

На правах рукописи

Садыкова Ольга Витальевна

**ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ НА
ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ
ПОРФИРИНОВ С АМФИФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ В ГЕНЕРАЦИИ
СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА**

Специальность 1.4.7 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, г. Москва.

- Научный руководитель:** **Соловьева Анна Борисовна,**
доктор химических наук, профессор
- Официальные оппоненты:** **Мелик-Нубаров Николай Сергеевич,**
доктор химических наук, ведущий научный
сотрудник Химического факультета
Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова
- Шухто Ольга Владимировна,**
кандидат химических наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования Ивановский государственный
химико-технологический университет
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт синтетических
полимерных материалов им. Н.С.
Ениколопова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 года в __ч. __ мин. на заседании диссертационного совета 24.1.243.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФИЦ ХФ РАН: <http://www.chph.ras.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
24.1.243.01
кандидат химических наук

Татьяна Александровна Ладыгина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Наблюдающийся рост полирезистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам подчеркивает необходимость разработки новых альтернативных подходов к лечению инфекционных заболеваний. Одним из перспективных методов лечения локальных инфекций (длительно незаживающие раны, трофические язвы, диабетическая стопа) может оказаться антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ). В основе АФДТ лежат цитотоксические свойства активных форм кислорода (АФК), прежде всего синглетного $^1\text{O}_2$ кислорода, генерируемых красителями – фотосенсибилизаторами (ФС) в возбужденном состоянии [1]. Наиболее активная и нетоксичная группа ФС – порфириновые фотосенсибилизаторы (ПФС), представляющие собой азотсодержащие макроциклические соединения – порфирины и их частично гидрированные аналоги – хлорины. Основное преимущество АФДТ перед антибиотикотерапией заключается во множественном характере окислительной деструкции микробных клеток-мишеней, что затрудняет выработку устойчивости к последующим циклам фотодинамических воздействий.

Однако при использовании АФДТ неизбежно возникает проблема проявления фототоксичности используемых ПФС препаратов. Частично эта проблема решается за счет использования совместно с ФС ряда амфифильных полимеров (АП). Как было показано сотрудниками Отдела полимеров и КМП ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН, повышение активности ФС в генерации $^1\text{O}_2$, приводящее к росту эффективности АФДТ, наблюдается в присутствии ряда АП – плюроники F127, ПВП, ПЭГ, образующих благодаря донорно-акцепторным взаимодействиям, комплексы с ФС, что приводит к дезагрегации исходно агрегированных в водных растворах порфириновых оснований [2]. Это определяет повышение удельной активности используемых ФС и уменьшение (на порядок и более) концентрации ФС и, следовательно, снижение фототоксичности метода.

Повышение эффективности АФДТ может достигаться также при совмещении метода с воздействием биологически активных молекул, способствующих заживлению ран – протеолитических ферментов, полисахаридов, антиоксидантов, оксида азота. В частности, повысить эффективность АФДТ возможно при одновременном использовании в качестве ранозаживляющего средства анионного полисахарида – альгината натрия (АН), который обладает хорошей ранозаживляющей способностью и в этом качестве в настоящее время используется в клинической практике. За счет структурных особенностей и полианионной природы АН способен образовывать мягкий гель на раневом ложе, таким образом, удаляя или контролируя экссудат в ранах [3].

К числу биологически активных соединений также можно отнести динитрозильный комплекс железа с глутатионом (ДНКЖ-ГЛ) который способен выступать в биосистемах в качестве доноров монооксида азота (NO), стимулирующего репарационно-регенеративные (восстановительные) процессы в живых организмах [4]. Известно, что монооксид азота взаимодействует с АФК с образованием пероксинитрита (OONO^\cdot), являющегося важным компонентом иммунного ответа в организме человека и животных. Однако одновременное использование фотосенсибилизатора с донорами оксида азота осложняется взаимодействием оксида азота с триплетно-возбужденными молекулами ФС, что приводит к дезактивации ФС [5].

В связи с этим возникает достаточно общая проблема создания лекарственных форм фотосенсибилизаторов для АФДТ, содержащих ФС и биологически активные молекулы, в том числе, доноры оксида азота, в которых активность каждого из

вводимых компонентов проявляется в полной мере и не подавляется другими компонентами. Такое представляется возможным при организации пространственной структуры всех составляющих формируемой лекарственной формы, в частности, предусматривающей определенную экранировку фотосенсибилизирующих-центров (прежде всего, образующихся при фотовозбуждении) от нежелательных воздействий биологически активных компонентов.

Целью настоящей работы является разработка порфиринсодержащих фотосенсибилизирующих композиций для АФДТ на основе амфифильных полимеров, альгината натрия и динитрозильного комплекса железа с глутатионом, обладающих высокой активностью в генерации синглетного кислорода, и установление влияния состава и соотношения компонентов системы на активность композиций в фотогенерации $^1\text{O}_2$ в условиях *in vitro* (в модельной реакции фотоокисления триптофана).

Дополнительно композицию на основе фотодитазина, поливинилпирролидона, альгината натрия и ДНКЖ исследовали *in vivo* (при лечении модельных ран у лабораторных животных).

В качестве ФС были выбраны порфирины различной природы: водорастворимые – диметилглутаминовая соль хлорина еб – препарат «Фотодитазин», используемый в клинической практике ФДТ, тринатриевая соль хлорина еб, аналог препарата «Фотодитазин», а также гидрофобный пентафторфенилпорфирин (ТФПФ20).

В качестве АП были выбраны хорошо изученные и использующиеся в настоящее время в медицине ПВП и плуроник F127. Присутствие АН, обладающего ранозаживляющими свойствами, в разрабатываемой полимер-полимерной ФС-системе с одновременным воздействием ДНКЖ-ГЛ, обладающим регуляторно-регенеративными свойствами, позволит эффективно использовать указанные системы при АФДТ локальных инфекций.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **основные задачи:**

- установить фотокаталитическую активность ФС – систем в реакции фотоокисления триптофана в воде в зависимости от состава и соотношения компонентов для двух- ФС – АП и ФС – АН, трех- ФС – АП – АН, а также четырех- ФС – АП – АН – ДНКЖ компонентных систем;
- установить влияние надмолекулярной структуры полимерных компонентов и их возможного взаимодействия в двойных ФС – АП, ФС – АН и тройной ФС – АП – АН системах на активность ФС в указанной реакции;
- установить влияние ДНКЖ на активность ФС в случае водорастворимых и гидрофобного порфиринов в присутствии и отсутствие АП и АН;
- провести предварительные исследования эффективности разрабатываемой системы при АФДТ модельных ран у лабораторных животных.

Научная новизна работы.

Разработаны полимерные фотосенсибилизирующие системы генерации $^1\text{O}_2$ на основе ФД, ПВП, АН и ДНКЖ, показавшие высокую активность как в процессе фотоокисления триптофана, так и при лечении модельных ран лабораторных животных методом АФДТ.

Установлена роль каждого из полимерных компонентов фотосенсибилизирующей системы. Впервые показано, что ПВП предотвращает разрушающее воздействие, оказываемое со стороны активных радикалов NO^\bullet , образующихся при фоторазложении ДНКЖ, на молекулы ФД. В то же время АН, не влияя на активность ФД в

фотогенерации $^1\text{O}_2$, оказывает *in vivo* на раневую поверхность животных заживляющее действие в сеансах антибактериальной фотодинамической терапии.

Методами рентгеновской дифракции (РД), атомно-силовой микроскопии (АСМ) и термогравиметрического анализа (ТГА) показано, что в системах ХебNa – ПВП и ХебNa – ПВП – АН ХебNa локализуется в фазе ПВП и не взаимодействует с макромолекулами АН.

Методом ^1H ЯМР спектроскопии установлено взаимодействие между функциональными группировками ХебNa и ПВП в системе ХебNa – ПВП – АН; при этом аналогичного взаимодействия между ХебNa и АН не обнаружено. Методами РД, АСМ и динамического рассеяния света (ДРС) установлено, что макромолекулы АН и ПВП не взаимодействуют друг с другом, как в растворах, так и в твердых пленках, полученных при испарении водных растворов, содержащих указанные компоненты.

Показано, что гидрофобный порфирин – ТФПФ20, солюбилизированный плуроником F127, обладает высокой фотокаталитической активностью в водной фазе в присутствии как ДНКЖ, так и АН, что связано со стабилизацией мицеллярной структуры плуроников при солюбилизации гидрофобных порфиринов.

Практическая значимость

Полученные данные могут быть использованы при разработке порфиринсодержащих препаратов для антибактериальной фотодинамической терапии локализованных инфекций (длительно незаживающих ран, осложненных ожогов, трофических язв). Такие препараты будут значительно более эффективны, чем обычно используемые фотосенсибилизаторы, благодаря дополнительной ранозаживляющей способности за счет использования природного полисахарида – альгината натрия и динитрозильного комплекса железа с глутатионом.

Положения, выносимые на защиту

1. Установленные зависимости эффективной константы скорости реакции фотоокисления триптофана в присутствии двойных (ФС – АП), (ФС – АН) и тройных ФС – АП – АН систем от концентрации АП и АН, соотношения полимерных компонентов в системе и природы ФС.

2. Установленные зависимости величины эффективной константы скорости фотоокисления триптофана в присутствии систем ФС – АП – ДНКЖ, ФС – АН – ДНКЖ и ФС – АП – АН – ДНКЖ от соотношения полимерных компонентов для водорастворимого и гидрофобного ФС.

3. Данные ^1H ЯМР спектроскопии об изменении хим. сдвигов ХебNa, ПВП и АН в системах ХебNa – ПВП и ХебNa – ПВП – АН в D_2O по сравнению с соответствующими параметрами в растворах индивидуальных компонентов.

4. Данные РД и ТГА по надмолекулярной структуре ПВП, АН, ПВП – АН, ХебNa – ПВП, ХебNa – АН, ХебNa – ПВП – АН в пленках, полученных при испарении соответствующих водных растворов.

5. Данные АСМ по структуре поверхности пленок ПВП, АН, систем ПВП – АН и ХебNa – ПВП – АН, полученных испарением на слюде соответствующих водных растворов

6. Данные ДРС по размерам молекул и ассоциатов исходных полимеров (ПВП, АН) и полимерной смеси (ПВП – АН) в водных растворах.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 13 тезисов докладов в материалах Международных и Российских конференций. В совместных работах автор принимал участие в подготовке

и проведении экспериментальных исследований, в обсуждении и обработке полученных результатов, написании и подготовке работ к печати.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на XVIII, XIX, XXI, XXII, XXIII, XXIV ежегодных научных конференциях отдела полимеров и композиционных материалов ФИЦ ХФ РАН (Москва 2017, 2018, 2020, 2021, 2022, 2023), 25th, 26th, 27th International Laser Physics Workshop (LPHYS'16, LPHYS'17, LPHYS'18), XI International Conference on Chemistry for Young Scientists "Mendeleev 2019" (Санкт-Петербург, 2019).

Структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, описания и обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 132 страницах, содержит 56 рисунков, 11 таблиц и библиографию из 205 наименований.

Основное содержание работы

Глава 1. Литературный обзор

В литературном обзоре рассмотрены:

- современные представления о химической структуре, фотокаталитических и спектральных характеристиках порфириновых фотосенсибилизаторов;
- механизм действия метода АФДТ и его преимущества перед остальными методами лечения локальных инфекций (труднозаживающие раны, трофические язвы, диабетические стопы);
- современные представления о свойствах и структуре альгината натрия;
- общая характеристика амфифильных полимеров – плуроника F127 и поливинилпирролидона.
- структура и биологическая активность ДНКЖ с глутатионом.

Глава 2. Методическая часть

2.1. Объекты исследования.

2.1.1. Водорастворимые порфириновые фотосенсибилизаторы:

- ди-N-метил- D-глюкаминная соль хлорина еб (фотодитазин, ФД, Вета-Грант, Россия);
- хлорин еб, (Хеб, Frontier Scientific, Великобритания). Водорастворимость хлорина еб достигалась использованием его в виде тринатриевой соли. Для получения тринатриевой соли хлорина еб (ХебNa) порошок Хеб растворяли в водном растворе гидрокарбоната натрия (молярное соотношение $\text{NaHCO}_3:\text{Хеб}=3:1$).

2.1.2. Гидрофобный порфирин:

- фторированный тетрафенилпорфирин – 5,10,15,20 – пентафторфенилпорфирин (ТФПФ20, Sigma-Aldrich).

Структуры фотосенсибилизаторов представлены на рис. 1а, б, с.

2.1.3. Полимеры:

- амфифильные полимеры – поли-N-винилпирролидон (ПВП, м.м. $4 \cdot 10^4$ М, Sigma-Aldrich, США) и тройной блоксополимер этилен- и пропиленоксида, плуроник F127 (F127, м.м. $12,6 \cdot 10^{-3}$ М, BASF);
- полисахарид – альгинат натрия (АН, вязкость 5.0-40.0 сП, м.м. $1 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^5$ М, Sigma-Aldrich, США).

2.1.4. Соединение, продуцирующее монооксид азота:

• динитрозильный комплекс железа с природным тиолсодержащим лигандом – глутатионом (ДНКЖ-ГЛ) (рис.1d). ДНКЖ-ГЛ синтезирован в ФИЦ ХФ РАН Ваниным А.Ф. [4].

2.1.5. Субстрат – триптофан (ТР, Sigma-Aldrich, США).

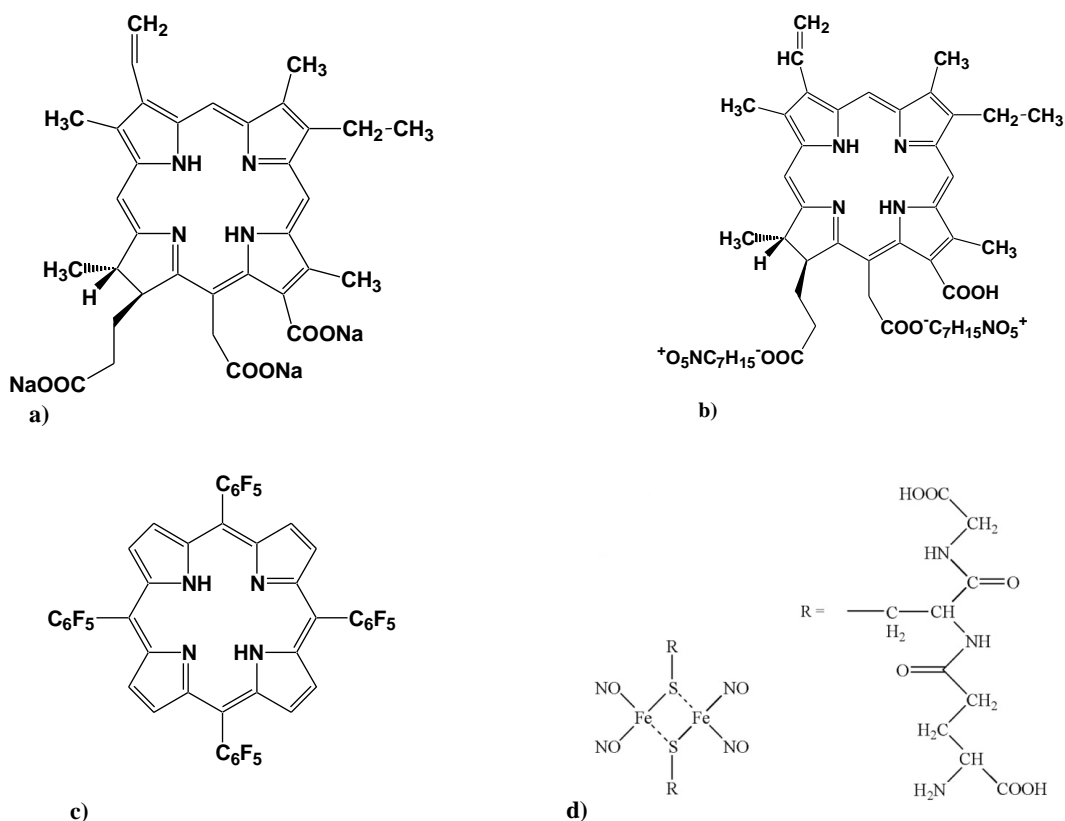


Рис. 1. Структурные формулы: Хе6Na (a), ФД (b), ТФПФ20 (c), ДНКЖ (d).

2.2. Солюбилизация гидрофобного ТФПФ20

Для солюбилизации растворимого в органических растворителях ТФПФ20 получали совместный раствор ФС ($2,5 \times 10^{-6}$ моль/л) и плуроника F127 ($1,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-4}$ моль/л) в хлороформе. Сухой остаток (аддукт), полученный после удаления растворителя (в ротормном испарителе), растворяли в дистиллированной воде.

2.3. Получение фотосенсибилизирующих полимерных систем на основе ТФПФ20

К растворенному в воде сухому остатку добавляли водные растворы АН, либо ДНКЖ. Для получения четырехкомпонентной системы ТФПФ20 – F127 – АН – ДНКЖ к аддукту (ТФПФ20 – F127) добавляли водный раствор АН, далее водный раствор ДНКЖ. Концентрация ДНКЖ составляла $1,0 \times 10^{-5}$ моль/л, концентрация АН варьировалась от $1,0 \times 10^{-4}$ моль/л до $6,0 \times 10^{-4}$ моль/л (0,002 – 0,012 % мас.).

2.4. Получение фотосенсибилизирующих полимерных систем на основе водорастворимых ФС

Фотосенсибилизирующие двойные системы (ФС – ПВП и ФС – АН) с водорастворимыми ФС (ФД, Хе6Na) готовили путем добавления к водному раствору ПВП, либо АН раствор ФС. Для получения тройной системы (ФС – ПВП – АН) раствор хлорина сначала смешивали с ПВП, затем к полученному раствору добавляли водный раствор АН. Системы, содержащие ДНКЖ, готовили в том же порядке, как описано

выше, но водный раствор комплекса железа добавляли в последнюю очередь. Следует отметить, что фотокаталитическая активность полученных систем не зависела от порядка смешения реагентов. Концентрация АН варьировалась от 1.0×10^{-4} моль/л до 3.0×10^{-3} моль/л (0,002 – 0,06 % мас.), при этом концентрация ПВП изменялась от 1×10^{-5} до 2×10^{-4} моль/л (0,04 % мас. – 0,8 % мас.). Концентрация хлоринового ФС составляла $2,5 \times 10^{-6}$ моль/л.

2.5. Исследование каталитических свойств фотосенсибилизирующих систем в водных растворах

Как уже упоминалось, для исследования фотокаталитической активности ПФС использовали реакцию фотоокисления триптофана. Фотоокисление триптофана осуществлялось за счет растворенного в воде молекулярного кислорода в кварцевой кювете (объем реакционной смеси – 3 см³, толщина $l = 1$ см) при комнатной температуре и перемешивании.

Полученные системы в п.2.3 и 2.4 перемешивали (магнитная мешалка “Heidolph”, скорость, 650 об/мин) в течение 10 минут, затем включали 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. Исходная концентрация триптофана составляла $C_{0i} = 2,5 \times 10^{-5}$ моль/л. За кинетикой процесса следили по изменению концентрации триптофана, которую определяли по уменьшению интенсивности фотолюминесценции триптофана ($\lambda_{ex} = 275$ нм, $\lambda_{em} = 355$ нм), окисляющегося до эндоперекиси триптофана [6].

2.5.1. Расчет эффективной константы скорости реакции для порфириносодержащих полимерных систем на основе ХебНа (без ДНКЖ)

Для сопоставительной оценки активности порфириносодержащих систем в реакции фотоокисления триптофана вводили эффективную удельную константу скорости k_{eff} , определяемую по начальному линейному участку зависимости интенсивности I_i от времени t :

$$k_{eff} = \frac{\Delta I}{I_0 \Delta t C^{PPS}}, \quad (1)$$

где I_0 и ΔI – соответственно, исходная интенсивность люминесценции триптофана (в приборных единицах, а.у.) и изменение этой интенсивности при фотоокислении за время Δt , C^{PPS} – концентрация фотосенсибилизатора. Погрешность определения k_{eff} составляла 10%. Погрешность определялась на основе кинетических данных, при которых каждое значение k_{eff} устанавливалось как среднее значение для 5-10 измерений.

2.5.2. Расчет эффективной константы скорости реакции для порфириносодержащих полимерных систем на основе порфиринов разной природы (ФД и ТФПФ20) в присутствии ДНКЖ

Фотоокисление триптофана в присутствии ДНКЖ проводилось в тех же условиях, как представлено в п.2.5.

