

УДК 535.373:544.174

## СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ХИМИЧЕСКИ СВЯЗАННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ С ЦИКЛОСАХАРИДАМИ

© 2022 г. А. С. Старухин<sup>1</sup>, \*, Т. А. Павич<sup>1</sup>, А. А. Романенко<sup>1</sup>,  
Ю. А. Кальвинковская<sup>1</sup>, С. Б. Бушук<sup>2</sup>, И. Л. Гайна<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт физики имени Б.И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Государственное научно-производственное объединение “Оптика, оптоэлектроника и лазерная техника”  
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Университет Бабес Болия, Факультет химии и химической инженерии, Клуж-Напока, Румыния

\*E-mail: a.starukhin@ifanbel.bas-net.by

Поступила в редакцию 17.01.2022 г.

После доработки 07.02.2022 г.

Принята к публикации 21.02.2022 г.

Созданы и исследованы водорастворимые комплексы на основе мезо-замещенных порфиринов с активными функциональными карбокси- и амино-группами, которые использованы для химического связывания с циклосахаридами. Методами люминесцентной микроскопии исследована проникающая способность синтезированных комплексов в клеточную структуру фибробластоподобных клеток.

DOI: 10.31857/S036767652206028X

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ведется активная работа по созданию фотосенсибилизаторов третьего поколения для применения в фотодинамической терапии, а также для использования в процессах антибактериальной фотодеструкции [1–4].

Особенно актуальным представляется создание новых химически связанных комплексов на основе различных фотосенсибилизаторов, химически связанных с моно- и полисахаридами в качестве лигандов (см. [5–8] и ссылки в них). Такие сопряженные системы должны быть растворимы в воде и в физиологических растворах, что является необходимым требованием для создания фотосенсибилизаторов третьего поколения. При этом указанные комплексы обладают способностью к векторной доставке фотосенсибилизатора в онкологическое новообразование, так как сахараиды активно используются как питательное вещество клетками онкологических новообразований.

