

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРИКАТИОННОГО ХЛОРИНОВОГО СЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ СО СРЕДСТВАМИ ПАССИВНОЙ ДОСТАВКИ ПО ДАННЫМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Д. Б. Березин^{1,2*}, В. В. Макаров¹, В. В. Александрийский¹,
М. А. Крестьянинов³, Т. В. Кустова¹, П. Б. Разговоров², А. В. Кустов^{1,3}

УДК 547.97;544.176;544.164;544.18

¹ Ивановский государственный химико-технологический университет,
НИИ макрогетероциклических соединений, Иваново, Россия; e-mail: berezin@isuct.ru

² Ярославский государственный технический университет, Ярославль, Россия

³ Институт химии растворов им. Г. А. Крестова РАН, Иваново, Россия

(Поступила 31 марта 2023)

Проведено 1D- и 2D-ЯМР-спектральное исследование процессов агрегации трикатионного хлоринового (H_2Chl^{3+}) фотосенсибилизатора (ФС) и его взаимодействия со средствами пассивной доставки Твин 80 и поливинилпирролидона (ПВП) в водных растворах. Показано, что метод ЯМР-спектроскопии позволяет наблюдать в растворе катионного хлорина H_2Chl^{3+} образование наноагрегатов ($m_{FC} \geq 10^{-3}$ моль/кг) и ассоциированных форм при снижении концентрации ФС на два порядка, а также выявлять фрагменты молекул, ответственные за агрегацию. Добавки кратных мольных избытков солюбилизаторов Твин 80 и ПВП приводят к разрушению наноагрегатов ФС и образованию устойчивых комплексов с потенциальными носителями, при этом ассоциированные формы макрогетероциклов в растворе могут сохраняться. Полученные результаты согласуются с данными абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также динамического рассеяния света. Молекулярный комплекс водорастворимого H_2Chl^{3+} с макромолекулой ПВП в водном растворе дополнительно стабилизирован за счет H-связывания амидного NH-протона ФС с кислородом карбонильной группы полимера.

Ключевые слова: полусинтетические хлорины, фотосенсибилизатор, средства пассивной доставки, ядерный магнитный резонанс, агрегация, молекулярное комплексобразование.

The aggregation studies of tricationic chlorin photosensitizer (H_2Chl^{3+} , PS) and PS interaction with passive delivery vehicles Tween 80 and PVP in aqueous solutions have been carried out by 1D and 2D NMR. It is demonstrated that NMR spectroscopy is a powerful tool to detect both nanoaggregates at about 10^{-3} mol/kg and associates formed in H_2Chl^{3+} solution at PS concentration lower by two orders of magnitude. At the same time NMR is able to identify molecular fragments of PS responsible for the aggregation. Addition of solubilizers as Tween 80 and PVP leads to the destruction of PS nanoaggregates and the formation of stable complexes with potential carriers, while the associated forms of the macrocycle studied are presented in a solution. The results obtained are consistent with the data of absorption and fluorescence spectroscopy as well as dynamic light scattering. The molecular complex of water-soluble H_2Chl^{3+} with the PVP macromolecule in aqueous solution is additionally stabilized due to H-bonding of the PS amide NH proton and oxygen atom of the polymer carbonyl group.

Keywords: semi-synthetic chlorins, photosensitizer, passive delivery vehicles, nuclear magnetic resonance, aggregation, molecular complex formation.

INTERACTION OF TRICATIONIC CHLORIN SENSITIZER FOR PHOTODYNAMIC THERAPY WITH PASSIVE DELIVERY VEHICLES ACCORDING TO NMR SPECTROSCOPY DATA

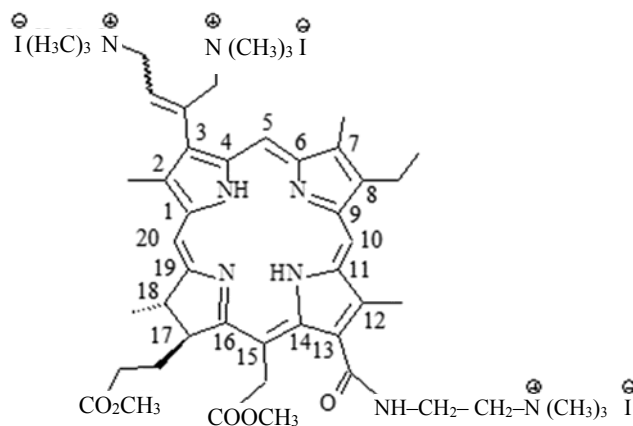
D. B. Berezin^{1,2*}, V. V. Makarov¹, V. V. Alexandriyskiy¹, M. A. Krestyaninov³, T. V. Kustova¹,
P. B. Razgovorov², A. V. Kustov^{1,3} (¹ Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Research Institute of Macrocyclic Compounds, Ivanovo, Russia; e-mail: berezin@isuct.ru; ² Yaroslavl State Technical University, Yaroslavl, Russia; ³ G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ivanovo, Russia)

Введение. Одно из важнейших направлений медицинской химии — разработка альтернативных или дополняющих существующие малоинвазивных методов диагностики и лечения онкологических и инфекционных заболеваний [1—3]. К таким методам относится противоопухолевая фотодинамическая (ФДТ) и антимикробная фотодинамическая (АФДТ) терапия, основанная на избирательном действии селективно накапливающегося в очаге заболевания фотосенсибилизатора (ФС) — препарата, токсичного при облучении в присутствии кислорода [1—12]. Достоинства ФДТ и АФДТ в сравнении с традиционными химиотерапевтическими методами лечения — селективное и малотоксичное в отношении окружающих здоровых тканей фотоинактивирующее действие ФС на атипичные клетки и патогены с поражением одновременно нескольких клеточных мишеней, а также отсутствие резистентности к проводимому лечению [3—5, 8, 13].