Определение наблюдаемой константы k_{obs} скорости фотоокисления триптофана на основе проводимых экспериментов осложнялось тем, что при включении светодиода в момент времени $t = 0$ одновременно с уменьшением концентрации $C^{TP}(t)$ триптофана в реакционной среде фиксировалось уменьшение концентраций $C^{TPPF20,PD}(t)$ и $C^{DNCF}(t)$ – ТФПФ20, ФД и ДНКЖ, соответственно. Здесь следует указать, что процесс фотоиндуцированного разложения ДНКЖ с введением в реакционную среду радикалов

NO*, идущий одновременно с фотосенсибилизированным окислением триптофана, может инициировать как фотодеструкцию молекул ФС, так и обуславливать скорость целевой реакции – прямого фотоокисления триптофана.

Поэтому уравнение для кинетики фотоокисления триптофана было представлено следующим образом:

$$\frac{dC^{TP}(t)}{dt} = -k^{TP} \cdot C^{TP}(t)c^{\Phi C}(t)c^{ДНКЖ}(t), \quad (2)$$

Здесь k^{TP} – константа скорости фотосенсибилизированного окисления триптофана; $c^{\Phi C}(t) \equiv C^{\Phi C}(t)/C_0^{\Phi C}$ и $c^{ДНКЖ}(t) \equiv C^{ДНКЖ}(t)/C_0^{ДНКЖ}$ – относительные концентрации ПФС и ДНКЖ, уменьшающиеся вследствие процессов фотодеградации, так что, при $C^{TP}(0) \equiv C_0^{TP}$ получали:

$$C^{TP}(t) = C_0^{TP} \exp \left[-k^{TP} \int_0^t c^{\Phi C}(\tau)c^{ДНКЖ}(\tau)d\tau \right]. \quad (3)$$

Далее определяли наблюдаемую константу k_{obs}^{TP} скорости фотоокисления триптофана по уменьшению флуоресценции триптофана, анализируя линейный участок $[0, \Delta t]$ соответствующей кинетической зависимости, в течение которого окисляется примерно 20-30% количества триптофана в исходном растворе. При этом, как это следует из выражения (2), необходимо одновременно исследовать кинетику фотодеструкции ФС и ДНКЖ, то есть фиксировать соответствующие зависимости $c^{\Phi C}(t)$ и $c^{ДНКЖ}(t)$. Ниже будет показано, что в исследуемом временном интервале $[0, \Delta t]$ фотоокисления триптофана и при выбранных концентрациях всех компонентов, участвующих в исследуемом процессе фотоокисления триптофана, интегральное выражение в показателе экспоненты (3) с достаточной относительной точностью ($\sim 5\%$) может быть представлено в виде линейной зависимости от времени:

$$\chi_{TP}(\Delta t) \equiv \int_0^{\Delta t} c^{\Phi C}(\tau)c^{ДНКЖ}(\tau)d\tau \approx \xi_{TP} \cdot \Delta t, \quad (4)$$

где ξ_{TP} – интерполяционный кинетический параметр, и кинетика процесса окисления TP на указанном интервале имеет простой вид:

$$\Delta C^{TP} \equiv C_0^{TP} - C^{TP}(\Delta t) = C_0^{TP} \cdot k^{TP} \xi_{TP} \Delta t. \quad (5)$$

константу k_{obs}^{TP} скорости фотоокисления триптофана представляли следующим уравнением:

$$k_{obs}^{TP} = k^{TP} \xi_{TP} = \frac{\Delta I}{I_0 \Delta t}, \quad (6)$$

где I_0 и ΔI – соответственно, исходная интенсивность люминесценции триптофана (в приборных единицах, а.у.) и изменение этой интенсивности при фотоокислении за время Δt . Истинная константа скорости окисления триптофана в каждом конкретном условиях определялась согласно:

$$k^{TP} = k_{obs}^{TP} / \xi_{TP}, \quad (7)$$

имея в виду, что величина ξ_{TP} находится численно с учетом конкретных условий процесса фотоокисления триптофана. Вводили, соответственно, эффективную константу k_{eff}^{TP} скорости фотоокисления триптофана, приходящуюся на одну молекулу ФС, определяя такую константу согласно $k_{eff}^{TP} = k^{TP} / C^{ФС}$ [7]. Погрешность определения k_{eff}^{TP} составляла 10%. Погрешность определялась на основе кинетических данных, при которых каждое значение k_{eff}^{TP} устанавливалось как среднее значение для 5-10 измерений.

2.6. Спектральные методы исследования полимерных порфириносодержащих систем

2.6.1. Электронные спектры поглощения (ЭСП) и флуоресценция. Возможные взаимодействия порфиринов с полимерами фиксировали по сдвигам полос поглощения и флуоресценции. Электронные спектры поглощения (ЭСП) растворов снимали на спектрофотометре Cary50 (Varian, Австрия). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CaryEclipse (Varian, Австрия). Спектры люминесценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра – Horiba Fluoromax Plus (Horiba-Jobin-Yvon, Palaiseau, Франция). ИК-детектор: DSS-IGA020L (спектральный диапазон 800 нм–1700 нм). Длинноволновый фильтр TLP RG780 (Edmund Optics, Malaysia).

2.6.2. ^1H ЯМР спектроскопия. ^1H ЯМР спектры регистрировали с использованием спектрометра Bruker AVANCE III 500 МГц (Аналитический центр коллективного пользования ИПХФ РАН, под рук. Черняка А.С.). В стандартные ампулы (с наружным диаметром 5 мм) помещали образцы, растворов ХебNa, полимеров и систем ХебNa – ПВП, ХебNa – ПВП – АН (в соотношении 1:1 по массе) в D₂O (Aldrich, 99 атом. % D).

2.7. Методы исследования надмолекулярной структуры полимерных порфириносодержащих систем в растворе и в пленках.

2.7.1. Рентгеновская дифракция (РД). Исследование структуры пленок методом РД выполняли в Центре рентгенодифракционного анализа ИБХФ РАН под рук. Кривандина А.В. на рентгеновском дифрактометре с координатным детектором (излучение CuK α , $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$, расстояние образец-детектор 105 мм, ширина рентгеновского пучка в плоскости образца и ширина окна детектора 4 мм). Интенсивность рентгеновского рассеяния измеряли «на просвет» при комнатной температуре в интервале значений модуля дифракционного вектора $0.04 \text{ нм}^{-1} < S < 4.5 \text{ нм}^{-1}$ ($S=2\sin\theta/\lambda$, 2θ – угол рассеяния, λ – длина волны рентгеновского излучения). Пленки для исследования методом РД получали высушиванием на подложке из полиэтилена в течение 4-5 дней водных растворов, содержащих в разных пропорциях ХебNa, ПВП и АН (толщина пленок ~50–100 мкм). Массовое соотношение компонентов представлены в подписях к рисункам.

2.7.2. Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Методом АСМ изучали структуру поверхности пленок, полученных на слюде при испарении при комнатной температуре в боксе в течение 12-15 часов водных растворов АН, ПВП, АН – ПВП, ХебNa – АН, ХебNa – ПВП и ХебNa– ПВП – АН. Массовое соотношение компонентов представлены в подписях к рисункам.

Использовали сканирующий зондовый микроскоп Solver P47 (производство NT-MDT, г. Зеленоград). Изображения фрагментов поверхности образцов исследуемых пленок были получены в режимах топографии в полуконтактной моде. Все измерения

проводили кантилеверами серии *etalon HA-NC* с жесткостью 3.5-12 Н/м и резонансной частотой 140-235 кГц (радиус закругления 10 нм).

2.7.3. Термогравиметрический анализ (ТГА). Композиции ХебNa-полимер (ПВП, АН) готовили растворением ХебNa и полимера в воде, при интенсивном перемешивании полученного раствора в течение 10-15 мин. Пленки для исследования методом ТГА получали высушиванием на стеклянной подложке в течение 4-7 дней водных растворов, содержащих в разных пропорциях ХебNa, ПВП и АН. В двойной системе ХебNa – ПВП концентрации компонентов составляли: $C_{\text{ПВП}} = 0.4 \%$ мас., $C_{\text{ХебNa}} = 0.04 \%$ мас. В системе ХебNa – АН концентрации составляли: $C_{\text{АН}} = 0.25 \%$ мас, $C_{\text{ХебNa}} = 0.04 \%$ мас. Для полимерной смеси АН – ПВП: $C_{\text{АН}} = 0.25 \%$ мас, $C_{\text{ПВП}} = 0.4 \%$ мас. В тройной системе ХебNa – ПВП – АН (1:10:5): $C_{\text{ХебNa}} = 0.04 \%$ масс., $C_{\text{ПВП}} = 0.4 \%$ мас., $C_{\text{АН}} = 0.25 \%$ мас. Помимо этого, были приготовлены «смесевые» образцы смешением в ступке твердого полимера и хлорина, с таким же соотношением компонентов в системах, как и при получении пленок из водных растворов.

2.8.4. Динамическое рассеяние света (ДРС). Размер частиц и ξ -потенциал полимеров (ПВП и АН) в водных растворах в исходном состоянии и в двойной полимерной смеси (ПВП – АН) определяли методом динамического светорассеяния на приборе Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Малверн, Великобритания), оснащенный гелий-неоновым лазером ($\lambda = 633$ нм) под углом 173° . ξ -потенциал измеряли методом лазерной доплеровской велосиметрии, определяя электрофоретическую подвижность. Уравнение Генри использовалось для расчета значений ξ -потенциала. Растворы фильтровали через стандартные мембраны Millipore Millex-GV, Nylon 0,2, 0,22 мкм, Millipore Millex-GV, Hydrophilic PVDF 0,2, 0,22 мкм в оптическую кварцевую кювету (1×1 см²). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Zetasizer Soft Ware 6.20 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Исследования проводились в лаборатории физико-химических модификаций биополимеров ИБХФ РАН под рук. Плащиной И.Г. и Дубовика А.С.

Глава 3. Влияние альгината натрия и поливинилпирролидона на фотокаталитическую активность тринатриевой соли хлорина еб в реакции фотоокисления триптофана

Как уже было упомянуто, эффективность АФДТ трудно заживающих гнойных ран можно повысить при одновременном воздействии на рану АН.

Можно полагать, что натриевая соль альгиновой кислоты – АН не будет взаимодействовать с ХебNa, в отличие от поликатионного хитозана [8]. Результаты исследования влияния АН на эффективную константу k_{eff} скорости фотосенсибилизированного окисления триптофана представлены в данной главе. Следует отметить, что для выявления возможного влияния противоиона в молекуле Хеб на фотосенсибилизирующую активность ФС в работе были использованы две соли хлорина еб – тринатриевая и диглутаминовая (препарат Фотодитазин).