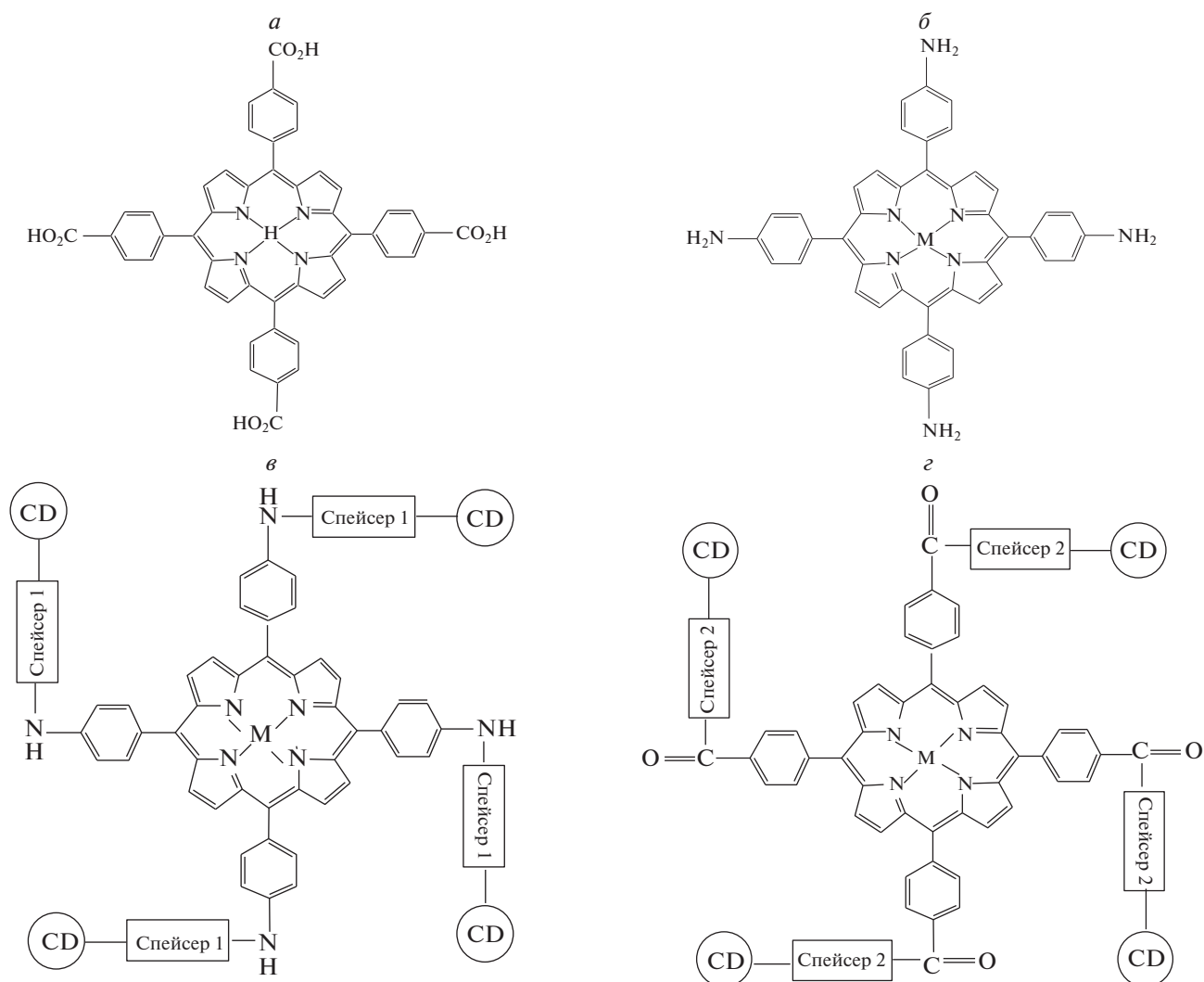
Целью данной работы являлось создание новых водорастворимых комплексов на основе различных фотосенсибилизаторов, химически связанных с циклосахаридами. Указанные комплексы должны состоять из трех составных частей: 1) фотосенсибилизаторы; 2) связующие мостики (линкеры или спейсеры); 3) циклосахарида различного состава.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В представленной работе в качестве фотосенсибилизаторов были использованы свободные основания порфиринов с активными функциональными карбокси- и амино- группами в мезо-положениях порфириновых макроциклов. Выполнен синтез 5,10,15,20- (тетра-4-аминофенил) порфирина ( $H_2$ -TAPP) и 5,10,15,20- (тетра-4-карбоксофенил) порфирина ( $H_2$ -TCPP). Соединения были синтезированы по модифицированным методикам, описанным в [9, 10]. На рис. 1 представлены структурные формулы синтезированных соединений, которые были использованы в качестве хромофоров в химически связанных комплексах порфиринов с циклосахаридами.

С использованием описанных выше хромофоров с активными функциональными карбокси- и аминокгруппами в мезо-положениях порфириновых макроциклов выполнен синтез химически связанных водорастворимых комплексов с  $\alpha$ -циклодекстрином.

На рис. 1 приведены структуры двух комплексов (рис. 1а и 1б). Соединение  $H_2$ -TAPP-(L-Ala-Su-CD)<sub>4</sub>, (рис. 1а) состоит из хромофора  $H_2$ -25,10,15,20-(тетра-4-аминофенил) порфирина ( $H_2$ -TAPP),  $\alpha$ -циклодекстрина (CD) и линкера 1 – L-аланин с янтарной кислотой (Su). Комплекс  $H_2$ -



**Рис. 1.** Структурные формулы 5,10,15,20-(тетра-4-аминофенил) порфирина (M-TAPP) (а); 5,10,15,20-(тетра-4-карбок-сифенил) порфирина (M-TCPP) (б); химически связанные комплексы: M-TAPP-(L-Ala-Su-CD)<sub>4</sub> (в); M-TCPP-(EDODEA-Su-CD)<sub>4</sub> (г); где M = H<sub>2</sub>.