Наряду с соединениями немакроциклической природы, в частности аминоклеветеновой кислотой, некоторыми фенотиазиновыми или цианиновыми красителями, в качестве ФС широко применяются ароматические тетрапиррольные макрогетероциклы (МГЦ) — порфирины, хлорины, фталоцианины и их аналоги, возможности широкой модификации молекул которых позволяют создавать препараты, отвечающие современным требованиям [14—18]. Большинство макрогетероциклических ФС, применяемых в клинической практике, либо являются анионными соединениями, либо не содержат заряженных групп [1—4, 8, 11, 17]. Большой интерес к ФС, несущим катионные группы, связан как с растворимостью таких соединений в воде, так и с их способностью проникать через клеточные мембраны резистентных к антибиотикам грамотрицательных патогенов [3, 7—12, 14, 16], накапливаться в митохондриях и ядре, интеркалировать в ДНК болезнетворных клеток [3, 19, 20], повышая таким образом эффективность ФДТ.

Одно из существенных препятствий на пути широкого применения в клинической практике макроионических ФС, включая катионные, — агрегация этих соединений в водных растворах [8, 21, 22], которая снижает не только эффективность генерации ими активных форм кислорода (АФК) при облучении, но и сродство препаратов к мембранам атипичных клеток, а значит, эффективность их фотодинамического действия. Наиболее простой способ преодоления агрегации ФС — создание его лекарственных форм с применением средств пассивной доставки препарата, например, на основе биосовместимых поверхностно-активных веществ (ПАВ), липосом или полимеров [22—25].

Методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии, а также динамического рассеяния света (ДРС) изучена агрегация трикатионного ФС $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$, представляющего собой производное хлорина e_6



в воде, а также особенности его молекулярного комплексообразования в водных растворах биосовместимых пассивных носителей — мицеллярного ПАВ Твин 80 и полимера поливинилпирролидона (ПВП) [26—31]. $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ обладает выраженным сродством к водной фазе, которое проявляется в невысоком коэффициенте распределения ($P = 0.97 \pm 0.03$, 298 К) в двухфазной системе 1-октанол–фосфатно-солевой буфер [27]. Несмотря на выраженную гидрофильность и достаточно высокую для МГЦ этого типа растворимость в воде, катионный ФС $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ уже при молярной концентрации $7.0 \cdot 10^{-6}$ моль/кг образует в водном растворе продукты самоассоциации, регистрируемые в электронных спектрах поглощения (ЭСП) и спектрах флуоресценции, но не фиксирующиеся методом ДРС [26, 28]. Так, образование ассоциатов трикатионного хлорина обнаруживается в системе этанол–вода уже при 60 %-ном или более содержании водного компонента [26]. Небольшое гипсохромное

смещение длинноволновой $Q_x(0-0)$ -полосы (-7 нм) в ЭСП трикатионного хлорина в ходе рассматриваемого процесса не позволяет сделать заключение о природе образующегося ассоциата.

Наноагрегаты H_2Chl^{3+} с мономодальным распределением по размерам и усредненным диаметром ~ 200 нм формируются в водных растворах лишь при миллимолярных концентрациях (1.8 ммоль/кг) [28] и могут быть разрушены в присутствии полимерных (ПВП) или мицеллярных (Твин 80) носителей. Так, уже малая добавка ПВП в мольном соотношении ФС:носитель = 3:1 к раствору трикатионного хлорина в концентрации выше пороговой приводила, по данным ДРС, к исчезновению наночастиц [12, 28, 30]. Результаты спектрофотометрического и флуоресцентного исследований позволяют предположить, что Н-ассоциаты и агрегаты диаметром ниже наноразмерного в водном растворе H_2Chl^{3+} при этом сохраняются [31].

В соответствии с предложенной ранее математической моделью [32]:

$$\lg\left(\frac{A - A_0}{1 - (A - A_0)}\right) = \lg K_b + n \lg\left(m_m^T - n \frac{m_{\text{ФС}}(A - A_0)}{A_{\text{max}} - A_0}\right) \quad (1)$$

($m_{\text{ФС}}$ — аналитическая концентрация ФС ($7.3 \cdot 10^{-6}$ моль/кг); $m_m^T = m_T - \text{ККМ}$ — концентрация “мицеллярного” Твин 80 как разность его аналитической концентрации и критической концентрации мицеллообразования (ККМ); A_0 и A_{max} — начальная и конечная оптические плотности растворов ФС в воде и водном растворе Твин 80) оценена устойчивость молекулярных комплексов H_2Chl^{3+} –Твин 80. Константы связывания и стехиометрия взаимодействия в составе комплекса зависят от концентрации ПАВ, а расчетная функция описывается в координатах $\lg[(A - A_0)/(1 - (A - A_0))] = f[\lg m_m^T]$ двумя линейными участками, характеризующимися индивидуальными константами K_b и параметрами n , представляющими собой среднее число молекул Твин 80, с которыми ФС взаимодействует в составе мицеллы ($\lg K_{b1} = 1.44$, $n_1 = 0.33$; $\lg K_{b2} = 14.10$, $n_2 = 3.19$ [29, 30]). Параметр n описывает среднестатистическую картину связывания H_2Chl^{3+} в мицелле Твин 80 в условиях недостатка (n_1) и избытка (n_2) мицелл [33, 34]. Аналогичная картина титрования Твин 80 обнаружена в случае моно- и дикатионных, а также трианионных ФС хлоринового ряда [7, 12, 29].