3.1. Влияние альгината натрия на фотокаталитическую активность ХебNa и ФД

На рисунке 2 представлена зависимость эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана, катализируемого системой ФД – АН (рис. 2, кривая 1) и ХебNa – АН (рис. 2, кривая 2) от концентрации полимера. Видно, что АН в указанном

интервале концентраций практически не влияет на величину эффективной константы скорости k_{eff} ФС, что, очевидно, связано с отсутствием каких-либо взаимодействий в системах ХебNa – АН и ФД – АН. Природа противоиона также не важна для фотосенсибилизирующей активности Хеб.

Отсутствие взаимодействий между натриевой солью хлорина еб и макромолекулами АН подтверждается электронными спектрами поглощения (ЭСП) и спектрами флуоресценции, представленными для ХебNa и системы ХебNa – АН¹ (рис. 3). В присутствии АН оптическая плотность полос поглощения и интенсивность полос флуоресценции ХебNa практически не меняется.

3.2. Влияние альгината натрия на фотокаталитическую активность комплекса ХебNa-ПВП

Ранее было показано, что в присутствии АП – ПВП, F127 и др., фотокаталитическая активность водорастворимых порфиринов, в частности, динатриевой соли 3,8-ди(1-метоксиэтил) дейтеропорфирина IX (димегин, ДМГ), в реакции окисления триптофана возрастает благодаря образованию слабосвязанных

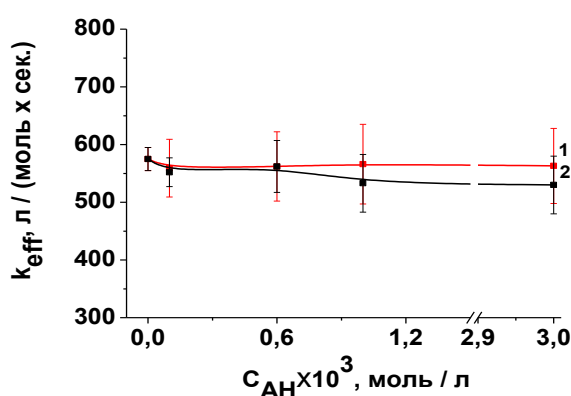


Рис. 2. Зависимость эффективной константы k_{eff} скорости реакции фотоокисления триптофана, катализируемой системой: 1) ФД–АН; 2) ХебNa–АН от концентрации АН.

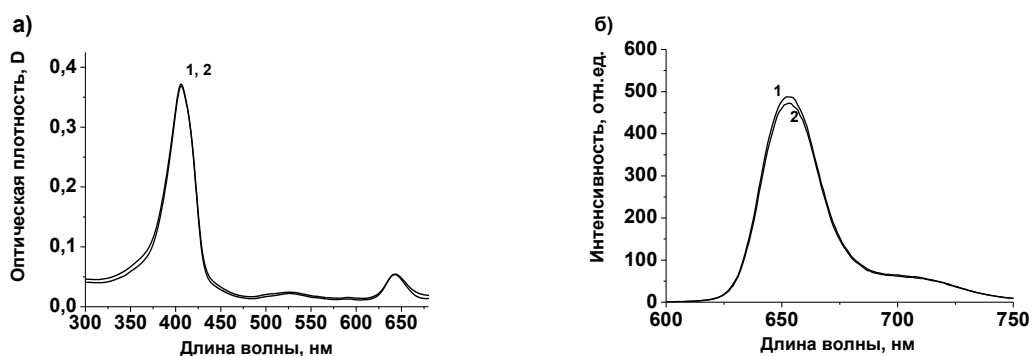


Рис. 3. Электронный спектр поглощения (а) и спектр флуоресценции (б) ХебNa (1) и ХебNa-АН (2). Концентрация ХебNa – $2,5 \times 10^{-6}$ моль/л, концентрация АН – 1×10^{-4} моль/л.

¹ Для системы ФД-АН электронные спектры поглощения и спектры флуоресценции аналогичны спектрам системы ХебNa-АН

межмолекулярных комплексов ФС – АП и дезагрегации ФС [9]. В данном разделе будет описано влияние АН на активность комплексов ХебНа – ПВП.

3.2.1. Особенности фотокаталитической активности комплексов ХебНа – ПВП в присутствии АН

На рисунке 4 представлены зависимости эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана в присутствии систем ХебНа – ПВП (рис. 4, кривая 1), ХебНа – ПВП – АН (рис. 4, кривая 2) от концентрации ПВП.

Как следует из рисунка 4, в отсутствие ПВП (нулевые точки на кривых) АН не влияет на величину k_{eff} , а в присутствии ПВП активность системы ХебНа – АН приближается к активности системы ХебНа – ПВП (рис. 4, кривые 1, 2). Другими словами, присутствие АН в системе ХебНа – ПВП не влияет на фотокаталитическую активность ХебНа и не препятствует образованию комплекса между ПВП и ХебНа. Об комплексообразовании между ХебНа и ПВП свидетельствуют, в первую очередь, изменения в ЭСП и спектрах флуоресценции ХебНа в присутствии ПВП и АН (рис. 5, А, Б). В ЭСП ХебНа полоса I (рис. 5А, кривая 1) сдвигается в красную область на ~ 21 нм. Этот эффект наблюдается для систем ХебНа – ПВП, ХебНа – ПВП – АН, где присутствует АП (рис. 5А, кривые 2, 3). Полоса флуоресценции систем ХебНа – ПВП и ХебНа – ПВП – АН (рис. 5Б, кривые 2, 3) сдвинута на ~ 12 нм относительно полосы флуоресценции чистого ХебНа (рис. 5Б, кривая 1). Наблюдающиеся батохромные сдвиги полос поглощения и флуоресценции ХебНа говорят об взаимодействии периферийных группировок хлорина с фрагментами ПВП.

О взаимодействии ХебНа с ПВП также свидетельствуют данные ^1H -ЯМР спектроскопии, полученные для систем ХебНа – ПВП и ХебНа – ПВП – АН. Было показано, что в ^1H ЯМР спектрах систем ХебНа – ПВП и ХебНа – ПВП – АН наблюдается сдвиг сигналов мезо-протонов порфиринового цикла, периферийных метильных групп и остатков пропионовой кислоты в молекуле ХебНа в слабое поле, а также сдвиг сигналов протонов гидрофобных фрагментов ПВП в сильное поле (по сравнению с положениями сигналов в спектрах исходного ПВП). При этом сигналы протонов периферийных групп в молекуле хлорина в тройной системе ХебНа – ПВП – АН также (по сравнению с ХебНа) сдвинуты в слабое и сильное поле, однако величина сдвига не превышает значений для двойной системы ХебНа – ПВП. При этом изменений в ^1H ЯМР спектрах АН в присутствии ХебНа не было зафиксировано.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существовании непосредственных взаимодействий между группировками ХебНа и ПВП в системах ХебНа – ПВП и соответствующей трехкомпонентной системе. Присутствие АН практически не влияет на взаимодействие между ХебНа – ПВП в системе ХебНа – ПВП – АН и не снижает величину эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана в указанной тройной системе.

Глава 4. Надмолекулярная структура и межмолекулярные взаимодействия полимерных компонентов по данным РСА, АСМ и ТГА и их влияние на фотосенсибилизирующую активность исследуемых систем

С целью изучения особенностей взаимодействия ХебНа и полимеров в многокомпонентных фотокаталитических системах в данной главе методами РД, АСМ и ТГА было проведено исследование структуры твердых пленок, полученных из водных растворов ХебНа, АН и ПВП при разных пропорциях этих составляющих.

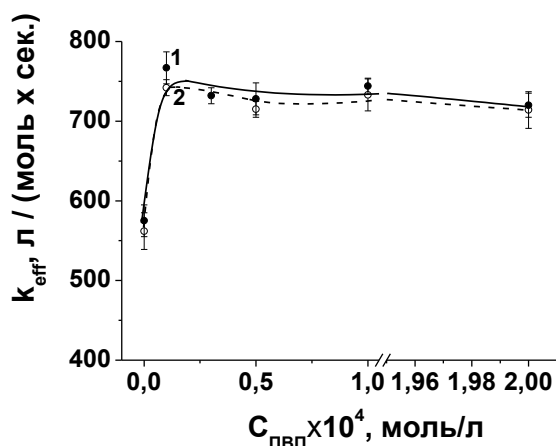


Рис. 4. Зависимость эффективной константы скорости реакции фотоокисления триптофана, катализируемой системой: ХебNa–ПВП (1) и ХебNa–ПВП–АН (2), от концентрации ПВП, где 2 – АН (6×10^{-4} моль/л).

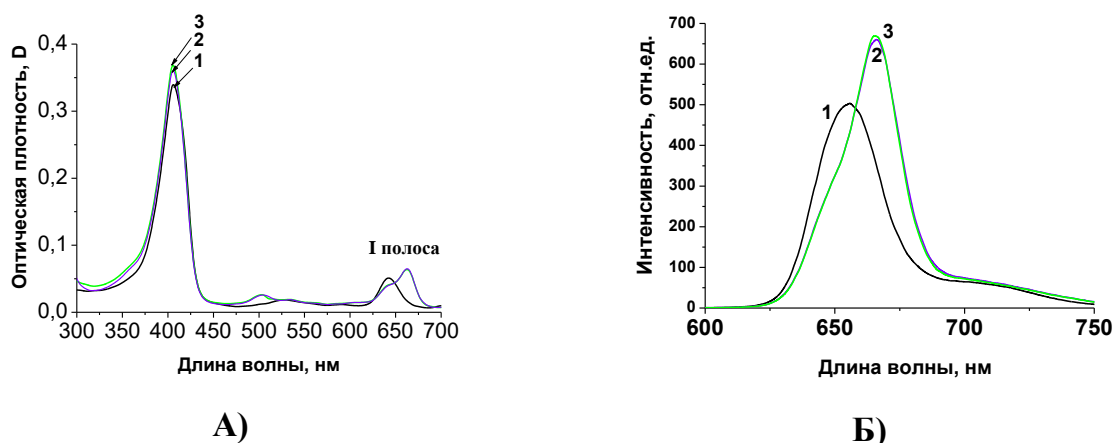


Рис. 5. Электронный спектр поглощения (А) и спектр флуоресценции (Б) ХебNa (1), ХебNa – ПВП (2) и ХебNa – ПВП – АН (3). Концентрация ХебNa – $2,5 \times 10^{-6}$ моль/л, концентрация ПВП – 1×10^{-4} моль/л (0,4 % мас.), АН – 6×10^{-4} моль/л (0,012 % мас.).

