекании процесса дальнейшей дезагрегации в тройных системах свидетельствуют данные  $^1H$  ЯМР спектров хлорина в тройных системах. В частности, в присутствии двух полимеров наблюдается дальнейший сдвиг (по сравнению с двойными системами полимер-ФС) сигналов мезо-протонов цикла для системы Хн\_еб-ГК-ПВП

– 0.2 м.д., наибольший сдвиг наблюдается для системы Хн\_еб–АН–ПВП – 0.38 м.д. Интересно, что сигналы протонов периферийных групп в тройных системах также (по сравнению с хлорином) сдвинуты в сильное поле, однако величина сдвига практически во всех случаях не превышает значений для двойных систем. Так, сдвиг  $\Delta$  для метильных групп макроцикла хлорина в присутствии ПВП составлял 0.31 м.д., в присутствии АН – 0.13 м.д., в присутствии ГК – 0.15 м.д., в присутствии и ПВП и АН – 0.32 м.д. в зону сильных полей, в случае ПВП и ГК – 0.23 м.д. в зону слабых полей. При этом в некоторых случаях величина сдвига становится отрицательной (сдвиг  $\Delta = -0.01$  в слабое поле сигналов протонов метинового фрагмента остатков пропионовой кислоты (16) в системе Хн\_еб–АН–ПВП). В частности, можно полагать, что в тройных системах протекает дальнейшая дезагрегация, в результате чего периферийные заместители начинают испытывать более сильное экранирующее влияние полимеров.

Таким образом, хотя ПС и ПВП не обладают собственной фотохимической активностью, они способны увеличивать фотокаталитическую активность хлорина еб в процессах генерации синглетного кислорода, благодаря дезагрегации порфириновых ассоциатов, в виде которых ФС обычно существуют в водных и неводных растворах. Так, АН и ГК повышают фотокаталитическую активность Хн\_еб (~ на 14%), ПВП – на 44%. Суммарный эффект возрастания константы  $k_{\text{eff}}$  скорости фотоокисления триптофана, катализируемого хлорином еб в присутствии полисахаридов и ПВП при определенном молярном соотношении компонентов, в 2 раза больше суммы эффекта от каждого полимера. При этом системы на основе альгината натрия более эффективны по сравнению с аналогичными комплексами на основе ГК. В частности в тройной системе Хн\_еб–ПВП–ГК фотокаталитическая активность повышается на 60–70%, тогда как в тройной системе Хн\_еб–АН–ПВП она повышается на 91% (по сравнению с водным раствором Хн\_еб с той же концентрацией ФС).

Работа выполнена в рамках Госзадания, тема V.46.14, № 0082-2014-0006, АААА-А17-117032750202-6 (получение двойных и тройных порфириносодержащих комплексов – хлорин еб с ПВП и полисахаридами-АН (ГК) и тройных хлорин еб-ПВП-АН (ГК) и изучение их спектральных характеристик) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований,