Анализ кривых флуоресценции трикатионного ФС в водных растворах Твин 80 в присутствии тушителя KI в соответствии с уравнением Штерна—Фольмера:

$$F_0/F = K_{\text{SV}}[I] + 1, \quad (2)$$

где F_0 и F — интенсивность флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя; $[I]$ — равновесная концентрация иодид-иона (моль/кг); K_{SV} — константа Штерна—Фольмера (кг/моль), и расчет соответствующих констант динамического тушения (K_{SV}) позволили сделать вывод о характере локализации этого пигмента в мицелле ПАВ [32, 35, 36]. Так, полученные для H_2Chl^{3+} величины K_{SV} свидетельствуют о встраивании молекул ФС в мицеллу и их преимущественной локализации в ее поверхностных слоях вблизи гидрофильных оксиэтиленовых групп [29—34], что представляется разумным, исходя из катионной природы хлорина и гидрофобной структуры ядра мицеллы Твин 80. При увеличении концентрации солубилизатора на два порядка (60- и 6000-кратный мольный избыток относительно $m_{\text{ФС}}$) уменьшается константа Штерна—Фольмера с 5.40 ± 0.18 до 1.33 ± 0.06 по причине экранирования молекул ФС мицеллярным окружением [33, 35].

Цель настоящей работы — анализ агрегационного состояния трикатионного хлорина в воде и водных растворах пассивных носителей Твин 80 и ПВП с использованием ЯМР-спектроскопии для подтверждения сделанных предположений.

Эксперимент. 3(1),3(2)-*бис*-(N,N,N-триметиламинометилиодид)-13(1)-N'-(2-N'',N'',N''-триметиламмониоэтилиодид) амид-15(2),17(3)-диметиловый эфир хлорина e_6 (H_2Chl^{3+}) синтезирован по предложенной ранее методике [37] и надежно идентифицирован с применением методов масс-спектрометрии, а также 1D- и 2D-ЯМР-спектроскопии. Полученные данные согласуются с [27, 37]. Применялись ПВП ($M = 10000$) и неионогенное ПАВ Твин 80 марки Aldrich, а также дейтерированные растворители D_2O и $DMSO-d_6$ (Panreac).

Масс-спектры зарегистрированы с помощью времяпролетного tandemного масс-спектрометра с матричной ионизацией (MALDI-TOF) Axima Confidence (Shimadzu, Япония) в диапазоне m/z 1—5000. Раствор исследуемого вещества с концентрацией $\sim 10^{-5}$ моль/кг наносили на твердую подложку, используя в качестве матрицы 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHBA).

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР зарегистрированы на спектрометре Avance-500 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 500 МГц при 293 К. Использован широкополосный зонд спектрометра 5 мм $^1\text{H}/^{31}\text{P}/\text{D}$ -BBz-GRD Triple Resonance Broad Band Probe (TBI). Регистрация спектров осуществлена при химических сдвигах (δ) от -5 до $+15$ м.д. В качестве внутреннего стандарта использованы сигналы дейтерированного растворителя DMSO- d_6 или D_2O . С целью изучения взаимодействия ФС–носитель посредством ЯМР-спектроскопии весовым методом готовили серию растворов с концентрацией трикационного хлорина $5 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ моль/кг, к полученным пробам добавляли солюбилизующие добавки Твин 80 ($m_{\text{Твин 80}} = 0$ — 0.08 моль/кг) или ПВП ($m_{\text{ПВП}} = 0$ — 0.015 моль/кг).

Оптимизация геометрии $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ выполнена с помощью пакета программ Gaussian 09 с использованием теории функционала плотности (DFT), функционала B3LYP и базисного набора CC-pVDZ. Для оптимизированных структур с целью характеристики геометрии и энергетики ассоциативных взаимодействий ФС проведен NBO-анализ, рассчитаны энергии стабилизации несвязывающих орбиталей ($E_{\text{ст}}$, кДж/моль) и перенос заряда ($q_{\text{ст}}$, ед. з.) в ходе образования водородных связей [38].

Результаты и их обсуждение. Спектроскопия ЯМР позволяет получать надежную информацию об особенностях структуры агрегатов ароматических МГЦ и специфического взаимодействия ФС с различными пассивными носителями в водных растворах. Так, ЯМР-спектральный анализ [39—41] с применением 1D- и 2D-методик позволил не только установить факт дезагрегации ФС порфиринового и хлоринового типа в присутствии некоторых мицеллярных ПАВ, биосовместимых полимеров, циклодекстринов, фосфолипидов и других солюбилизаторов, но и выявить центры взаимодействия тетрапиррольных МГЦ с молекулами носителей и характер их локализации в структуре соответствующих наночастиц.

