



005004145

На правах рукописи

ПОПОВА Татьяна Евгеньевна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПОРФИНА И ПОРФИРАЗИНА С
ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ТРАНСПОРТНЫМИ АГЕНТАМИ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

- 1 ДЕК 2011

Иваново – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте химии растворов им. Г. А. Крестова РАН

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент

Лебедева Наталья Шамильевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Андреев Владимир Петрович

доктор химических наук, профессор

Альпер Геннадий Аркадьевич

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ярославский государственный технический университет»**

Защита состоится « 15 » декабря 2011 г. в 13⁰⁰ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.106.01 при Учреждении Российской академии наук Институте химии растворов им. Г. А. Крестова РАН по адресу: 153045, г. Иваново, ул. Академическая, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института химии растворов им. Г. А. Крестова РАН по адресу: 153045, г. Иваново, ул. Академическая, д. 1.

Автореферат разослан 15 ноября 2011 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета



Антина Е. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из актуальных проблем современной химии является синтез и исследование свойств ароматических макрогетероциклических соединений (МГС) – потенциальных лекарственных препаратов для фотодинамической терапии. Подавляющее большинство фотосенсибилизаторов (первого поколения – порфирины, второго поколения – фталоцианины и хлорины) и разрабатываемые в настоящее время препараты третьего поколения – являются гидрофобными молекулами, имеющими низкую растворимость в водных средах. Липофильные МГС являются менее токсичными и более эффективными по сравнению с водорастворимыми (Jori G. J. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1996). По этой причине целесообразно проводить синтез МГС, содержащих наряду с гидрофобными гидрофильными функциональными заместителями, и использовать транспортные системы для доставки МГС непосредственно в патологический очаг. При использовании МГС, заключенных в транспортную систему, минимизируется их разрушение и инактивация, предотвращается возникновение побочных эффектов. Отсутствие систематических исследований о взаимодействии МГС с синтетическими и биополимерами не позволяет создать научные основы прогнозирования свойств получаемых комплексов. Особую актуальность представляют исследования, направленные на выявление структурно-геометрических параметров молекул МГС, обеспечивающих эффективное взаимодействие с эндогенными носителями без изменения их нативной конформации.

Целью работы является выявление основных закономерностей взаимодействия макрогетероциклических соединений фталоцианинового, порфиринового, порфиразинового ряда с потенциальными транспортными агентами: поли-N-винилпирролидоном, полиметакрилатом гуанидина и сывороточным альбумином. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- методами ЭСП, ИК спектроскопии, вискозиметрии изучить процессы комплексообразования 5,10,15,20-тетрафенилпорфирина (ТФП), его гидроксо-замещенного производного 5,10,15,20-тетракис(4'-гидрокси-3',5'-ди-третбутилфенил)-21Н,23Н-порфирина (ТБГФП) с поли-N-винилпирролидоном (ПВП). Установить влияние гидроксогрупп в молекуле порфирина на состав и устойчивость комплексов с ПВП;
- для впервые синтезированных тетраантрахинонпорфиразинов (ТАП) определить состояние макрогетероциклических молекул в водных средах, тип димеризации, термодинамическую устойчивость образующихся димеров и фотофизические свойства (время жизни, квантовый выход триплетного состояния, фотоустойчивость) тетраантрахинонпорфиразинов в водных растворах в зависимости от природы заместителя, металла комплексообразователя, среды;
- методами ЭСП, ИК спектроскопии, вискозиметрии, ДСК изучить процессы комплексообразования металлопроизводных водорастворимых фталоцианинов и тетраантрахинонпорфиразинов с полиметакрилатом гуанидина (ПМАГ) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) в темновой фазе. Установить влияние природы заместителя, макрокольца МГС состав, устойчивость образующихся полимерных комплексов и конформационное состояние БСА;
- оценить влияние фотоактивации МГС на транспортные системы, варьируя интенсивность и продолжительность фотооблучения;
- выдать практические рекомендации по применению того или иного транспортного агента для заданного фотосенсибилизатора.

Научная новизна. Впервые исследованы процессы комплексообразования ТБГФП с ПВП. Установлено, что введение ОН-групп в молекулу тетрафенилпорфирина способствует специфическому взаимодействию с ПВП,

приводящему к образованию устойчивых комплексов. Образование радикальных форм гидроксозамещенного порфирина под действием света не происходит, что обусловлено иммобилизацией порфириновых молекул на полимере, осуществляющейся за счет Н-связывания периферийных заместителей макрогетероцикла с С=О-группами полимера. Впервые исследовано состояние ТАП в водных растворах, установлен тип формирующихся димеров и ассоциатов. Проанализировано влияние электронных и стерических эффектов периферийных заместителей ТАП на термодинамическую устойчивость димеров. Впервые установлено, что расширение ароматической системы макрогетероцикла при переходе от фталоцианинов к ТАП приводит к уменьшению квантового выхода триплетного состояния, но к увеличению времени в возбужденном триплетном состоянии молекулы и большей устойчивости макроцикла к фотолизу. Впервые проведено комплексное исследование взаимодействия металлокомплексов ТАП с ПМАГ и БСА, установлен состав и устойчивость комплексов, выявлены конформационные изменения полимера, обусловленные комплексобразованием с МГС. Доказано расположение молекул ТАП в белковой глобуле.