Рентгеновская дифракция

О структурном состоянии ХебNa, АН и ПВП и возможных межмолекулярных взаимодействиях в реакционной системе, можно, очевидно, опосредованно судить по данным рентгено-структурного анализа пленок, полученных из растворов смеси этих веществ.

В пленках, полученных из раствора ХебNa или из раствора, содержащего полимерные составляющие и избыточное количество ХебNa, образуется фаза ХебNa при $S \approx 0.3 \text{ нм}^{-1}$ (ХебNa – ПВП (3:1)), которая используется для идентификации фазы ХебNa в многокомпонентных пленках, полученных на основе полимеров с небольшими добавками ХебNa.

В пленках ХебNa – АН, судя по наличию дифракционного максимума при $S \approx 0.3 \text{ нм}^{-1}$, образуется упорядоченная фаза ХебNa (рис. 6, кривая 1). Интенсивность дифракционного максимума $S \approx 0.3 \text{ нм}^{-1}$, а следовательно, и содержание упорядоченной фазы ХебNa в пленках ХебNa – АН, прямо пропорциональны содержанию в них ХебNa. Дифракционные кривые для пленки ХебNa – АН и пленки АН в области дифракционных максимумов АН (при $S > 1 \text{ нм}^{-1}$) практически совпадают (рис. 6, кривые 1 и 2). Следовательно, присутствие в таких пленках ХебNa не оказывает существенного

влияния на структуру АН. На основании того, что структура АН в присутствии ХебНа не меняется и ХебНа образует в пленках ХебНа – АН отдельную фазу, можно заключить, что в растворах, из которых были получены эти пленки, ХебНа не взаимодействует с АН.

Иная картина структурообразования составляющих наблюдается для пленок на основе ПВП с добавками ХебНа. На рисунке 7 (кривая 1) приведена дифрактограмма пленки ХебНа – ПВП (1:10). Видно, что дифракционный максимум при $S \approx 0.3 \text{ нм}^{-1}$ для этой пленки имеет очень незначительную величину. Это говорит о том, что основная часть ХебНа в такой пленке не образует отдельной фазы.

В то же время, интенсивность первого дифракционного максимума ПВП ($S \approx 1.3 \text{ нм}^{-1}$) для пленок ХебНа – ПВП и ПВП заметно отличается (рис. 7, кривые 1, 2). По-видимому, это отражает изменение структуры ПВП в пленках в присутствии ХебНа. Можно полагать, что такое изменение структуры ПВП в пленках происходит в результате взаимодействия ПВП с ХебНа в растворах, из которых были получены эти пленки. Возможно, ХебНа в молекулярном или мелкодисперсном виде связывается в растворе с ПВП и при образовании из этого раствора пленок входит в виде дефектов в полимерную фазу ПВП. Результаты проведенного рентгенодифракционного исследования трехкомпонентной пленки ХебНа – ПВП – АН (1.5:10:5) (рис. 8, кривая 1) похожи на результаты, полученные для пленки ХебНа – ПВП (рис. 7, кривая 1). В пленке ХебНа – ПВП – АН дифракционный пик при $S \approx 0.3 \text{ нм}^{-1}$, характерный для

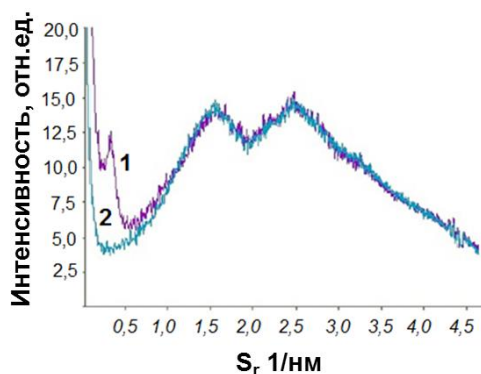


Рис. 6. Дифрактограммы пленки ХебНа–АН (1:10) (кривая 1) и пленки АН (кривая 2).

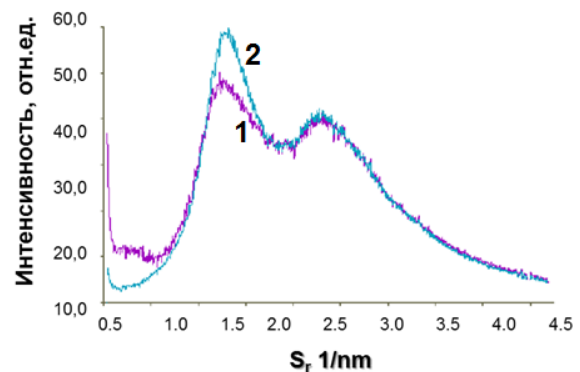


Рис. 7. Дифрактограммы пленки ХебНа–ПВП (1:10) (кривая 1) и пленки ПВП (кривая 2).

упорядоченной фазы ХебНа, не выявляется или имеет незначительную величину, но при этом наблюдается уменьшение интенсивности дифракционного пика ПВП при $S \approx 1.3 \text{ нм}^{-1}$ по сравнению с пленкой ПВП (рис. 7, кривая 2) и пленкой АН – ПВП (рис. 8, кривая 2). Следовательно, в таких трехкомпонентных пленках, как и в пленках ХебНа – ПВП, почти не образуется включений отдельной упорядоченной фазы ХебНа. На основании этого можно полагать, что

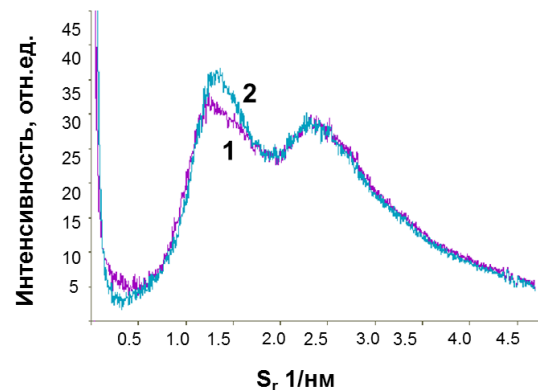


Рис. 8. Дифрактограммы пленок ХебНа–ПВП–АН (1.5:10:5) (кривая 1) и пленки АН–ПВП (1:2) (кривая 2).

присутствие полианиона АН не препятствует эффективному связыванию ХебНа с ПВП в растворе.

На рисунке 9 представлены экспериментальная и модельная кривые интенсивности рентгеновского рассеяния для пленки АН – ПВП (1:2) (рис. 9, кривые 3, 4). Было показано, что экспериментальная и модельная кривые интенсивности (рис. 9, кривые 3, 4) весьма близки в области больших углов рассеяния (при S больше $\sim 0.5 \text{ нм}^{-1}$). В то же время, в области малых углов рассеяния (при S меньше $\sim 0.25 \text{ нм}^{-1}$) экспериментальная интенсивность рассеяния такой пленкой (рис. 9, кривая 3) во много раз больше экспериментальных интенсивностей рассеяния отдельными полимерными составляющими такой пленки (рис. 9, кривые 1, 2) и модельной интенсивности (рис. 9, кривая 4).

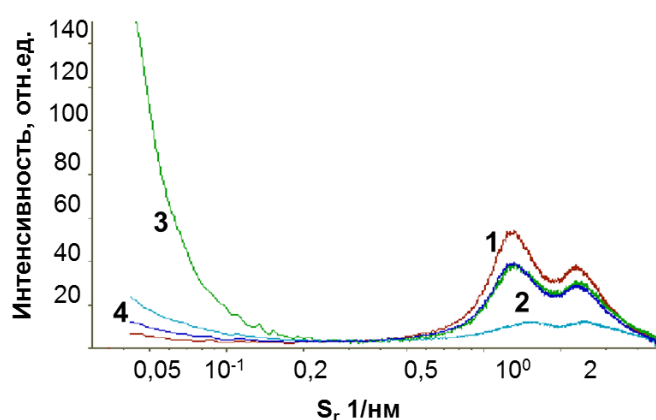


Рис. 9. Сравнение экспериментальной и модельной дифрактограмм пленки АН – ПВП (1:2). Логарифмический масштаб по оси абсцисс.

1 – экспериментальная дифрактограмма пленки ПВП.
2 – экспериментальная дифрактограмма пленки АН.
3 – экспериментальная дифрактограмма пленки АН–ПВП (1:2).
4 – модельная дифрактограмма пленки АН–ПВП (1:2), полученная сложением экспериментальных дифрактограмм пленок АН и ПВП.

Близкие значения экспериментальной и модельной интенсивностей в области больших углов рассеяния и значительно более высокая экспериментальная интенсивность по сравнению с модельной интенсивностью в области малых углов рассеяния свидетельствуют о существовании двух отдельных полимерных фаз АН и ПВП в исследованной пленке.

Атомно-силовая микроскопия.

Методом АСМ исследовали тонкие пленки (порядка нескольких нм), полученные на слюде из растворов ПВП и АН, а также их двойных и тройных смесей, содержащих и не содержащих ХебНа. Пленки АН имеют сетчатую трехмерную структуру (рис. 10, А), состоящую из отдельных тонких волокон полимера. ПВП образует сплошные пленки, состоящие из визуально бесструктурных глобул полимера (рис. 10, Б). При исследовании методом АСМ топографии поверхности пленок смеси ПВП и АН показано, что структура поверхности таких пленок представляет собой суперпозицию структур, образованных отдельными полимерами (рис. 10, В). Сетчатая волокнистая структура АН заполняется фазой ПВП, при этом отдельные участки

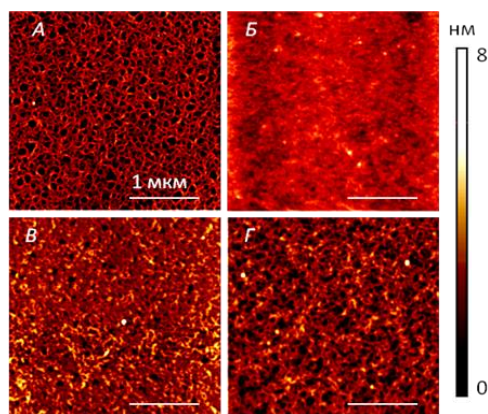


Рис. 10. Топография тонких пленок АН (А), ПВП (Б), АН–ПВП (1:2) (В) и ХебНа–ПВП–АН (1:5:5) (Г).

волокон АН хорошо различимы. Это свидетельствует о том, что ПВП и АН не образуют общую фазу в пленках, что согласуется с приведенными выше данными рентгеновской дифракции о двухфазной структуре пленок АН – ПВП.