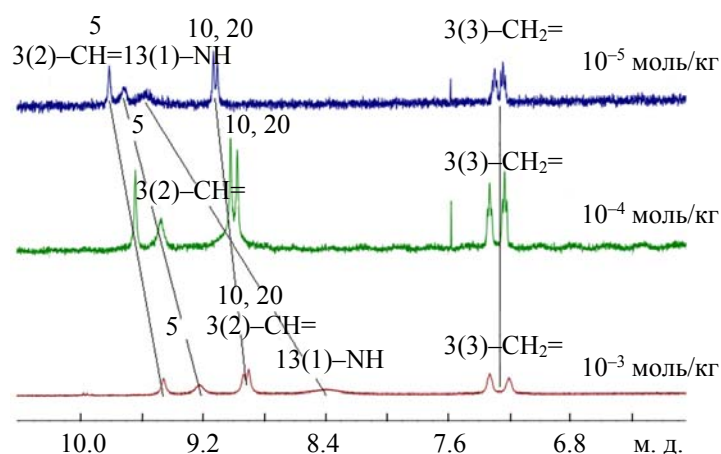


Рис. 1. Концентрационная зависимость сигналов протонов в ароматической области спектра ^1H ЯМР трикационного хлорина в D_2O , $T = 293$ К

С целью подтверждения предположений об особенностях ассоциации/агрегации трикационного хлорина, высказанных ранее на основе данных, полученных для воды и водных растворов солюбилизаторов с помощью ЭСП, флуоресценции и метода ДРС [7, 12, 26—34], проведены ЯМР-спектральные исследования, направленные на изучение влияния природы растворителя (D_2O и $\text{DMSO}-d_6$, табл. 1), концентрации ФС (рис. 1) и температуры (рис. 2), а также добавок пассивных носителей Твин 80 и ПВП (рис. 3) на состояние исследуемого ФС в водных растворах.

Характер изменения спектров ЯМР $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ (5 ммоль/кг) в дейтерированных DMSO и воде показывает, что в среде органического растворителя, в отличие от водного раствора (рис. 2), ФС находится в молекулярной форме, что согласуется с данными, полученными в сравнимых условиях методом ДРС [28]. Переход от дипольного апротонного DMSO [41] к водным растворам сопровождается смещением в слабое поле сигналов протонов (^1H ЯМР) и атомов углерода (^{13}C ЯМР) в мезоположении 5 макрогетероцикла, а также сигналов винильной группы в положении 3 (табл. 1). В то же время сигналы ^1H и ^{13}C атомов в мезоположениях 10 и 20, а также NH-протона в амидной группе в положении C(13-1) претерпевают сильнополюсный сдвиг. Изменения, сопровождающиеся уширением

ем сигналов, обусловлены как возникновением агрегатов ФС в водной среде, так и изменением поляризационных характеристик растворителя (табл. 1).

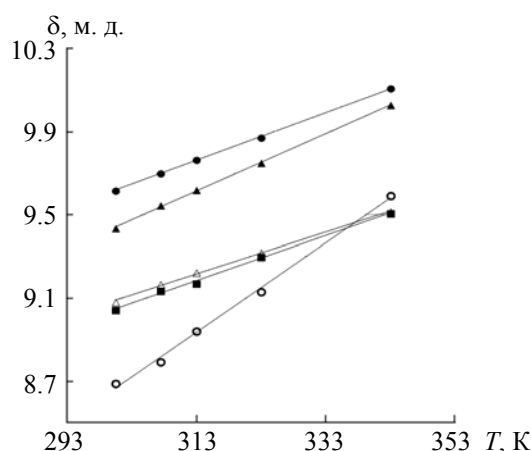


Рис. 2. Температурная зависимость химических сдвигов протонов ароматической области ^1H ЯМР спектра $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ в D_2O в области 301—343 К: *мезо*-5 (●), 3(2)-CH= (▲), *мезо*-10 (Δ), *мезо*-20 (■), 13(1)-CONH (○)

Т а б л и ц а 1. Химические сдвиги некоторых сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР трикатионного хлорина в D_2O и $\text{DMSO}-d_6$ (293 К, $m_{\text{ФС}} \approx 10^{-3}$ моль/кг)

Фрагмент МГЦ	^1H			^{13}C		
	D_2O	DMSO	$\Delta\delta^{**}$	D_2O^*	DMSO	$\Delta\delta^{**}$
<i>мезо</i> -5-CH	9.580	9.136	−0.444	97.68	94.80	−2.88
<i>мезо</i> -10-CH	9.029	9.825	0.796	95.04	99.50	4.46
<i>мезо</i> -20-CH	8.978	9.825	0.847	95.04	101.56	6.52
3(2)-CH=	9.362	7.246	−2.116	97.24	68.68	−28.56
3(3)-CH ₂ -	7.356	5.389	−1.967	68.41	37.45	−30.96
13(1)-CONH	8.602	9.493	0.891	—	—	—

* Химические сдвиги ^{13}C взяты из 2D-ЯМР-эксперимента (HSQC).

** Сдвиг рассчитан по формуле $\Delta\delta = \delta_{\text{DMSO}} - \delta_{\text{D}_2\text{O}}$ (м.д.).

Анализ спектров ^1H ЯМР трикатионного хлорина, измеренных в водных растворах при концентрациях ФС 10^{-3} — 10^{-5} моль/кг и температурах 301—343 К, показывает, что при концентрации 10^{-3} моль/кг сигналы трех протонов в *мезо*-положениях Н-5, Н-10 и Н-20 $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ при комнатной температуре сильно уширены, что характерно для агрегированных форм МГЦ (рис. 1). Уменьшение концентрации хлорина в растворе сопровождается слабопольным сдвигом и уменьшением полуширины сигналов протонов, что обусловлено разрушением агрегатов. Тем не менее форма сигналов неагрегированного ФС, наблюдаемая в DMSO, в водном растворе не достигается даже при $m_{\text{ФС}} = 10^{-5}$ моль/кг, что свидетельствует о неполной дезагрегации трикатионного хлорина при снижении его концентрации. По-видимому, в рассматриваемых условиях разрушаются только наноагрегаты ФС, а продукты ассоциации, размер которых ниже нановеличин и не позволяет зафиксировать их методом ДРС [26, 28, 34], сохраняются и вносят вклад в уширение сигналов протонов в спектре ЯМР.