Практическая значимость. Полученные данные о свойствах ТАП позволяют считать данные МГС перспективными и рекомендовать их для дальнейших исследований. Найденные закономерности взаимосвязи строения МГС и его локализации в белковой глобуле позволят целенаправленно модифицировать макрогетероциклическую молекулу для эффективного транспорта МГС эндогенным альбумином. Полученные сведения об увеличении терморезистентности альбумина в составе комплекса с ТАП до 120 °С могут представлять интерес для збулио- и криобиологии и химической промышленности.

Личный вклад автора состоит в постановке задач исследования, получении и обработке большинства экспериментальных данных, анализе результатов исследования, написании в соавторстве научных публикаций, формулировке основных выводов и положений диссертации.

Апробация работы. Основные положения, результаты и выводы, содержащиеся в диссертации, докладывались на V Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации» (Иваново, 2008); III, IV, V Региональной конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Иваново, 2008, 2009, 2010); VI Всероссийском семинаре по структурной макрокинетике (Черноголовка, 2008); XVII International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia RCCT 2009 (Казань, 2009); V Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы» (Нальчик, 2009); Межвузовской научно-практической конференции «Актуальные вопросы общей и специальной химии» (Иваново 2009); Конференции аспирантов, курсантов. (Иваново, 2010); II Молодежной школе «Физико-химические методы в химии координационных соединений» (Суздаль, 2011), XXV Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Суздаль, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации, 11 тезисов докладов на конференциях различного уровня.

Структура работы: работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, основных итогов работы, списка литературы и приложения. Диссертация изложена на 206 страницах, содержит 65 рисунков и 23 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР включает полученные к настоящему времени сведения о структурных особенностях и фотофизических свойствах МГС,

физико-химических основах метода фотодинамической терапии онкологических заболеваний, о комплексообразовании МГС с полимерами, физико-химических методах анализа полимерных комплексов МГС. На основании анализа литературных данных обоснованы цель и задачи исследования.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. Приводятся методики очистки исследуемых веществ (рис. 1), и контроля их степени чистоты. Описаны методики подготовки образцов для вискозиметрического, спектрального, калориметрического и ДСК исследований.

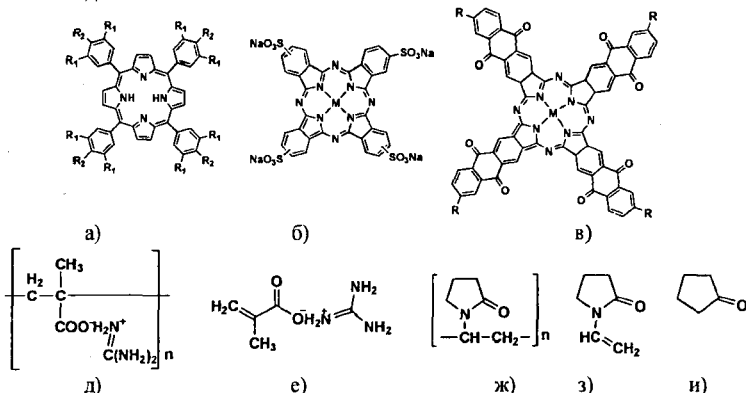


Рис. 1. а) ТФП: $R_1=R_2=H$; ТБГФП: $R_1=C_4H_9$, $R_2=OH$ б) $ZnPcS$: $M=Zn$; $HOAlPcS$: $M=AlOH$; в) $HOAlPcPhS$: $M=AlOH$, $R=PhSO_3Na$; $HOAlPcS$: $M=AlOH$, $R=COONa$; $HOAlPcS$: $M=AlOH$, $R=SO_3Na$; $CoTAPcS$: $M=Co$, $R=PhSO_3Na$; $CoTAPcS$: $M=Co$, $R=COONa$; $CoTAPcS$: $M=Co$, $R=SO_3Na$; д) ПМАГ; е) МАГ; ж) ПВП; з) N-винилпирролидон; и) циклопентанон.