грант № 17-02-00294 (получение кинетических параметров фотоокисления триптофана в присутствии полученных фотосенсибилизирующих систем).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huang L., Zhiyentayev T., Xuan Y. et al. // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2011. V. 43. Issue 4. P. 313.
2. Hamblin M.R., Hasan T. // *Photochem Photobiol Sci*. 2004. V. 3. P. 436–50.
3. Shrestha A., Kishen A. // *Basic research – technology*. 2012. V. 38. P. 1275.
4. Makowski A., Wardas W. // *Curr. Top. Biophys*. 2001. V. 25. P. 19.
5. Wainwright M. // *Antimicrob Chemother*. 1998. V. 42. № 1. P. 13.
6. Jori G., Brown S.B. // *Photochem Photobiol Sci*. 2004. V. 3. Issue 5. P. 403.
7. Гейниц А.В., Толстых П.И., Дербенев В.А. // *Фотодинамическая терапия гнойных и длительно не заживающих ран: пособие для врачей*. М.: Медицина, 2004. 15 с.
8. Alenezi K., Tovmasyanb A., Batinic-Haberle I. et al. // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017. V. 17. P. 154.
9. Филоненко Е.В., Серова Л.Г. // *Biomedical photonics*. Т. 5. № 2. P. 26.
10. Zhiyentayev T.M., Boltaev U.T., Solov'eva A.B. et al. // *Photochemistry and Photobiology*. 2014. V. 90. P. 171.
11. Соловьева А.Б., Спокойный А.Л., Руденко Т.Г. и др. // *Клиническая практика*. 2016. № 2. С. 38.
12. Толстых П.И., Соловьева А.Б., Тамразова О.Б. и др. // *Лазерная медицина*. 2011. Т. 15. № 4. С. 55.
13. Tsvetkov V.B., Solov'eva A.B., Melik-Nubarov N.S. // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014. V. 16. P. 10903.
14. Rudenko T.G., Shekhter A.B., Guller A.E. et al. // *Photochem. Photobiol*. 2014. V. 90. P. 1413.
15. Shirmanova M.V., Gavrina A.I., Aksenova N.A. et al. // *J. Anal Bioanal Tech*. 2014. V. S1. P. 8.
16. Solov'eva A.B., Kopylov A.S., Savko M.A. et al. // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. № 12640. P. 1.
17. Савко М.А., Аксенова Н.А., Акишина А.К. и др. // *Журн. физ. химии*. 2017. Т. 91. № 11. С. 1970.
18. Park H., Park W., Na K. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 27. P. 7963.
19. Solovieva A.B. et al. // *Laser Physics*. 2009. V. 19. № 4. P. 1.
20. Толстых М.П., Клебанов Г.Н., Шехтер А.Б. и др. *Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв*. М.: Издательский дом “ЭКО”, 2001. 240 с.
21. Толстых М.П., Клебанов Г.Н., Климов Ю.В. и др. // *Биомедицинская радиоэлектроника*. 2001. № 2. С. 15.
22. Винник Ю.С., Якимов С.В., Тепляков Е.Ю. и др. // *Сибирский мед. журн*. 2004. № 4. С. 35.
23. Solovieva A.B., Kardumian V.V., Aksenova N.A. et al. // *Scientific Reports*. 2018. V. 8. № 8042.

24. Криштанова Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц. и др. // Вестн. ВГУ. 2005. № 1. С. 212.
25. Talegaonkar S., Ahmad F.J., Kohli K. et al. // *Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008. V. 68. P. 513.
26. Scott J.E. // *Chemical and Biological Implications*, in Ciba Foundation Symposium 143 – the Biology of Hyaluronan (eds D. Evered and J. Whelan). 2007. P. 6.
27. Кайшева Н.Ш., Мыкоц Л.П., Василенко Ю.К. // *Химико-фармацевтический журн.* 2004. Т. 38. № 1. С. 31.
28. Osburn E.J., Chau L.-K., Chen S.-Y. et al. // *Langmuir*. 1996. V. 12. P. 4784.
29. Aksenova N.A., Oles T., Sarna T. et al. // *Laserphysics*. 2012. V. 22. № 10. P. 1642.
30. Kardumyan V.V., Aksenova N.A., Chernyak A.A. et al. // *Laser physics*. 2014. V. 25. № 4. P. 6002.
31. Горюх Ю.А., Аксенова Н.А., Соловьева А.Б. и др. // *Журн. физ. химии*. 2011. Т. 85. № 5. С. 959.
32. Глаголев Н.Н., Роговина С.З., Соловьева А.Б. и др. // *Russ. J. Physical Chemistry*. 2006. Suppl. P. 72.
33. Aksenova N.A., Zhientaev T.M., Brilkina A.A. et al. // *Photon Lasers Med*. 2013. V. 2. Iss. 3. P. 189.
34. Швайчак Э. // *Рос. журн. биомеханики. Часть 1*. 2003. Т. 7. № 3. С. 87.
35. Юданова Т.Н., Решетов И.В. // *Химико-фармацевтический журн.* 2006. Т. 40. № 2. С. 24.