TCPP-(EDODEA-Su-CD)<sub>4</sub>, (рис. 1г) состоит из 5,10,15,20-(тетра-4-карбоксифенил) порфирина (H<sub>2</sub>-TCPP), α-циклодекстрина (CD) и линкера 2 – 2,2'-(этилендиокси) диэтиламина (EDODEA) с янтарной кислотой (Su).

Заключительным этапом синтеза было взаимодействие присоединенного линкера с α-циклодекстрином с образованием эфирной связи. При создании перечисленных комплексов была предложена оригинальная методика химического связывания amino- и карбокси-групп порфиринового макроцикла с α-циклодекстрином. В литературе такого типа синтеза не описаны, но ряд идей по созданию указанных комплексов был заимствован из [8, 11].

Синтезы соединений проводили с использованием сложных линкеров, состоящих из янтарно-

го ангидрида для (L-Ala-Su-CD)<sub>4</sub> для связывания с H<sub>2</sub>-TAPP и N-BOC-2,2'-(этилендиокси) диэтиламина и янтарного ангидрида и N-BOC-L-аланина для H<sub>2</sub>-TCPP-(EDODEA-Su-CD)<sub>4</sub> с дальнейшим последовательным присоединением к порфируну. Карбоксильные группы на H<sub>2</sub>-TCPP и N-BOC-L-аланине активировали 1,1'-карбонилдиимидазолом (CDI). Заключительным этапом синтеза было взаимодействие присоединенного линкера с α-циклодекстрином с образованием эфирной связи. После прекращения реакции полученную реакцию смесь выделяли охлажденным диэтиловым эфиром до образования твердого осадка и промывали хлороформом до исчезновения окраски. Полученные соединения не растворяются в гидрофобных растворителях за счет наличия в их составе α-циклодекстрина и поэтому ис-

ходные реагенты легко удалялись эфиром и хлороформом. Избыток  $\alpha$ -циклодекстрина удаляли перекристаллизацией из диметилсульфоксида.

Спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Shimadzu UV-3600 Plus. С использованием спектрофлуориметра FluoroLog 3 фирмы HORIBA Scientific, США были измерены спектры флуоресценции, а также спектры возбуждения флуоресценции, скорректированные на мощность фотовозбуждения и спектральную чувствительность системы регистрации.

Для ряда синезированных соединений были измерены квантовые выходы флуоресценции и времена жизни флуоресценции. Квантовые выходы флуоресценции были определены относительным методом по отношению к известному значению квантового выхода стандарта. В качестве стандарта было использовано значение квантового выхода флуоресценции Zn-TPP в толуоле [12], которое было подтверждено позднее в [13]. Для измерения времени жизни флуоресценции использовалась методика время-коррелированного счета одиночных фотонов. с применением TCSPC-контроллера DeltaHub (HORIBA Scientific). Источниками возбуждения фотолюминесценции выступали импульсный лазерный диод LDH-D-C-375 (PicoQuant, Германия) с длиной волны 376 нм и минимальной длительностью импульса 59 пс, а также импульсный светодиод PLS-400 (PicoQuant, Германия) с длиной волны 406 нм и минимальной длительностью импульса 780 пс.