Вискозиметрические исследования проводились с помощью капиллярного вискозиметра типа ВДК-2. ДСК исследования проводились на калориметре DuPont 2100 Thermal Analyst, DSC 91¹ и DSC 204 F 1 Netzsch. ИК исследования были выполнены на спектрофотометре VERTEX 80v и на Avatar 360FTVIRESP. Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Unicо 2800. Спектры Т-Т поглощения МГС и кинетику дезактивации триплетного состояния измеряли на установке импульсного лазерного фотолиза². Растворы МГС облучали импульсами неодимового лазера («Solar», длительность импульса 10 нс, энергия до 70 мДж при 354 нм). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре SM2203 «SOLAR». Использованы источники света: дуговая ртутно-кварцевая лампа ДКР-120, гелий-неоновый лазер АЛОК-2М ($\lambda=633$ нм, 15-20 мВт), облучатель «Иволга-ОМС-01» с монохроматором ЛМ-4. Подробно описаны методики проведения эксперимента, калибровки оборудования, математической обработки данных и расчета погрешности.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Взаимодействие порфиринов с поли-N-винилпирролидоном. Для оценки характера взаимодействия порфиринов с ПВП использован метод электронной абсорбционной и ИК спектроскопии. ИК спектры исходных реагентов и образовавшегося полимерного комплекса позволяют сделать вывод об образовании водородной связи между $C=O$ группой полимера и протоном OH -групп ТБГФП. Состав комплекса был

¹ Исследования проводились в ИФХ ПАН (г. Варшава) под руководством проф. В.Зеленкевича.

² Исследования проводились в Центре Фотохимии РАН (г.Москва) под руководством чл.-корр. РАН А.К. Чибисова.

оценен исходя из гидродинамических свойств растворов ПВП и его комплекса с ТБГФП (табл. 1), он составил 1:6 и 1:5 по методу Фикенчера и использованием значения характеристической вязкости, соответственно. На 60 элементарных звеньев ПВП приходится одна молекула ТБГФП. Полученные данные позволяют сделать ряд выводов: во-первых, совпадение (в пределах 5%) средневязкостных молекулярных масс ПВП (74000 и 77066 г/моль), определенных разными методами, позволяет говорить о работоспособности указанных методов применительно к комплексам ПВП с порфиринами. Во-вторых, молекулярная масса ПВП, определенная из данных по вязкости, не равна истинному значению молекулярной массы полимера (40000 г/моль), что в основном связано с тем, что макромолекула при движении захватывает молекулы растворителя (этанол : хлороформ 30:1 v/v), сольватирующие полимер. В-третьих, тот факт, что характеристическая вязкость растворов ПВП пропорциональна молекулярной массе в степени 0,68, позволяет говорить о том, что полимер в растворе имеет форму закрученного клубка (Сидельковская В. П. *Химия N-винилпирролидона и его полимеров*. 1970).

Таблица 1. Гидродинамические характеристики растворов ПВП и его комплекса с ТБГФП в смешанном растворителе хлороформ : этанол = 1:30 v/v

с(ПВП) г/100мл	$\eta_{\text{отн}}$	$\eta_{\text{уд}}$	$\eta_{\text{прив}}$	$\eta_{\text{уд}}/C$	k	K	M_v , определенная по методу Фикенчера, г/моль	$[\eta]$	M_v , определенная графически из $[\eta]$ г/моль
0									
0.0136	1.006	0.005	0.392	39.216	0.0414	41	78571	40	77066
0.0212	1.009	0.008	0.390	39.023	0.0413	41	77953		
0.0400	1.015	0.015	0.376	37.555	0.0403	40	73883		
0.0507	1.019	0.018	0.364	36.387	0.0396	40	70762		
0.0716	1.026	0.025	0.355	35.520	0.0390	39	68318		
0.0859	1.029	0.029	0.345	34.526	0.0383	38	65675		
0.1065	1.035	0.035	0.330	32.995	0.0373	37	64692		
0.1422	1.043	0.043	0.305	30.463	0.0355	36	62277		
							74000		
с(компл) г/100мл									
0									
0.0156	1.007	0.007	0.418	41.802	0.0429	43	85359	42	82290
0.0282	1.012	0.012	0.417	41.732	0.0428	43	84953		
0.0485	1.020	0.020	0.414	41.417	0.0426	43	83773		
0.0587	1.024	0.024	0.413	41.288	0.0425	42	83262		
0.0796	1.033	0.033	0.411	41.145	0.0423	42	82543		
0.0959	1.039	0.039	0.404	40.374	0.0418	42	80300		
0.1865	1.075	0.075	0.403	40.273	0.0414	41	78663		
0.1922	1.075	0.075	0.389	38.851	0.0406	41	75068		
							80820		

Состав и константа устойчивости комплекса ПВП с ТБГФП были оценены по уравнению Скэтчарда, и составили 1:6 и 4.18×10^4 М, соответственно. Результаты согласуются с данными, полученными из характеристической вязкости, и подтверждают тезис о схожести конформации полимера и его комплекса с ТБГФП. При изучении гидродинамических свойств растворов полимера, полимерного комплекса установлено, что при УФ облучении растворов ПВП их вязкость увеличивается, т.е. протекает дальнейшая полимеризация ПВП. В присутствии порфиринов этот

процесс полностью (ТФП) или частично компенсируется (ТБГФП) деструкцией полимера. Меньшая фотокаталитическая активность ТБГФП по сравнению с ТФП свидетельствует о том, что образования радикальных форм ТБГФП не происходит, а деструкция молекул ПВП осуществляется за счет генерации порфиринами 1O_2 .