Согласно данным квантово-химических расчетов DFT, B3LYP (рис. 4), параметры димера в случае $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ оцениваются как 0.30 и 0.25 нм по длине и высоте ячейки, что существенно ниже наноразмерных. Это означает, что ЯМР-спектроскопия позволяет регистрировать образование в водных растворах хлоринов не только наноагрегатов, но и продуктов ассоциативных взаимодействий ФС [34, 40].

В ходе квантово-химических расчетов получены несколько близких по энергии оптимизированных структур продуктов димерной агрегации исследуемого хлорина. Наиболее энергетически стабильная структура $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ (рис. 4) не только формируется за счет слабых гидрофобных взаимодействий [41—44], но и образует водородные связи ($q_{\text{CT}} > 0.01$ ед. з.; $l < 3$ Å [38]) между амидными и

сложноэфирными группами ($\text{N-H}\dots\text{O}=\text{C}$), а в случае ФС–солюбилизатор — Н-связь протона амидной группы с донорным центром носителя.

Наиболее заметные изменения в спектре ЯМР при дезагрегации в ходе снижения концентрации ФС в водном растворе претерпевают сигналы *мезо*-протона в положении 5, а также протонов групп 3(2)-СН и 13(1)-NH (рис. 1). По-видимому, именно они оказываются наиболее экранированными π -системой соседнего макрогетероцикла при образовании ассоциированной или агрегированной формы ФС. Сигнал NH-группы при концентрации 10^{-3} моль/кг дополнительно уширен за счет обмена с протонами молекул воды, входящей в состав агрегата. В пользу этого свидетельствуют данные ДРС, указывающие на существенный размер агрегатов в разбавленных растворах хлориновых ФС, которые однозначно содержат большое количество молекул воды [33].

Изменения в спектрах ЯМР хлорина, аналогичные рассмотренным выше, происходят и при увеличении температуры (рис. 2). Полученные температурные зависимости химических сдвигов протонов при $m_{\text{ФС}} = 10^{-3}$ моль/кг и 301—343 К также демонстрируют смещение сигналов в область слабого поля, а сдвиги указывают на неполноту образования неассоциированных форм трикационного хлорина с ростом температуры. Сопоставление температурных и концентрационных зависимостей сигналов протонов (рис. 1 и 2) свидетельствует о более эффективном дезагрегирующем воздействии температуры.

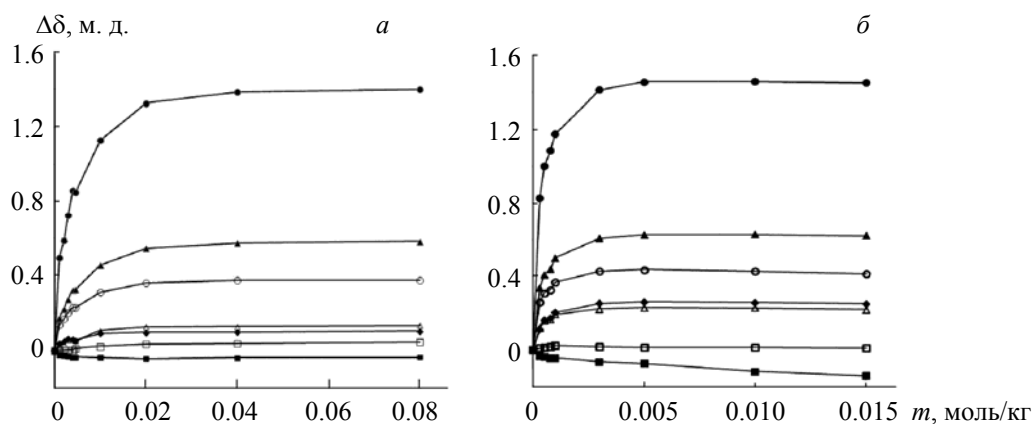


Рис. 3. Кривые титрования $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ в D_2O ($m_{\text{ФС}} = 10^{-3}$ моль/кг) пассивными носителями Твин 80 (а) и ПВП (б): 13(1)-CONH (●), 3(2)-CH= (▲), *мезо*-5-CH (○), *мезо*-10 и 20 (◆ и Δ), 17- и 18-CH (□ и ■)

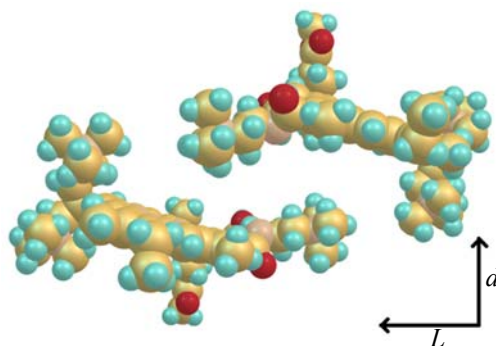


Рис. 4. Оптимизированная структура димера $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ с размерами ячейки $L \approx 30$ Å (длина) и $d \approx 25$ Å (высота) по данным квантово-химических расчетов