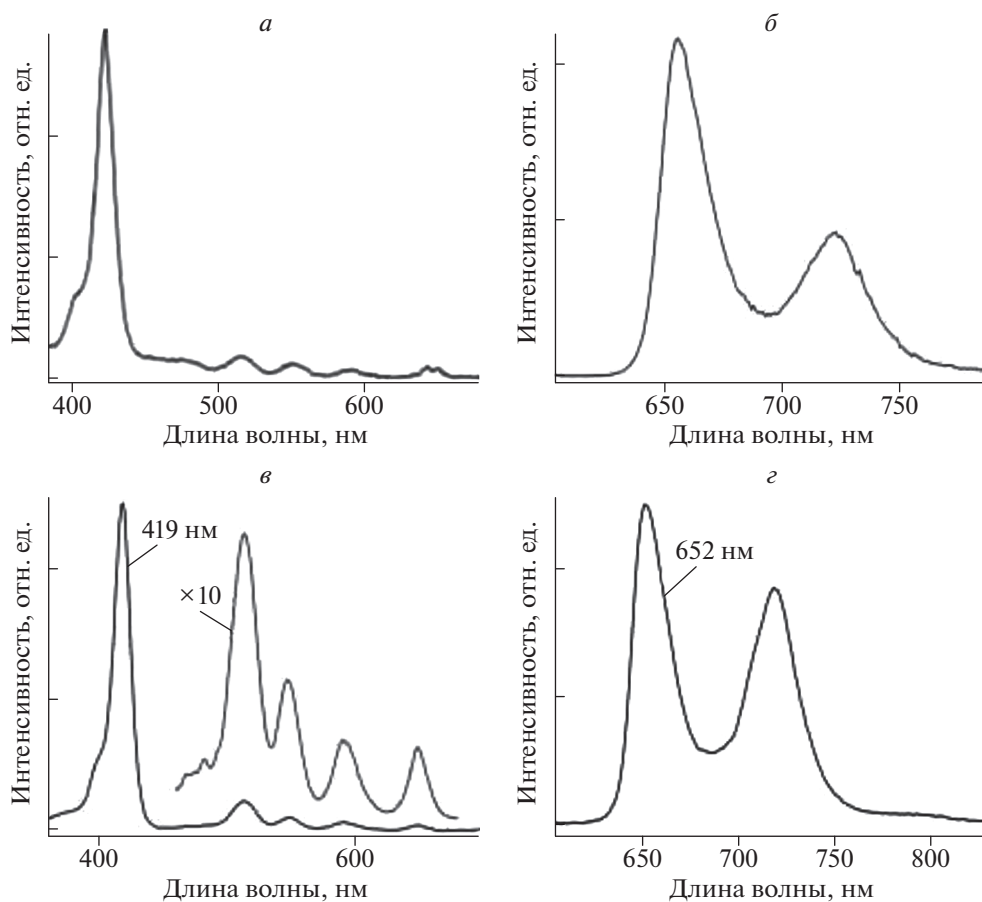
Исследование скоростей накопления синтезированных комплексов живыми клетками выполнялось методами флуоресцентной и лазерной сканирующей микроскопии. Использовался лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 510 NLO на базе инвертированного исследовательского флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 M при возбуждении образцов излучением аргонового лазера. Были использованы объективы Zeiss Plan-Neofluar 40 $\times$ /0.75 и Plan-Neofluar 20 $\times$ /0.5 без иммерсии. Контроль состояния образца проводился посредством микроскопии светлого поля. Возбуждение флуоресценции проводилось излучением непрерывного аргонового лазера на длине волны 514 нм в режиме сканирования лазерного возбуждения. Регистрация конфокальных изображений производилась в спектральном диапазоне 590–800 нм с размером фрейма 512  $\times$  512 пикселей и временем накопления сигнала 3.2 мкс/пиксель. Параметры, при которых были получены все приведенные флуоресцентные изображения, были идентичны. Экспериментальное оборудование, которое было использовано в вышеуказанных экспериментах, более подробно было описано в [14, 15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