3.2. Тетраантрахионпорфирины, фотофизические свойства, состояние в растворах. Переход от Фц к ТАП за счет аннелирования молекулы Фц фрагментами замещенного 1,4-нафтохинона, сопровождается bathochromным сдвигом Q-полосы. В водных средах, ЭСП ТАП характеризуются максимумами поглощения в области 690 нм (НОАТАП) и 677 нм (СоТАП). Природа периферийных заместителей ТАП незначительно влияет на положение полос поглощения, что может быть следствием ослабления влияния заместителей по мере их удаления от порфиразинового хромофора. Однако заместители ТАП влияют на характер спектра. Анализ концентрационной зависимости оптической плотности растворов исследуемых ТАП, показал, что закон ЛББ не выполняется, что свидетельствует о наличии ассоциативных процессов. Ассоциация ТАП (Рис.2) приводит к уменьшению интенсивности, уширению и смещению в коротковолновую область Q-полосы. Для определения типа ассоциатов ТАП было проведено спектральное исследование при варьировании свойств среды (увеличении концентрации электролита, изменении температуры, дегазировании растворов, насыщении кислородом, титровании электронодонорными лигандами). Установлено, что НОАТАП димеризуются по π - π -типу, для СоТАП характерно формирование ассоциатов за счет донорно-акцепторного взаимодействия одного из периферийных заместителей одной молекулы ТАП с металлокомплексообразователем другой молекулы ТАП.

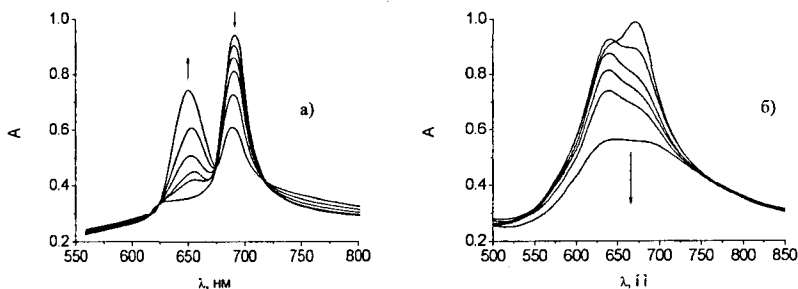


Рис. 2. ЭСП НОАТАПС (а) и СоТАПС (б) в растворе при добавлении NaCl (0.05+0.35 M).

Термодинамические характеристики диссоциации димеров НОАТАП в водных средах определены методом калориметрии разведения (табл.2). Большая устойчивость димеров (НОАТАПС)₂ по сравнению с (НОАТАПС)₂, связана не

Таблица 2. Термодинамические характеристики диссоциации (ТАП)₂ в водных средах (0.05M NaCl)

ТАП	$K_{дисс}$, л/моль	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/(моль·К)
НОАТАПPhS	в мономерном состоянии		
НОАТАПС	9.78×10^{-5}	0.11	-76
НОАТАПС	8.67×10^{-7}	11.89	-76

*Погрешность составляет 8% для K, 5% для ΔH и 13% для ΔS .

только с большим средством к протону карбоксильной группы по сравнению с сульфогруппой, но и с тем, что сульфо-заместители, имеющие приблизительно в 1.4 раза больший ван-дер-ваальсовый радиус, чем карбоксильные заместители, препятствуют π - π -взаимодействию между

двумя ароматическими системами молекул ТАП в димерной структуре.

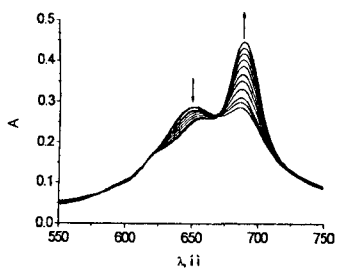


Рис. 3. ЭСП НОАТАПС в растворе при добавлении Ру (0+0.09 М).

Существование НОАТАПРhS при данных условиях преимущественно в мономерной форме также подчеркивает значимость стерического фактора при копланарном взаимодействии молекул. π - π -Димеры координационно ненасыщенных МГС диссоциируют при взаимодействии с пиридином (Рис. 3). Титрование НОАТАП пиридином изобестическое и свидетельствует о смещении ассоциативного равновесия в сторону мономеризации. Комплексообразование ТАП с пиридином приводит к уменьшению устойчивости димеров (табл. 3).

Таблица 3. Термодинамические характеристики процессов $(ТАП)_2 \leftrightarrow 2ТАП$; $ТАП + Ру \leftrightarrow ТАП \cdot Ру$ в водном растворе (0.05NaCl) при 298.15K

ТАП	K_1 л/моль	ΔH_1 , кДж/ моль	ΔS_1 , Дж/ (моль·К)	K_2 л/моль	ΔH_2 , кДж/ моль	ΔS_2 , Дж/ (моль·К)
НОАТАПС	$3.56 \cdot 10^{-4}$	58.49	130	130	-29.54	-59
НОАТАПС	$2.25 \cdot 10^{-5}$	69.91	145	105	-30.19	-63

*Погрешность составляет 8% для K_1 и K_2 , 5% для ΔH и 13% для ΔS .