Введение ХебNa в тонкую пленку смеси АН – ПВП по данным АСМ не оказывает влияния на укладку полимерных цепей в такой пленке (рис. 10, Г).

Термогравиметрический анализ

Параметры процесса термоокислительной деструкции (ТОД) систем ХебNa – АН, ХебNa – ПВП и ХебNa – ПВП – АН и компонентов системы – АН, ПВП представлены в таблице 1. Видно, что ХебNa влияет на процессы деструкции ПВП. В частности, у ПВП в присутствии ХебNa увеличивается температура начала потери массы ($T_{\text{нпм}}$) на $\sim 43^\circ$, что свидетельствует о повышении термостабильности полимера (табл. 1, строки 1, 2).

При этом ХебNa практически не влияет на деструкцию АН, как это следует из таблицы 1. В частности, параметры ТОД ($T_{\text{нпм}}$ и $T_{\text{экзо}}^\circ\text{C}$) почти не меняются в присутствии ХебNa (табл. 1, строки 3, 4), а параметры ТОД для двойной системы ХебNa – АН_{тв.смесь}, полученной механическим смешением компонентов, совпадают с аналогичными температурами ТОД образца ХебNa – АН_{пленка} (табл. 1, строки 4, 5).

В тройной системе ХебNa – ПВП – АН, полученной из растворов этих компонентов, температура максимальных экзоэффектов ТОД совпадает со значениями, наблюдающимся как в системе ХебNa – ПВП_{пленка}, так и для исходного АН (табл. 1, строки 2, 3, 6).

Таким образом, результаты проведенных исследований методами РД, АСМ и ТГА показали, что ХебNa взаимодействует с ПВП и не взаимодействует с АН. Следует также отметить, что взаимодействия АН и ПВП в растворе не происходит, т.к. согласно данным РД и АСМ в пленках, содержащих оба этих полимера, наблюдается образование двух отдельных фаз этих полимеров, имеющих такую же структуру, как в соответствующих однокомпонентных пленках АН и ПВП.

Глава 5. Влияние ДНКЖ на фотокаталитическую активность ПФС в присутствии амфифильных полимеров и альгината натрия

Как выше было отмечено, монооксид азота, образующийся при фоторазложении ДНКЖ, способен к взаимодействию с триплетно-возбужденными молекулами ФС, что может приводить к деструкции ФС. Надежды на реализацию идеи одновременного использования ФС и ДНКЖ связаны с ранее обнаруженным нами «полимерным эффектом» – повышением в присутствии АП удельной, отнесенной к молекуле ПФС, фотосенсибилизирующей активности в процессах окисления, что достигается за счет

Таблица 1. Параметры процесса ТОД ПВП и АН и их композиций с ХебNa. $T_{\text{нпм}}$ – температура начала потери массы, $T_{\text{макэкзо}}^\circ\text{C}$ – температура максимального экзоэффекта.

№	Образец	$T_{\text{нпм}}, ^\circ\text{C}$	$T_{\text{макэкзо}}, ^\circ\text{C}$
1	ПВП	303	469
2	ХебNa – ПВП _{пленка}	346	431
3	АН	220	573
4	ХебNa – АН _{пленка}	219	575
5	ХебNa – АН _{тв.смесь}	220	572
6	ХебNa – ПВП – АН _{пленка}	222	434, 570

солюбилизации, своего рода «капсулирования» молекул ПФС. Последний фактор может играть определяющую роль при проявлении активности ДНКЖ – продуцирования радикалов NO^\bullet .

Для выявления влияния природы ФС на активность в генерации $^1\text{O}_2$ в присутствии ДНКЖ, наряду с водорастворимым Фотодитазином в качестве ФС был использован гидрофобный фторсодержащий тетрафенилпорфирин (ТФПФ20), предварительно солюбилизированный плуроником F127.

Таким образом, в данной главе будет рассмотрено влияние ДНКЖ на фотокаталитическую активность водорастворимого ФД и систем на его основе – ФД – АН, ФД – ПВП, ФД – ПВП – АН, а также на активность ФС-систем на основе гидрофобного фторсодержащего тетрафенилпорфирина – ТФПФ20 – плуроник F127, ТФПФ20 – плуроник F127 – АН.

5.1. Влияние ДНКЖ на фотокаталитическую активность водорастворимого ФД

На рисунке 11 представлена зависимость эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана в присутствии ФД от концентрации ДНКЖ. Видно, что с увеличением концентрации ДНКЖ величина k_{eff} снижается. Как уже было отмечено, такой эффект может быть связан прежде всего с увеличением скорости фотодеструкции ФД в результате взаимодействия с радикалами NO^\bullet , образующимися в процессе фоторазложения ДНКЖ.

Деактивация ФД в условиях фотовозбуждения в присутствии NO^\bullet подтверждается падением интенсивности люминесценции синглетного кислорода, генерируемого ФД в присутствии ДНКЖ ($\lambda=400$ нм) по сравнению с люминесценцией $^1\text{O}_2$ (рис. 12), генерируемого ФД в отсутствие ДНКЖ (рис. 12).

5.2. Влияние ДНКЖ на фотокаталитическую активность системы ФД – ПВП – АН

5.2.1. Влияние ДНКЖ на фотокаталитическую активность ФД и системы ФД – АН

В таблице 2 представлены значения эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана, катализируемого ФД, от концентрации АН в отсутствие и в присутствии ДНКЖ.

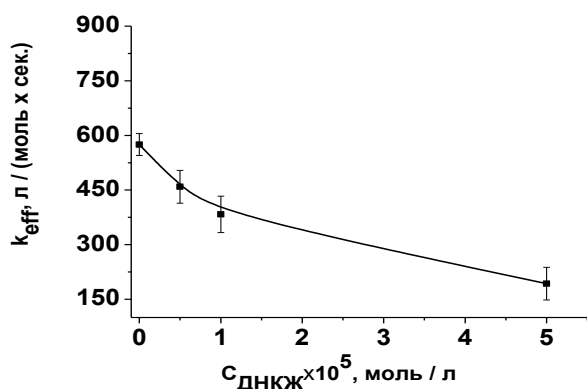


Рис. 11. Зависимость эффективной константы скорости фотоокисления триптофана, в присутствии ФД от концентрации ДНКЖ.

Видно, что АН в указанном интервале концентраций практически не влияет (в пределах ошибки эксперимента) на величину эффективной константы скорости. Как было указано выше для ХебНа, это, очевидно, происходит (см. Главу 4), из-за отсутствия взаимодействия между ФД и АН. При этом ДНКЖ понижает величину k_{eff} вне зависимости от присутствия АН в системе (табл. 2).

Как говорилось выше, такое падение k_{eff} является, очевидно, следствием разрушающего воздействия радикалов оксида азота на молекулы ФС. Таким образом, макромолекулы АН не участвуют во взаимодействии $NO\cdot$ с молекулами водорастворимого ФС.

5.2.2. Фотокаталитическая активность системы ФД – ПВП – АН – ДНКЖ

Поскольку при фотоиндуцированном разложении ДНКЖ с введением в реакционную среду радикалов $NO\cdot$ происходит фотодеструкция молекул ФД, проблема увеличения общей скорости этого процесса должна была состоять в исключении или в существенном снижении негативного разрушающего воздействия $NO\cdot$ на молекулы ФД. С этой целью в реакционную среду был введен АП – ПВП. Известно, что ПВП, в структуре которого присутствуют гидрофобные (винильные) и гидрофильные (пирролидоновые) фрагменты, образует водородные связи и комплексы с рядом ароматических соединений – фуллеренами, ароматическими аминами, красителями, имеющими отрицательный заряд [10]. В то же время в структуре ФД имеются три карбоксильных остатка, дополнительно поляризующие молекулу ФС. Учитывая эти свойства ФД и ПВП, можно полагать, что задача образования вокруг молекул ФС защитного полимерного слоя в присутствии указанного АП будет решена. Действительно, в водных растворах, содержащих ФС и ПВП, вне зависимости от присутствия других компонентов (в данном случае – АН и ДНКЖ) наблюдалось

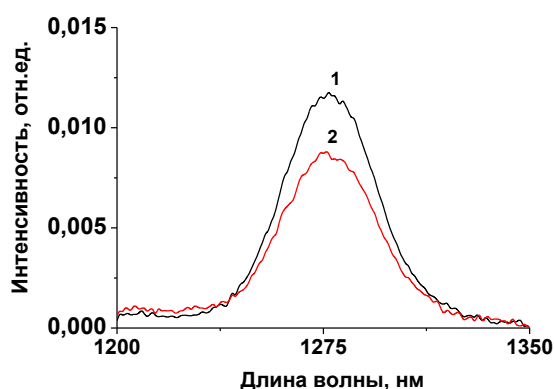


Рис. 12. Люминесценция синглетного кислорода в D_2O . 1) ФД (405 nm); 2) ФД – ДНКЖ. Ошибка эксперимента $\sim 10\%$. Концентрации: ФД – $2,5 \times 10^{-6}$ моль/л, ДНКЖ – 1×10^{-5} моль/л.

Таблица 2. Эффективные константы скорости реакции фотоокисления триптофана в присутствии систем ФД – АН, ФД – АН – ДНКЖ.

[АН]	k_{eff} , моль/л·с	
	ФД	ФД + ДНКЖ
0	570	380
	ФД+АН	ФД+АН+ДНКЖ
$1 \cdot 10^{-4}M$	560	360
$6 \cdot 10^{-4}M$	560	360
$1 \cdot 10^{-3}M$	570	350

*Относительная ошибка измерений составляла не более 10 %

$C_{ФД} = 2,5 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_{ДНКЖ} = 1,0 \times 10^{-5}$ моль/л.

взаимодействие функциональных групп молекул ФД и макромолекул ПВП, приводящее к росту величины k_{eff} . На рисунке 13 представлены зависимости эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана в присутствии комплекса ФД – ПВП (рис. 13, кривая 1); комплекса ФД – ПВП и АН (рис. 13, кривая 2) и комплекса ФД – ПВП, в присутствии АН и ДНКЖ (рис. 13, кривая 3) от концентрации ПВП. Во всех случаях наблюдается одинаковый ход зависимостей $k_{eff}=f[ПВП]$, свидетельствующий о росте величины k_{eff} при возрастании концентрации ПВП до молярного соотношения ФД:ПВП ~1:20. Уменьшение k_{eff} при дальнейшем возрастании концентрации ПВП вероятно, связано с увеличением доли «неэффективного» связывания полимером субстрата и ФС при возрастании концентрации АП в реакционной смеси, когда молекулы субстрата и ФС оказываются удалены друг от друга.