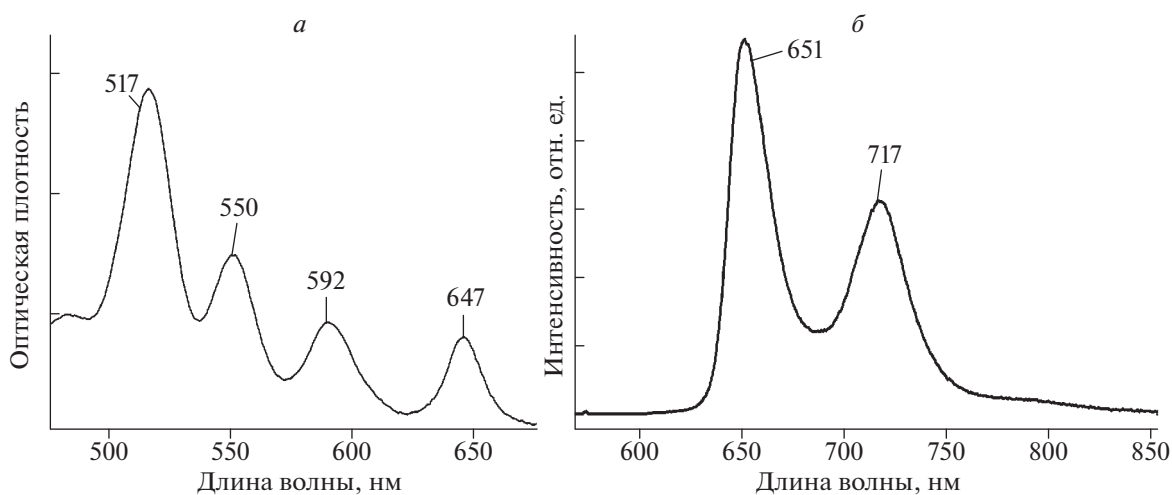
На рисунке 2 приведены спектры возбуждения флуоресценции и флуоресценции для H<sub>2</sub>-TAPP и H<sub>2</sub>-TCPP. Положение максимумов полос в спектрах возбуждения (аналог спектра поглощения) H<sub>2</sub>-TCPP и H<sub>2</sub>-TAPP близки к спектральной картине в спектрах порфиринов с арильными заместителями по мезо-положениям, например, 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина. Максимумы полос в спектре флуоресценции H<sub>2</sub>-TCPP расположены при 652 и 720 нм, тогда как в случае H<sub>2</sub>-TAPP соответствующие полосы смещаются в длинноволновую область и расположены при 659 и 728 нм. Для H<sub>2</sub>-TCPP и H<sub>2</sub>-TAPP измерены основные фотофизические параметры. Для H<sub>2</sub>-TCPP квантовый выход флуоресценции составляет  $8.5 \pm 0.1\%$ , а для H<sub>2</sub>-TAPP равен  $10.0 \pm 0.15\%$ , соответственно. Время жизни флуоресценции для H<sub>2</sub>-TAPP имеет значение  $10.0 \pm 0.06$  нс и  $9.2 \pm 0.06$  нс в случае H<sub>2</sub>-TCPP. Все измерения выполнены для растворов указанных соединений в толуоле. Экспериментальные кривые затухания флуоресценции анализировались в приближении двухэкспоненциальной аппроксимации. Кривые затухания флуоресценции носили моноэкспоненциальный характер и вклад второй компоненты не превышал 10%.

Синтезированные комплексы H<sub>2</sub>-TCPP-(ESuCD)<sub>4</sub> и H<sub>2</sub>-TAPP-(LASuCD)<sub>4</sub> показали высокую растворимость в воде (H<sub>2</sub>O), а также в диметилсульфоксиде (ДМСО). На рис. 3 приведены спектры поглощения и флуоресценции комплекса H<sub>2</sub>-TCPP-(ESuCD)<sub>4</sub> в H<sub>2</sub>O. Положения полос в спектрах поглощения и флуоресценции комплексов на рис. 3 практически не отличаются от спектров H<sub>2</sub>-TCPP, которые приведены на рис. 2в и 2г.