Термодинамические характеристики комплексообразования НОАТАП с пиридином индифферентны к природе периферийного замещения в молекуле МГС, что обусловлено пространственной удаленностью заместителя от реакционного центра. Полученные термодинамические характеристики процессов $(НОАТАП)_2 \leftrightarrow 2НОАТАП$ и $НОАТАП + Ру \leftrightarrow НОАТАП \cdot Ру$ позволили на каждом этапе титрования рассчитать равновесные концентрации димерных структур в растворе и вычислить количество пиридина, которое необходимо добавить в раствор для смещения равновесия в сторону мономеризации ТАП. Полученная зависимость для НОАТАПС близка к экспоненциальной. Добавление свыше 150-кратного мольного избытка пиридина в раствор не существенно отразится на процентном содержании димеров ТАП, что важно т.к. ТАП не растворяется в пиridине и слишком большой избыток его в растворе нежелателен. Вид зависимости процентного содержания $(НОАТАПС)_2$ от мольного соотношения Ру/ТАП свидетельствует, что пиридин не является эффективным комплексообразующим реагентом для НОАТАПС. В случае НОАТАПС в качестве транспортного агента может быть рекомендована система, содержащая пиридиновый атом азота. Для карбоксипроизводных ТАП введение в состав транспортной системы ароматического амина нецелесообразно.

Кроме состояния МГС в растворах важной характеристикой МГС является их устойчивость к фотолизу. При облучении УФ светом в течение 30 минут интенсивность поглощения в ЭСП ТАП не изменялась, в то время как по данным (Ozoemena K., J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 2001) фотолиз водорастворимых Фц в аналогичных условиях протекал от 15 до 80% в зависимости от количества сульфо-групп Фц. На рис. 4 в качестве примера приведен разностный спектр Т-Т поглощения НОАТАПС, измеренный к различным моментам времени после лазерного импульса, а также кинетические кривые дезактивации молекул МГС в триплетном состоянии (рис.5).

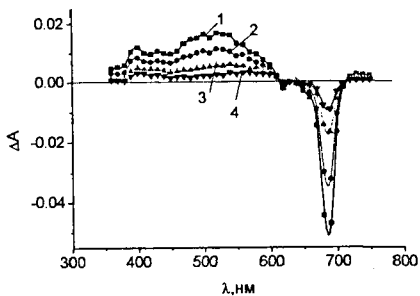


Рис 4. Разностный спектр поглощения HOA1TAPS в воде, измеренный через 10 (1), 100 (2), 500 (3) и 2000 мкс (4) после возбуждения лазерным импульсом 354 нм.

Сравнение кинетических кривых затухания триплет-триплетного поглощения демонстрирует, что ТАП обладают меньшим квантовым выходом возбужденного триплетного состояния по сравнению с HOA1CuS, но время жизни возбужденного триплетного состояния в случае ТАП значительно больше, чем аналогичная характеристика Фц. В отличие от HOA1ТАП, CoТАП не проявляет изменений в поглощении под действием лазерного импульса, что согласуется с теоретическими представлениями об электронном

строении металла комплексообразователя. Электронная конфигурация Co^{2+} ($3d^7$), в отличие от Al^{3+} ($2p^6$), имеющего устойчивое энергетическое состояние, не устойчива, что не исключает другие пути диссипации поглощенной световой энергии. Учитывая данные сведения, а так же высокую склонность к ассоциации и тип ассоциатов нецелесообразно рассматривать CoТАП в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для ФДТ.

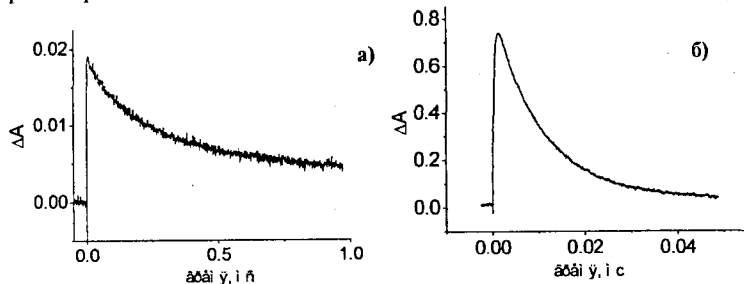


Рис 5. Кинетика затухания триплет-триплетного поглощения в обескислороженном водном растворе, $\lambda = 354$ нм: а) HOA1TAPS, б) HOA1CuS.

3.3. Взаимодействие полиметакрилата гуанидина с тетрасульфофталоцианином цинка и тетрапирролинпорфиринами в водной среде. Для водных растворов ПМАГ характерен эффект полиэлектролитного набухания. Установлено, что стабилизация конформации полимера во времени (160 часов) достигается в интервале концентраций хлорида натрия 0.05-0.08 М. В связи с тем, что увеличение концентрации NaCl вызывает ассоциацию МГС (Рис.2), поэтому все дальнейшие исследования были выполнены в воде на фоне NaCl с концентрацией 0.05 М, т.е. на минимальной границе указанного выше диапазона. Использование фонового электролита для изучения растворов МГС необходимо и направлено на подавление солевого эффекта, так как при высоких суммарных концентрациях ионов изменение коэффициентов активности с концентрацией происходит менее резко. Таким образом, добавление большого избытка соли способствует постоянству коэффициентов активности.