Увеличение константы скорости фотоокисления триптофана в системе ПФС – ПВП, как нами ранее было показано, связано с процессами дезагрегации ассоциатов молекул ФС, исходно существующих в водных растворах, вследствие межмолекулярного взаимодействия между периферийными группами молекул ПФС и фрагментами макромолекул АП. В то же время в отсутствие ПВП (нулевые точки на кривых) ДНКЖ понижает величину k_{eff} , а в присутствии ПВП активность систем ФД – ПВП – АН – ДНКЖ (рис. 13, кривая 3), как следует из рисунка 13, приближается к активности систем ФД – ПВП (рис. 13, кривая 1). Это свидетельствует о способности ПВП препятствовать нежелательному взаимодействию NO^{\bullet} с молекулами ФД в условиях фотовозбуждения.

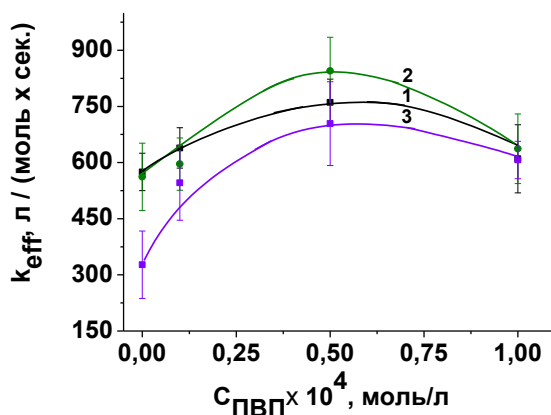


Рис. 13. Зависимость эффективной константы скорости фотоокисления триптофана (k_{eff}), катализируемого системой ФД–ПВП в отсутствие АН (1) и в присутствии АН (2,3) и ДНКЖ (3) от концентрации ПВП. $C_{ФД}=2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, $C_{АН}=0$ моль/л (1); $C_{АН}=6 \times 10^{-4}$ (2); $C_{АН}=6 \times 10^{-4}$ моль/л, $C_{ДНКЖ}=1,0 \times 10^{-5}$ моль/л (3).

В частности, на взаимодействие ФД с ПВП и последующую дезагрегацию фотосенсибилизатора в системах ФД – ПВП – АН и ФД – ПВП – АН – ДНКЖ указывают изменения в ЭСП и спектрах флуоресценции ФД. Так, полоса I в ЭСП фотодитазина (рис. 14, кривая 1) сдвигается в красную область на ~ 21 нм только при добавлении АП, это проявляется в спектрах поглощения ФД – ПВП, ФД – ПВП – АН, ФД – ПВП – ДНКЖ и ФД – ПВП – АН – ДНКЖ (рис. 14, кривые 2, 3, 5, 6). Аналогичные батохромные сдвиги и рост интенсивности полос наблюдаются и в спектрах флуоресценции (рис. 15).

5.2.3. Особенности взаимодействия полимерных компонентов в растворе по данным ДРС.

Для прогнозирования характера взаимодействий между компонентами системы АН – ПВП в растворе измеряли ξ -потенциалы индивидуальных компонентов (АН и ПВП) и их смесей. Данные таблице 3 показывают, что ПВП в водном растворе

характеризуется низким отрицательным значением ξ -потенциала составляет -53 мВ. Очевидно, частицы полианиона АН, содержащие противоионы натрия, более стабильны в растворе, чем частицы нейтрального ПВП. В совместном растворе АН – ПВП значение ξ -потенциала составляет -62 мВ. Это указывает на высокую стабильность частиц в совместном растворе, сопоставимую со стабильностью частиц в растворе АН. Размер ассоциатов ПВП в совместном растворе АН и ПВП остается неизменным (табл. 3, строки 1, 3). Размер ассоциатов АН в совместном растворе АН и ПВП несколько меняется (табл. 3, строки 2, 3). По-видимому, это может быть связано с самоассоциацией АН, что приводит к уменьшению доли свободного объема в системе АН – ПВП [11, 12].

5.3. Влияние ДНКЖ и АН на фотокаталитическую активность солюбилизированного плуроником F127 гидрофобного ТФПФ20

Известно, что водорастворимость гидрофобных ПФС можно достигать путем их солюбилизации АП, в частности, плуроником F-127. Благодаря своему строению (гидрофобная внутренняя часть и гидрофильная внешняя), мицеллы плуроника

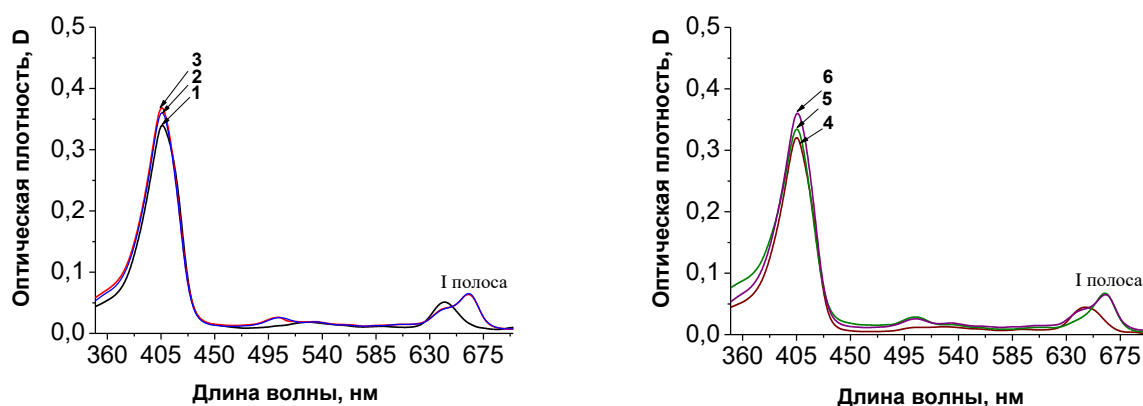


Рис. 14. Электронные спектры поглощения: 1) ФД ($2,5 \times 10^{-6}$ моль/л); 2) ФД – ПВП (1×10^{-4} моль/л); 3) ФД – ПВП – АН (6×10^{-4} моль/л); 4) ФД – ДНКЖ ($1,0 \times 10^{-5}$ моль/л); 5) ФД – ПВП – ДНКЖ; 6) ФД – ПВП – АН – ДНКЖ.

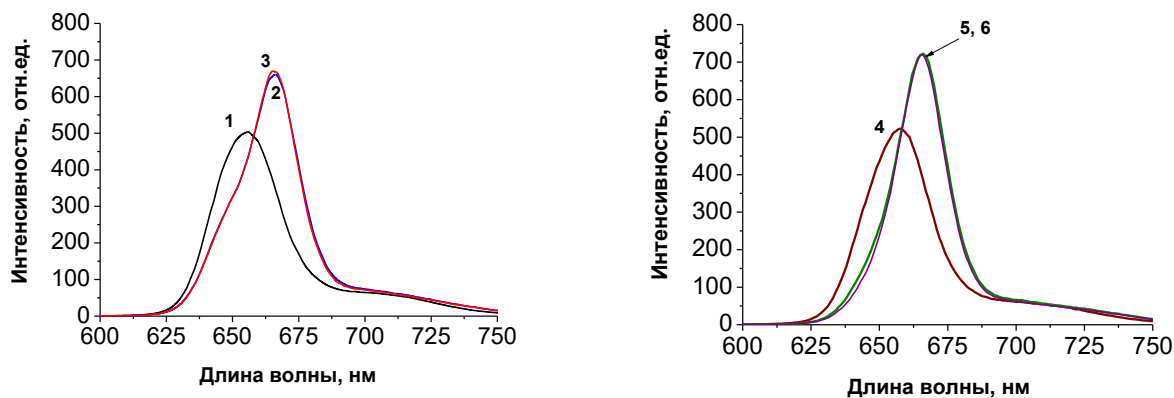


Рис. 15. Спектры флуоресценции: 1) ФД ($2,5 \times 10^{-6}$ моль/л); 2) ФД – ПВП (1×10^{-4} моль/л); 3) ФД – ПВП – АН (6×10^{-4} моль/л); 4) ФД – ДНКЖ ($1,0 \times 10^{-5}$ моль/л); 5) ФД – ПВП – ДНКЖ; 6) ФД – ПВП – АН – ДНКЖ.

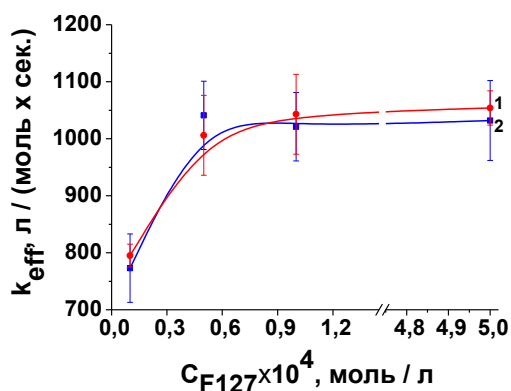
способны солюбилизовать, то есть переводить в водный раствор неполярные вещества, практически нерастворимые в воде. Можно полагать, что такая «инкапсуляция» молекул ПФС в мицеллы плуроника позволит предотвратить негативное воздействие радикалов NO^\bullet , образующихся при фоторазложении ДНКЖ.

На рисунке 16А представлены зависимости эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана в присутствии систем ТФПФ20 – F127 (рис. 16А, кривая 1) и ТФПФ20 – F127 – ДНКЖ (рис. 16А, кривая 2) от концентрации плуроника F127. Видно, что добавление ДНКЖ к системе ТФПФ20 – F127 не влияет на значения k_{eff} . Можно полагать, что в случае солюбилизованного гидрофобного ТФПФ20 плуроник является барьером, препятствующим такому влиянию.

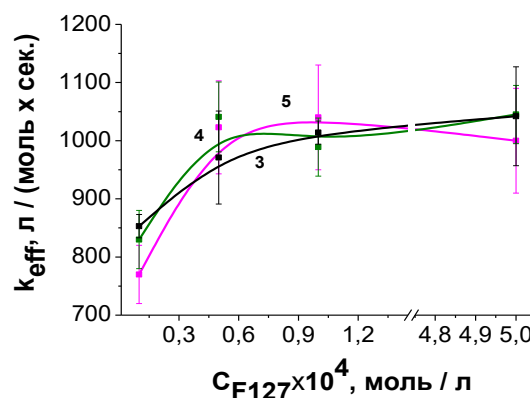
На рисунке 16Б представлены зависимости эффективной константы скорости k_{eff} фотоокисления триптофана в присутствии систем ТФПФ20 – F127 – АН (рис. 16Б, кривые 3, 4) и ТФПФ20 – F127 – АН – ДНКЖ (рис. 16Б, кривая 5) от концентрации плуроника F127. Видно, что при добавлении АН к системам ТФПФ20 – F127 и ТФПФ20 – F127 – ДНКЖ значения k_{eff} практически неизменны относительно значений k_{eff} ,

Таблица 3. Распределение ассоциатов и ξ -потенциалов по размерам в водных растворах АН и ПВП.