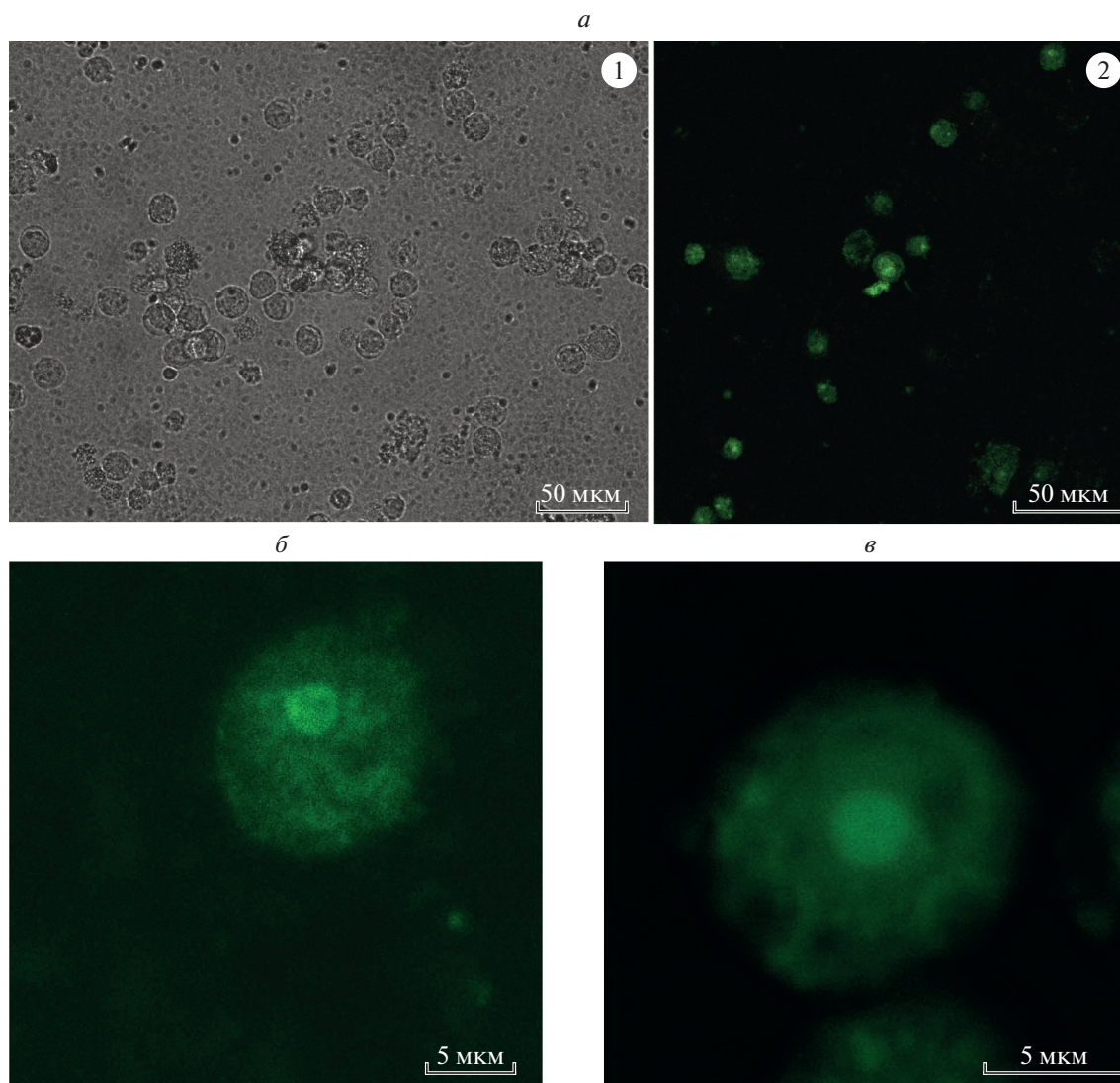
Синтезированные комплексы обладают высокоинтенсивной люминесценцией, что позволяет использовать их для исследований скоростей накопления синтезированных комплексов живыми клетками методами конфокальной люминесцентной спектроскопии. В качестве культуры клеток были выбраны клетки почечной ткани обезьяны BGM в буферной среде (водный раствор с определенной pH 7.4). Образец представлял из себя суспензию живых клеток в буферном растворе при температуре 37 $^{\circ}$ C с концентрацией  $10^5$  ед./мл. Раствор содержался в камерах для микроскопии NUNC Lab-Tek с восемью ячейками и дном из покровного стекла с толщиной 0.17 мм. В одиночную ячейку помещалось 0.2 мл суспензии клеток и 10 мкл водного раствора синтезированного комплекса с концентрацией  $1 \cdot 10^{-5}$  М. Регистрация изображений производилась спустя 2 ч после инкубирования клеток с синтезированными комплексами и спустя 24 ч. Образцы содержались при температуре 37 $^{\circ}$ C в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub>.