Неожиданным оказалось уменьшение вязкости (от 0.5 до 2.6%) растворов ПМАГ при добавлении МГС ($ZnCuS$, HOA1ТАPhS, HOA1ТАПС, HOA1ТАПIS). В данном случае конформационные изменения, обусловленные комплексообразованием МГС с

полимером, оказывают на гидродинамические характеристики растворов ПМАГ большее влияние, чем увеличение молекулярной массы. Уменьшение вязкости растворов ПМАГ при комплекссообразовании с МГС свидетельствует о локализации МГС на поверхности полимерного клубка. Поэтому корректно определить состав полимерного комплекса из данных по вязкости не возможно. Метод Скэтчарда не приемлем, так как растворы ПМАГ являются не истинными и при высоких концентрациях полимера проявляется эффект Тиндаля. Для уточнения центров взаимодействия, ответственных за комплекссообразование ПМАГ с МГС (ZnФцS, НОАІТАРPhS, НОАІТАРС, НОАІТАПС), был проведен ИК спектральный анализ ПМАГ, МГС и комплекса МГС – ПМАГ. Для корректного отнесения сигналов были проведены *ab initio* расчеты ИК спектра МАГ - мономера ПМАГ, теоретические расчеты были выполнены методом DFT/LSDA, базис 3-21g с использованием программы GAUSSIAN 03. Проведенные расчеты показали хорошее соответствие экспериментальных и рассчитанных спектров МАГ. В работе (Хаширова С. Ю. Дис. д. хим. наук 2009.) показано, что основное отличие в ИК спектрах МАГ и ПМАГ заключается в поглощении в области 938 и 1008 см⁻¹, характеризующей неплоские деформационные Н₂С=С-колебания, остальные полосы, активные в ИК спектрах МАГ, присутствуют и в ИК спектрах ПМАГ, данные сведения позволили провести аналогию в отнесении полос МАГ и ПМАГ. Сравнительный анализ ИК спектров кристаллических образцов индивидуальных ПМАГ, МГС и комплекса МГС – ПМАГ показал, что в комплексе МГС – ПМАГ сохраняется большинство полос, присущих полимеру и соответствующему МГС. Наряду с этим зафиксированы следующие спектральные изменения: 1) интенсивность полоса в области 2210 см⁻¹ в спектре ПМАГ, характеризующей асимметричные валентные колебания NH₂ гуанидинового фрагмента, в спектре комплекса ПМАГ-МГС (ZnФцS, НОАІТАРPhS, НОАІТАРС, НОАІТАПС) значительно уменьшается; 2) очень интенсивная и узкая полоса в области 1400 см⁻¹ в спектре МГС (ZnФцS, НОАІТАРPhS, НОАІТАПС), характеристичная для колебаний О=S в SO₃, исчезает в спектре комплекса ПМАГ-МГС. В случае комплекссообразования ПМАГ с НОАІТАРС регистрируется смещение на 40 см⁻¹ в высокочастотную область полосы, локализованной в случае индивидуального НОАІТАРС в области 1664 см⁻¹ и характеризующей валентные колебания атомов С и О СОО-группы. Перечисленные спектральные изменения позволяют заключить, что иммобилизация изученных МГС на ПМАГ осуществляется за счет взаимодействия сульфогрупп (ZnФцS, НОАІТАРPhS, НОАІТАПС) или карбоксильных групп НОАІТАРС с гуанидиновым фрагментом полимера.

Облучение растворов полимерных комплексов ПМАГ-МГС приводит к деструкции полимера, что подтверждалось ИК спектральным анализом по увеличению интенсивности полос в области 1008 и 940 см⁻¹. Следовательно, ПМАГ не целесообразно рассматривать в качестве транспортной системы для МГС, т.к. невозможно достигнуть требуемой селективности фотоокисления, кроме того продукты фотоокисления транспортной системы могут оказывать биоцидное действие.

3.4. Взаимодействие бычьего сывороточного альбумина с тетрасульфофталоцианином алюминия и тетраантрахинонпорфиринами в водных средах. Использование в качестве транспортной системы эндогенных белков имеет ряд несомненных преимуществ, среди которых в первую очередь биосовместимость, нетоксичность. БСА, являясь полиэлектролитом также чувствителен к катион-анионному окружению и демонстрирует эффект полиэлектролитного набухания. С учетом результатов изменения кинематической вязкости растворов, содержащих 0.08 масс.% альбумина от концентрации фонового электролита по истечении 160 часов установлено, что концентрация хлорида натрия 0.05M является оптимальной для изучения БСА – МГС систем. .