Проведенное ЯМР-спектральное исследование влияния солюбилизирующих добавок ПВП и Твин 80 на характер смещения сигналов трикационного хлорина (10^{-3} моль/кг) в водных растворах (рис. 3) демонстрирует, что с увеличением концентрации полимера или мицеллярного ПАВ наиболее подвержены слабopольному сдвигу сигналы амидного NH-протона, а также протонов *мезо*-5 и -CH=. По-видимому, именно эти фрагменты молекулы ФС находятся в непосредственном контакте с лока-

лизированными в мицелле молекулами ПАВ или полимерными цепями ПВП при молекулярном комплексообразовании. Характер кривых титрования $\delta = f(m_{\text{Твин 80 (ПВП)}})$ (рис. 3) свидетельствует об образовании молекулярных комплексов хлорин–носитель, что согласуется с данными спектрофотометрического титрования. Однако в исследуемой области концентраций ФС ($\sim 10^{-3}$ моль/кг) вид спектра ЯМР в очередной раз указывает на неполноту дезагрегации хлорина, поскольку сигналы протонов последнего остаются весьма уширенными даже при значительных избытках солюбилизатора. Изменение химических сдвигов в ходе титрования $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ для обоих изученных средств пассивной доставки практически одинаковое, а кривые $\delta = f(m_{\text{Твин 80 (ПВП)}})$ выходят на плато до концентрации ПВП $5 \cdot 10^{-3}$ и $4 \cdot 10^{-2}$ моль/кг для Твин 80 (5- и 40-кратный мольный избыток носителей). Таким образом, дезагрегирующие добавки ПВП в миллимолярный водный раствор ФС более эффективны (рис. 3) по сравнению с добавками Твин 80, что согласуется с данными ДРС. Согласно полученным ранее результатам ДРС водными растворами катионных хлоринов [28, 33], разрушение агрегатов ФС происходит уже при небольшом соотношении ФС/ПВП, тогда как в случае Твин 80 обычно требуются 60–100 и более кратные избытки ПАВ.

Для уточнения характера межмолекулярных взаимодействий при образовании комплекса ФС–полимерный носитель в водных растворах миллимолярной концентрации МГЦ получен ROESY-спектр раствора трикатионного хлорина с добавкой ПВП ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/кг) (рис. 5). Данный тип двумерной ЯМР-спектроскопии позволяет наблюдать кросс-пики взаимодействующих ядер, которые пространственно близки друг к другу, но при этом могут находиться в составе различных молекул. Анализ спектра ROESY показывает, что образующийся комплекс, устойчивость которого определяется в основном ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, дополнительно стабилизирован за счет водородной связи между NH-протоном амидной группы в положении 13(1) хлорина и карбонильным фрагментом ПВП, что согласуется с результатами квантово-химических расчетов.

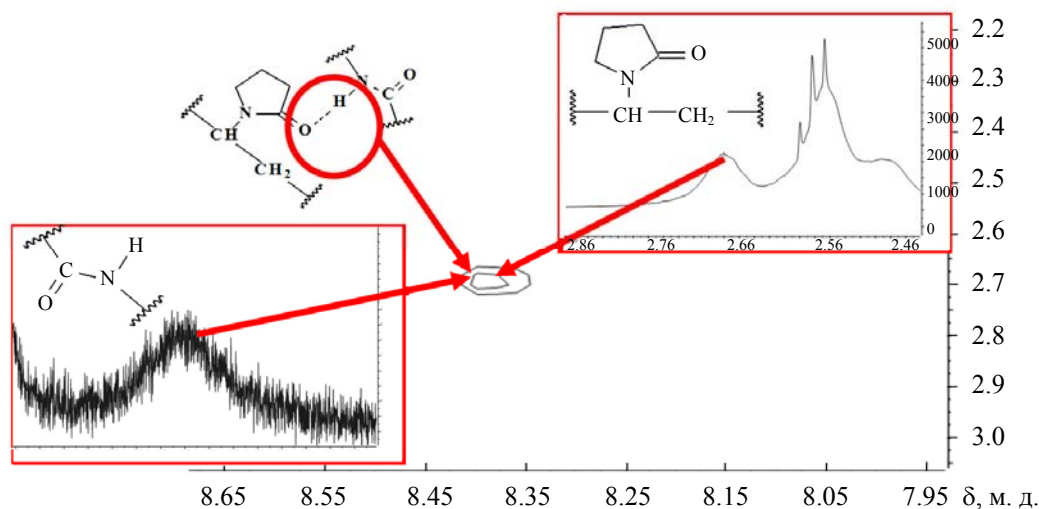


Рис. 5. Фрагмент спектра ROESY водного раствора трикатионного хлорина, содержащего 10^{-3} моль/кг ПВП ($M = 10000$, 298 К)

Заключение. Результаты ЯМР-спектральных исследований водных растворов производного хлорина e_6 , содержащего три катионные триалкиламмониевые группы, хорошо согласуются с данными абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии [26–34], а также динамического рассеяния света. Трикатионный фотосенсибилизатор ассоциирован даже в микромолярных водных растворах, а увеличение его концентрации на два-три порядка приводит к наноагрегации, проявляющейся в существенном уширении сигналов протонов в ^1H ЯМР-спектре. При этом смещения сигналов протонов, входящих в макрогетероциклический остов молекулы фотосенсибилизатора, позволяют выявить центры, ответственные за агрегацию хлоринов природного происхождения. Методом ЯМР-спектроскопии регистрируется образование в растворе катионного хлорина $\text{H}_2\text{Chl}^{3+}$ не только наноагрегатов, но и ассоциированных форм макрогетероциклов. Добавки 5–40-кратных мольных избытков Твин 80

и поливинилпирролидона, применяемых в фотодинамической терапии в качестве пассивных носителей фотосенсибилизатора, приводят к разрушению наноагрегатов. С применением двумерной ЯМР-спектроскопии ROESY впервые установлено, что взаимодействие трикатионного хлорина с молекулой поливинилпирролидона в водном растворе дополнительно осуществляется за счет Н-связывания амидного NH-протона фотосенсибилизатора с кислородом карбонильной группы полимера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-13-00398, <https://rscf.ru/project/21-13-00398/>) с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИХР РАН и ИГХТУ при поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-671).