**Рис. 2.** Спектры возбуждения флуоресценции (а) при  $\lambda_{\text{рег}} = 725$  нм и флуоресценции (б) при  $\lambda_{\text{возб}} = 419$  нм H<sub>2</sub>-TAPP в толуоле; спектры возбуждения флуоресценции (в) при  $\lambda_{\text{рег}} = 419$  нм и флуоресценции (г) при  $\lambda_{\text{рег}} = 725$  нм H<sub>2</sub>-TSPR в толуоле.



**Рис. 3.** Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) H<sub>2</sub>-TSPR-(EDODEA-Su-CD)<sub>4</sub> в воде.



**Рис. 4.** Изображения образцов с клетками спустя 24 ч после инкубации: при использовании комплекса  $H_2$ -TCPP-(ESuCD) $_4$  (a): 1 – в проходящем свете и 2 – флуоресценция клеток. Флуоресценция одиночной живой клетки BGM спустя 24 ч после инкубации при использовании комплекса  $H_2$ -TCPP-(ESuCD) $_4$  (б) и при использовании комплекса  $H_2$ -TAPP-(LASuCD) $_4$  (в).

На начальной стадии образцы демонстрировали слабую флуоресценцию суспензии чистых клеток, которая обусловлена эндогенными хромофорами, при отсутствии в камере химически связанных комплексов порфиринов с циклосахаридами.

После двух часов инкубирования водорастворимых синтезированных комплексов были получены флуоресцентные изображения при возбуждении образца лазерным излучением ( $\lambda_{\text{возб}} = 514 \text{ нм}$ ). Через такой временной интервал мембраны клеток слабо окрашивались, а межклеточная среда демонстрировала фоновую флуоресценцию. Через 24 ч после инкубации наблюдается эффективное вхождение комплексов в клетки и легко детекти-

руется интенсивная флуоресценция на мембранах и внутри клеток.

На рис. 4 также представлены флуоресцентные изображения клеток при поглощении макрофагами двух синтезированных комплексов. Сравнение изображений для одиночных клеток на рис. 4 демонстрирует существенно более интенсивное свечение при использовании комплекса  $H_2$ -TAPP-(LASuCD) $_4$  по сравнению с применением в качестве фотосенсибилизатора комплекса  $H_2$ -TCPP-(ESuCD) $_4$  при аналогичных условиях эксперимента. Этот факт объясняется тем, что в водных средах интенсивность свечения для комплекса  $H_2$ -TAPP-(LASuCD) $_4$  существенно выше, чем для комплекса  $H_2$ -TCPP-(ESuCD) $_4$ . Более по-

дробные количественные оценки люминесцентных параметров синтезированных комплексов станут предметом наших дальнейших исследований.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что синтезированные водорастворимые комплексы порфириновых хромофоров химически связанные с  $\alpha$ -циклодекстрином обладают хорошей растворимостью в различных водных средах и в биологических субстанциях.

Применение методов лазерной сканирующей конфокальной микроскопии наглядно демонстрирует высокую проникающую способность синтезированных комплексов на основе порфириновых макроциклов и полисахаридов в клеточную структуру фибробластоподобных клеток в культуре (клетки почки зеленой мартышки BGM). Созданные комплексы обеспечивают значительное усиление внутриклеточной флуоресценции, что свидетельствует об эффективном связывании фотоактивного комплекса с клетками. Вопросы избирательности связывания синтезированных соединений по отношению к определенным органеллам клетки требует дальнейшего изучения. Химически связанные комплексы порфиринов с циклодекстринами могут быть отнесены к фотосенсибилизаторам третьего поколения, что открывает широкие возможности для их практического использования в биофизике и в медицине. Следует отметить, что полученные результаты являются только первым этапом в синтезе новых комплексов порфириновых хромофоров с поли- и циклосахаридами и дальнейшее развитие предложенных подходов в синтезе и методах исследования позволит создать новые комплексы для их дальнейшего применения как эффективных фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии.