Комплексообразование МГС с БСА вызывает изменения в электронных спектрах поглощения МГС аналогичные зарегистрированным ранее при титровании пиридином (рис.3). При титровании водных растворов ТАП альбумином димеры распадаются т.к. на спектрах уменьшается интенсивность поглощения в области 650нм и увеличивается в области 690нм. Кроме того, Q-полоса мономера ТАП претерпевает bathochromное смещение на 3-5 нм в зависимости от исследуемого ТАП. Смещение равновесия Д-М в сторону мономеризации может быть связано с комплексообразованием белковых макромолекул с мономерным ТАП. Следовательно, равновесие: $(\text{НОАТАП})_2 \leftrightarrow 2 \text{НОАТАП}$ (1) будет смещаться вправо в соответствии с принципом Ле-Шателье, так как продукт будет связываться в молекулярный комплекс в соответствии с уравнением: $n\text{НОАТАП} + \text{БСА} \leftrightarrow \text{БСА} \cdot (\text{НОАТАП})_n$ (2). С другой стороны, состояние равновесия (1) существенно зависит от содержания NaCl в растворе. Уменьшение концентрации NaCl приводит к смещению агрегационного

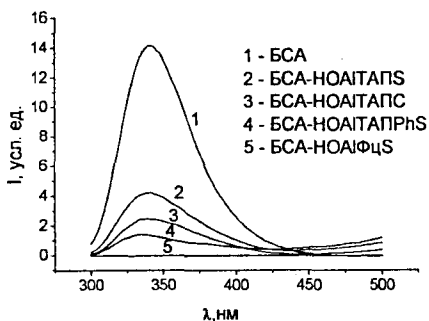


Рис. 6. Флуоресцентные спектры БСА и комплексов БСА с МГС ($1.2 \cdot 10^{-4} \text{M}$).

равновесия в сторону мономеризации (рис.2). Возможно, что белок взаимодействуя с фоновым электролитом, способствует мономеризации ТАП по указанному механизму. Для уточнения характера межмолекулярного взаимодействия альбумина с ТАП было проведено анализ спектров флуоресценции БСА в водных с растворах (0.05 NaCl) при добавлении ТАП. Спектр флуоресценции раствора БСА при возбуждении светом 295 нм представлен на рис. 6 линия 1. Максимум флуоресценции приходится на 340нм, что является типичным для белка в нативной конформации и обусловлено возбуждением триптофановых остатков аминокислот (*D. Barreca. Biophys. Chem. 2010*). Титрование растворов БСА МГС приводит к уменьшению относительной флуоресценции. Титрование растворов альбумина НОАИФцS при достижении концентрации $1.2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ приводит к полному тушению флуоресценции белка. По данным (*B. Valeur, Molecular Fluorescence. Principles and Applications 2002; A. Sulkowska Journal of Molecular Structure, 2007*) тушение флуоресценции БСА может быть обусловлено либо конформационными изменениями белка, либо связано с переносом энергии с флуорофоров альбумина на ТАП. При этом комплексообразователь-тушитель должен быть расположен не далее 10 нм от флуорофора. Триптофановые остатки занимают 135 и 214 положение в полипептидной цепи и локализованы в субдоменах IB и II A (Рис.7), следовательно, МГС должны располагаться в указанных субдоменах или в непосредственной близости от них. Результаты титрования по Скэтчарду (табл.4), полученные для системы, содержащий НОАИФц хорошо согласуются с данными (*David Phillips. Pure & Appl. Chem., 1995*), согласно которым константа диссоциации полимерного комплекса НОАИФцS- БСА составляет $1 \times 10^{-5} \text{л} \cdot \text{моль}^{-1}$.

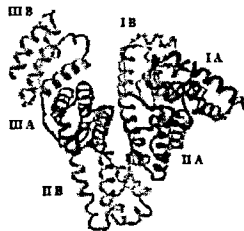


Рис.7 БСА (*Yunnan Fang. Dissertation. The Ohio State University, 2004*).

Таблица 4. Физико-химические параметры комплексов БСА-МГС

МГС	$K_{дисс.}$, л/моль	n	R^2
НОАИФцС	1.02×10^{-5}	2	0.979
НОАИТАПСО	1.05×10^{-5}	1	0.978
НОАИТАПPhS	5.57×10^{-5}	4	0.993
НОАИТАПС	9.23×10^{-8}	2	0.857