- [1] **R. Bonnett.** Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, Amsterdam, Gordon and Breach Sci. Publ. (2000)
- [2] **Е. В. Филоненко, Л. Г. Серова.** Biomed. Photon., **5**, N 2 (2016) 26—37
- [3] **А. В. Кустов, Д. Б. Березин, А. И. Стрельников, Н. П. Лапочкина.** Противоопухолевая и анти-микробная фотодинамическая терапия: механизмы, мишени, клинко-лабораторные исследования, под ред. А. К. Гагуа, Москва, Ларго (2020)
- [4] **D. Van Straten, V. Mashayekhi, H. S. De Bruijn, S. Oliveira, D. J. Robinson.** Cancers, **9**, N 19 (2017) 1—54
- [5] **J. M. Dabrowski, L. G. Arnaut.** Photochem. Photobiol. Sci., **14** (2015) 1765—1780
- [6] **J. F. Algorri, M. Ochoa, P. Roldán-Varona, L. Rodríguez-Cobo, J. M. López-Higuera.** Cancers, **13** (2021) 4447
- [7] **A. V. Kustov, D. B. Berezin, V. P. Zorin, Ph. K. Morshnev, N. V. Kukushkina, M. A. Krestyaninov, T. V. Kustova, A. I. Strelnikov, E. V. Lyalyakina, T. E. Zorina, O. B. Abramova, E. A. Kozlovtsseva.** Pharmaceutics, **15** (2023) 61
- [8] **O. I. Koifman, T. A. Ageeva, N. S. Kuzmina, V. F. Otvagin, A. V. Nyuchev, A. Yu. Fedorov, D. V. Belykh, N. Sh. Lebedeva, E. S. Yurina, S.A. Syrбу, M. O. Koifman, Yu. A. Gubarev, D. A. Bunin, Yu. G. Gorbunova, A. G. Martynov, A. Yu. Tsivadze, S. V. Dudkin, A. V. Lyubimtsev, L. A. Maiorova, M. B. Kishalova, M. V. Petrova, V. B. Sheinin, V. S. Tyurin, I. A. Zamilatskov, E. I. Zenkevich, Ph. K. Morshnev, D. B. Berezin, E. A. Drondel, A. V. Kustov, V. A. Pogorilyy, A. N. Noev, E. A. Eshtukova-Shcheglova, E. A. Plotnikova, A. D. Plyutinskaya, N. B. Morozova, A. A. Pankratov, M. A. Grin, O. B. Abramova, E. A. Kozlovtsseva, V. V. Drozhzhina, E. V. Filonenko, A. D. Kaprin, A. V. Ryabova, D. V. Pominova, I. D. Romanishkin, V. I. Makarov, V. B. Loschenov, K. A. Zhdanova, A. V. Ivantsova, Yu. S. Bortnevskaia, N. A. Bragina, A. B. Solovieva, A. S. Kuryanova, P. S. Timashev.** Macroheterocycles, **15**, N 4 (2022) 207—304
- [9] **Y. Liu, R. Qin, S. A. J. Zaat, E. Breukink, M. Heger.** J. Clin. Transl. Res., **1**, N 3 (2015) 140—167
- [10] **F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, W. Buchalla, E. Hellwig, A. Al-Ahmad, T. Maisch.** Critical Rev. Microbiol., **44**, N 5 (2018) 571—589
- [11] **G. B. Kharkwal, S. K. Sharma, Y. Y. Huang, T. Dai, M. R. Hamblin.** Lasers Surg. Medicine, **43**, N 7 (2011) 755—767
- [12] **D. B. Berezin, S. O. Kruchin, N. V. Kukushkina, E. A. Venediktov, M. O. Koifman, A. V. Kustov.** Photochem., **3**, N 1 (2023) 171—186
- [13] **C. Donohoe, M. O. Senge, L. G. Arnaut, L. C. Gomes da Silva.** Biochim. Biophys. Acta (BBA) Rev. Cancer, **1872**, N 2 (2019) 188308
- [14] **N. Malatesti, I. Munitic, I. Jurak.** Biophys. Rev., **9** (2017) 149—168
- [15] **S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka.** Biomed. Pharmacother., **106** (2018) 1098—1107
- [16] **L. Sobotta, P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, J. Mielcarek.** Eur. J. Med. Chem., **175** (2019) 72—106
- [17] **J. Zhang, C. Jiang, J. P. F. Longo, R. B. Azevedo, H. Zhang, L. A. Muehlmann.** Acta Pharm. Sinica B, **8**, N 2 (2018) 137—146
- [18] **H. Abrahamse, M.R. Hamblin.** Biochem. J., **473**, N 4 (2016) 347—364
- [19] **G. Pratviel.** Coord. Chem. Rev., **308** (2016) 460—477
- [20] **M. Caterino, F. D’Aria, A. V. Kustov, D. V. Belykh, I. S. Khudyaeva, O. M. Starseva, D. B. Berezin, Ya. I. Pylina, T. Usacheva, J. Amato, C. Giancola.** Int. J. Biol. Macromol., **145** (2020) 244—251