№	Соединение	Размеры частиц, нм	ξ -потенциал, мВ
1	ПВП (0,15 % мас.)	15	-5
2	АН (0,05 % мас.)	41, 230	-53
3	АН (0,05 % мас.)–ПВП(0,15 % мас.)	16, 97, 783	-62



А)



Б)

Рис. 16. Зависимость эффективной константы k_{eff} скорости фотоокисления триптофана, катализируемого системой ТФПФ20 – F127 – ДНКЖ в отсутствие (А) и в присутствии (Б) АН от концентрации плуроника F127. (1) $C_{\text{ДНКЖ}} = 0$ моль/л; (2) $C_{\text{ДНКЖ}} = 1,0 \times 10^{-5}$ моль/л; (3) $C_{\text{АН}} = 1 \times 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{ДНКЖ}} = 0$ моль/л; (4) $C_{\text{АН}} = 6 \times 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{ДНКЖ}} = 0$ моль/л; (5) $C_{\text{АН}} = 1 \times 10^{-4}$ моль/л; $C_{\text{ДНКЖ}} = 1,0 \times 10^{-5}$ моль/л.

наблюдающихся для систем ТФПФ20 – F127 и ТФПФ20 – F127 – ДНКЖ. Как выше было показано, полианион АН не взаимодействует с водорастворимым анионным хлорином еб, аналогом ФД. В случае солюбилизованного нейтрального ТФПФ20, по-видимому, ФС также не взаимодействует с полисахаридом, что проявляется в отсутствии влияния АН на фотокаталитическую активность систем ТФПФ20 – F127 и ТФПФ20 – F127– АН – ДНКЖ.

Таким образом, в данной главе показано, что в модельных условиях – в реакции фотоокисления триптофана в присутствии гидрофобного (ТФПФ20) и водорастворимого (ФД) фотосенсибилизаторов и АП (плюроник F127, ПВП) ДНКЖ не уменьшает эффективную константу скорости k_{eff} фотоокисления триптофана. Иными словами, АП «защищают» порфирины (гидрофобный и водорастворимый) от взаимодействия с образующимся при освещении ДНКЖ оксидом азота, приводящего к постепенному разрушению системы сопряженных двойных связей и падению способности активировать молекулярный кислород.

Приложение 1.

***In vivo* эксперименты по фотодинамическому воздействию с использованием композиционных систем фотодитазина с ПВП, ДНКЖ и АН при лечении модельных ран у лабораторных животных.**

Исследования были выполнены на животных (23 крысы), разделенных на 6 групп, по 4-5 крысы в каждой, в зависимости от способа обработки раны в каждой группе (Таблица 4).

Таблица 4. Распределение животных по группам

Группа	I	II	III	IV	V	VI
Обработка	нет	ФД+ hv	АН+ hv	ПВП-АН+hv	ФД-АН- ДНКЖ+hv	ФД-ПВП-АН- ДНКЖ+hv

Экспериментальные группы I–V служили в качестве контроля для базовой экспериментальной группы VI. В исследовании использовали модель полнослойной плоской раны с тефлоновыми ограничительными кольцами [13].

Показано, что добавление ПВП, АН и ДНКЖ в раствор фотодитазина (VI группа) значительно уменьшает геморрагический эффект ФДТ, обычно характерный для этого метода и затрудняющий кровоток в ране. Кроме того, было показано, что такие показатели, как пролиферация фибробластов, рост и созревание грануляционной ткани в группе VI (ФД–ПВП–АН–ДНКЖ) достоверно выше, чем в остальных группах. Это объясняется наличием в составе композиций ДНКЖ, в частности, его стимулирующим влиянием на пролиферацию фибробластов и рост грануляционной ткани.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны фотосенсибилизирующие полимерные композиции генерации $^1\text{O}_2$ на основе фотодитазина и поливинилпирролидона в присутствии биологически активных молекул (альгината натрия и ДНКЖ-ГЛ), показавшие высокую эффективность в модельных реакциях фотоокисления триптофана и при лечении экспериментальных ран лабораторных животных методом АФДТ.

2. Установлена роль каждого из полимерных компонентов фотосенсибилизирующей системы. Показано, что ПВП предотвращает разрушающее воздействие радикалов NO^\bullet , вырабатываемых при фоторазложении ДНКЖ, на молекулы фотодитазина. В то же время, альгинат натрия, не подавляя активность ФД в фотогенерации $^1\text{O}_2$, инициирует *in vivo* процессы раневого заживления (грануляции и эпителизации) при лечении модельных ран лабораторных животных методом АФДТ.

3. Методами ДРС, ^1H ЯМР спектроскопии, РД, АСМ и ТГА показано, что в водных растворах, содержащих исследуемые фотосенсибилизирующие полимерные системы и в твердых пленках, формируемых при испарении данных растворов ХебНа и ПВП образуют комплексы; при этом полимерные компоненты – АН и ПВП не взаимодействуют друг с другом.

4. Показано, что фторированный тетрафенилпорфирин – ТФПФ20, солюбилизированный плуроником F127, обладает высокой фотокаталитической активностью в присутствии как ДНКЖ, так и АН. Это связано с «экранирующей ролью» мицелл плуроника в подавлении негативного воздействия радикалов NO^\bullet и макромолекул АН на молекулы ТФПФ20.

Список цитируемой литературы

1. Hamblin M.R., O'Donnell D.A., Murthy N., Christopher H.Contag, Tayyaba Hasan // Photochem.Photobiol. – 2002. – V.7. – №1. – P. 51-57.
2. Соловьева А.Б., Аксенова Н.А., Спокойный А.Л. и др., 2014, Патент РФ №. 2609735.
3. Marta Szekalska, Agata Puciłowska, Emilia Szymańska, Patrycja Ciosek, and Katarzyna Winnicka // International Journal of Polymer Science. – 2016. – V. 2016. – P. 1-17.
4. Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D. et al // Nitric Oxide, Biol. Chem. – 2010. – V.23. – P.136-149.
5. Prithipal Singh, Hogg N., J. Joseph, B. Kalyanaraman // FEBS Letters 360. – 1995. – P. 47-51.
6. Rossi E., Van de Vorst A., Jori G. // Photochemistry and Photobiology. – 1981. – V. 34. – P.447-454.
7. Solovieva A.B., Anatoly F.Vanin, Anatoly B. Shekhter et al // NOX. – 2019. – V.83. – P. 1-19.
8. Valeriya V. Kardumyan, Nadejda A. Aksenova, Victoria A. Timofeeva et al // Polymers. – 2021. – V. 13. – № 1007. – P. 1-14.
9. Solovieva A.B., Melik-Nubarov N.S., Zhiyentayev T.M. // Laser Physics. – 2009. – V. 19. – № 4. – P. 817-824.
10. Yu. E. Kirsh, Poly_N_vinylpyrrolidone and Other Poly_N_vinylamides (Nauka, Moscow, 1998).
11. Aline M. F. Lima, Valdir Soldi and Redouane Borsali // J. Braz. Chem. Soc. – 2009. – V.20. – 9. – P. 1705-1714.
12. Dan Zhong, Xin Huang, Hu Yang, Rongshi Cheng // Carbohydrate Polymers. 2010. V. 81. Issue 4. P. 948-952.
13. Shekhter A.B., Rudenko T.G., Serezhenkov V.A. et al // Biophysics. – 2007. – V. 52. – P.515–520.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Savko M.A., Aksenova N.A., Akishina A.K., Khasanova O.V., Glagolev N.N., Romyantseva V.D., Zhdanova K.A., Spokoinyi A.L., and Solovieva A.B. Effect of Pluronic F127 on the Photosensitizing activity of Tetraphenylporphyrins in organic and aqueous phases // *Russian Journal of Physical Chemistry A.* – 2017. – V. 91. – P. 2260–2267.
2. Solov'eva, O. V. Khasanova, N. A. Aksenova, A. V. Chernyak, V. I. Volkov, V. A. Timofeeva, and P. S. Timashev. Effect of Polysaccharides and Polyvinylpyrrolidone on the Photocatalytic Activity of Chlorin e6 in Tryptophan Oxidation // *Russian Journal of Physical Chemistry A.* – 2019. – V. 93, № 12. – P. 2507–2514.
3. L. V. Belovolova, M. V. Glushkov, N. A. Aksenova, A. B. Solov'eva, and O. V. Khasanova. UV Luminescence and Light Scattering in Photoditazine Systems with Sodium Alginate, Poly-N-Vinylpyrrolidone, and Tryptophan // *Optics and Spectroscopy.* – 2019. – V. 126, № 6. – P. 703–709.
4. Sadykova O.V., Krivandin A.V., Aksenova N.A., Timofeeva V.A., Shatalova O.V., Kotova S.L., and Solovieva A.B. Specific Features of the Structural Organization of Porphyrin-Containing Binary and Ternary Polymer Systems: X-Ray Diffraction and Atomic Force Microscopy Study // *Polymer Science, Series A.* – 2021. – V.63, №2. – P. 154–161.
5. O.V. Sadykova, N.A. Aksenova, N.N. Glagolev, A.F. Vanin, A.B. Shekhter, A.L. Fayzullin, A.S. Dubovik, I.G. Plashchina, A.B. Solovieva, P.S. Timashev. Effect of dinitrosyl iron complex and sodium alginate on the activity of porphyrin photosensitizers solubilized by amphiphilic polymers in the generation of singlet oxygen // *Laser Physics.* – 2023. – V. 33, №4. – P. 1–10.

Патент

Пат. 2730850 РФ. МПК А61К 31/00, 31/409, А61Р 17/02, С01G 49/00 Композиция гидрогеля для лечения дефектов покровных тканей методом фотодинамической терапии. Соловьева А.Б., Аксенова Н.А., Глаголев Н.Н., Кардумян В.В., Щедрина М.А., Тимашев П.С., Ванин А.Ф., Микоян В.Д., Хасанова О.В. Патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Прикладная микрофлюидика». № 2020101194. Заявл. 15.01.2020, опубл. 26.08.2020, Бюл. №24.