Исследование поддержано Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект № Ф20РА-013) и ГНПИ “Конвергенция-2025” 3.03.10.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pham Th., Nguyen V., Choi Y. et al.* // Chem. Rev. 2021. V. 121. No. 2. Art. No.13454.
2. *Simões J., Sarpaki S., Papadimitroulas P. et al.* // J. Med. Chem. 2020. V. 63. No. 23. Art. No. 14119.
3. *Amos-Tautua B., Songca S., Oluwafemi O.* // Molecules. 2019. V. 24. P. 2456.
4. *Habermeyer B., Guillard R.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2018. V. 17. P. 1675.
5. *Kataoka H., Nishie H., Tanaka M. et al.* // J. Clin. Med. 2021. V. 10. No. 4. P. 841.
6. *Arja K., Elgland M., Appelqvist H. et al.* // Chem. Open 2018. No. 7. P. 495.
7. *Nishie H., Kataoka H., Yano S. et al.* // Oncotarget. 2016. V. 7. No. 45. Art. No. 74259.
8. *Hino S., Funada R., Sugikawa K. et al.* // Chem. Med. Chem. 2021. V. 16. No. 5. P. 793.
9. *Xiaomin W., Yuhou Z., Sumin W. et al.* // Fine Chem. Intermed. 2013. V. 4. P. 57.
10. *Ahmadi E., Ramazani A., Hamdi Z. et al.* // Silicon. 2015. V. 32. P. 476.
11. *Schneider R., Schmitt F., Frochot C. et al.* // Bioorg. Med. Chem. 2005. V. 13. No. 8. P. 2799.
12. *Зенькевич Э.И., Сагун Е.И., Кнюкшто В.Н. и др.* // Журн. прикл. спектроск. 1996. Т. 63. № 4. С. 599; *Zen'kevich, E.I., Sagun E.I., Knyukshto V.N. et al.* // J. Appl. Spectr. 1996. V. 63. No. 4. P. 502.
13. *Taniguchi M., Lindsey J., Bocian D. et al.* // J. Photochem. Photobiol. C. 2021. V. 46. No. 3. Art. No. 100401.
14. *Lapina V., Pavich T., Bushuk S. et al.* // J. Nanomed. Nanosci. 2019. V. 2019. No. 1. P. 1.
15. *Литвинчук Я.О., Казеко Л.А., Бушук С.Б. и др.* // Совр. стомат. 2021. № 1. С. 7.

## Design and study of water-soluble chemically conjugated complexes of porphyrins with cyclosaccharides

A. S. Starukhin<sup>a, \*</sup>, T. A. Pavich<sup>a</sup>, A. A. Ramanenka<sup>a</sup>, J. A. Kalvinkovskaya<sup>a</sup>, S. B. Bushuk<sup>b</sup>, L. I. Gaina<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Stepanov Institute of Physics, NAS of Belarus, Minsk, 220072 Belarus*

<sup>b</sup> *SSPA “Optics, Optoelectronics, and Laser Technology”, Minsk, 220072 Belarus*

<sup>c</sup> *Babes Bolyai University, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Cluj-Napoca, RO-400084 Romania*

\*e-mail: a.starukhin@ifanbel.bas-net.by

Water-soluble complexes of meso-substituted porphyrins with active functional carboxy- and amino-groups which chemically conjugated with cyclosaccharides have been synthesized and studied. The penetrating abilities of the synthesized complexes into the cellular structure of fibroblast-like cells were studied by the methods of luminescence microscopy.