- [21] **R. Giovannetti**. In: *Nanotechnology and Nanomaterials, Macro to Nano Spectroscopy*, Ed. J. Uddin, Rijeka, InTech (2012) 87—108
- [22] **I. Yakavets, M. Millard, V. Zorin, H.-P. Lassalle, L. Bezdetnaya**. *J. Contr. Release*, **304** (2019) 268—287
- [23] **T. M. Zhiyentayev, U. T. Boltaev, A. B. Solov'eva, N. A. Aksenova, N. N. Glagolev, A. V. Chernjak, N. S. Melik-Nubarov**. *Photochem. Photobiol.*, **90**, N 1 (2014) 171—182
- [24] **M. Q. Mesquita, C. J. Dias, M. G. P. M. S. Neves, A. Almeida, M. A. F. Faustino**. *Molecules*, **23**, N 10 (2018) 2424
- [25] **N. Maldonado-Carmona, T. S. Ouk, S. Leroy-Lhez**. *Photochem. Photobiol. Sci.* (2022) 1—33
- [26] **Д. Б. Березин, Т. Н. Солодухин, О. В. Шухто, О. М. Старцева, И. С. Худяева, Д. В. Белых, А. В. Кустов**. *Изв. РАН. Сер. хим.*, **7** (2018) 1273—1279
- [27] **A. V. Kustov, D. V. Belykh, N. L. Smirnova, E. A. Venediktov, T. V. Kudayarova, S. O. Kruchin, D. B. Berezin**. *Dyes Pigm.*, **149** (2018) 553—559
- [28] **Д. В. Батов, А. В. Кустов, С. О. Кручин, В. В. Макаров, Д. Б. Березин**. *Журн. структ. химии*, **60**, № 3 (2019) 461—466
- [29] **A. V. Kustov, M. A. Krestyaninov, S. O. Kruchin, O. V. Shukhto, T. V. Kustova, D. V. Belykh, I. S. Khudyaeva, M. O. Koifman, P. B. Razgovorov, D. B. Berezin**. *Mend. Commun.*, **31**, N 1 (2021) 65—67
- [30] **A. V. Kustov, P. K. Morshnev, N. V. Kukushkina, N. L. Smirnova, D. B. Berezin, D. R. Karimov, O. V. Shukhto, T. V. Kustova, D. V. Belykh, M. V. Mal'shakova, V. P. Zorin, T. E. Zorina**. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (2022) 5294
- [31] **А. В. Кустов, Ф. К. Моршнеv, О. В. Шухто, Н. Л. Смирнова, Н. В. Кукушкина, О. И. Койфман, Д. Б. Березин**. *Изв. РАН. Сер. хим.*, **72**, № 2 (2023) 566—573
- [32] **D. B. Berezin, A. V. Kustov, M. A. Krestyaninov, D. V. Batov, N. V. Kukushkina, O. V. Shukhto**. *J. Mol. Liq.*, **283** (2019) 532—536
- [33] **А. В. Кустов, Д. Б. Березин, С. О. Кручин, Д. В. Батов**. *Журн. физ. химии*, **96**, № 4 (2022) 582—588
- [34] **О. В. Шухто, И. С. Худяева, Д. В. Белых, Д. Б. Березин**. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*, **64**, № 11 (2021) 86—96
- [35] **A. Lavi, H. Weitman, R. T. Holmes, K. M. Smith, B. Ehrenberg**. *Biophys. J.*, **82**, N 4 (2002) 2101—2110
- [36] **A. P. Gerola, T. M. Tsubone, A. Santana, H. P. M. de Oliveira, N. Hioka, W. Caetano**. *J. Phys. Chem. B*, **115**, N 22 (2011) 7364—7373
- [37] **Е. А. Венедиктов, Е. Ю. Туликова, Е. П. Рожкова, Д. В. Белых, И. С. Худяева, Д. Б. Березин**. *Макрогетероциклы*, **10**, № 3 (2017) 295—300
- [38] **Д. Б. Березин, М. А. Крестьянинов**. *Журн. структ. химии*, **55**, № 5 (2014) 868—876
- [39] **I. Gjuroski, J. Furrer, M. Vermathen**. *Molecules*, **26**, N 7 (2021) 1942
- [40] **M. Hädener, I. Gjuroski, J. Furrer, M. Vermathen**. *J. Phys. Chem. B*, **119**, N 36 (2015) 12117—12128
- [41] **I. Gjuroski, E. Girousi, C. Meyer, D. Hertig, D. Stojkov, M. Fux, N. Schnidrig, J. Bucher, S. Pfister, L. Sauser, H.-U. Simon, P. Vermathen, J. Furrer, M. Vermathen**. *J. Contr. Release*, **316** (2019) 150—167
- [42] **A. V. Kustov, O. A. Antonova, N. L. Smirnova**. *J. Chem. Thermodyn.*, **130** (2019) 114—118
- [43] **A. V. Kustov, N. L. Smirnova, D. B. Berezin, M. B. Berezin**. *J. Chem. Thermodyn.*, **89** (2015) 123—126
- [44] **Ю. Я. Филков**. *Растворитель как средство управления химическим процессом*, Ленинград, Химия (1990)