*Погрешность $K_{дисс.}$ составляет 2%

Наибольшую устойчивость демонстрирует комплекс БСА с НОАИТАПС, что, безусловно связано с большим сродством к протону карбоксильной группы по сравнению с сульфозаместителями ТАП. ТАП имеют несколько реакционных центров способных отвечать за связывание МГС с белками. Для определения реакционных центров была использована ИК спектроскопия. Образование комплекса БСА – НОАИТАПС приводит к уменьшению интенсивности полосы в области 835 см^{-1} (валентные колебания С-Н ароматических углеводородов) и смещению её положения на 10 см^{-1} в высокочастотную область. Колебательная мода в области 700 см^{-1} , обусловленная колебаниями С-Н ароматических фрагментов, уменьшается в ИК спектрах комплексов ТАП с БСА. Поглощение в области 1492 см^{-1} связанное с симметричными валентными колебаниями С=О в COONa-группе при комплексообразовании НОАИТАПС с БСА исчезает. В ИК спектре индивидуального НОАИТАПС данная полоса средней интенсивности. Положение сильных полос, связанных с колебаниями этой же группы атомов, например, валентных асимметричных колебаний С=О, локализованных в области $1580\text{-}1680 \text{ см}^{-1}$, при комплексообразовании ТАП с белком анализировать проблематично, что связано с интенсивным поглощением белка в данном спектральном диапазоне. Валентным колебаниям С-О в ИК спектрах ТАП, соответствуют полосы поглощения в области $1005\text{-}980 \text{ см}^{-1}$, которые в ИК спектрах полимерного комплекса отсутствуют. Слабая полоса в области 1856 см^{-1} , отвечающая колебаниям С=О в антрахиновых фрагментах ТАП в комплексе исчезает.

ИК спектральные проявления комплексообразования сульфозамещенных ТАП с БСА также достаточно информативны. Полоса в ИК спектрах сульфопроизводных ТАП в области 1135 (средняя) обусловленная асимметричными валентными колебаниями в группе SO_3^- при комплексообразовании с белком практически исчезает. Очень интенсивная полоса в области 1366 см^{-1} (НОАИТАПС), 1374 см^{-1} (НОАИТАПPhS), характеристичная для симметричных деформационных колебаний S=O в SO_3^- – заместителе, в спектрах полимерных комплексов также отсутствует. Наряду с этим полностью исчезает при комплексообразовании ТАП с белком чрезвычайно интенсивная полоса в ИК спектрах ТАП при 700 см^{-1} . Для комплексов БСА с НОАИТАПС - уменьшается интенсивность поглощения в области 832 см^{-1} , а в случае комплексов НОАИТАПPhS с БСА указанная полоса исчезает. При связывании ТАП с альбумином значительно уменьшается интенсивность колебательных мод при 1852 см^{-1} (ν С=О, антрахиновых фрагментов НОАИТАПС) 1899 см^{-1} (ν С=О, антрахиновых фрагментов НОАИТАПPhS). Схожие ИК спектральные изменения регистрируются при комплексообразовании НОАИФцС с БСА, а именно исчезают полосы поглощения в области 690 и 899 см^{-1} наряду со значительным уменьшением интенсивности полосы при 1400 см^{-1} . Таким образом комплексообразование ТАП с БСА является многоцентровым, с участием периферийных карбоксильных заместителей ТАП, атомов кислорода антрахиновых фрагментов и ароматической π -системы макрогетероцикла. Имобилизация НОАИФцС на БСА преимущественно осуществляется за счет периферийных сульфо-заместителей.

Один из ключевых вопросов при оценке применимости эндогенной транспортной системы – конформационное состояние при комплексообразовании,

которое традиционно оценивают в случае БСА по анализу положения полос в I-III амидных областях. При анализе конформационных изменений белка, вызванных комплексообразованием с МГС, были проанализированы I и III амидные области (Рис.8), II амидная область исключена из рассмотрения т.к. исследуемые МГС имеют много интенсивных колебательных полос в данном диапазоне. Исходный спектр БСА, полученный в данной работе, типичен для белка в нативной конформации (*D. Barreca. Biophys. Chem. 2010*), в I амидной области регистрируется один интенсивный широкий пик с максимумом в области 1653 см^{-1} , в III амидной области регистрируются три пика в области $1242, 1262, 1304 \text{ см}^{-1}$.

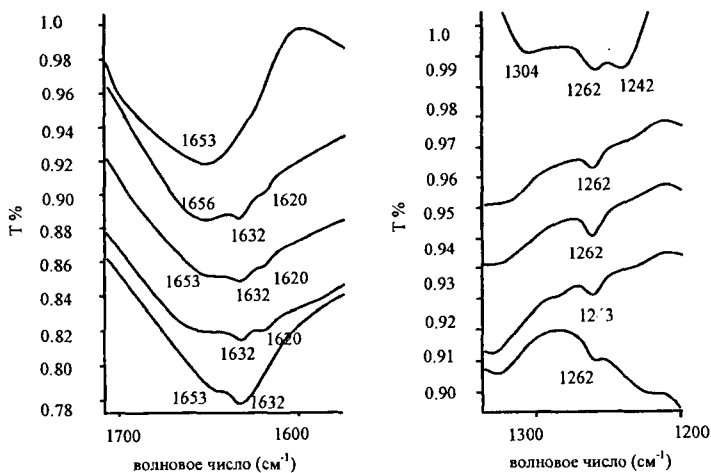


Рис 8. ИК спектры I и III амидных областей альбумина (слева – I, справа – III). Сверху вниз: БСА, БСА - НОАТАПС, БСА-НОАТАПPhS, БСА - НОАТАПС, БСА с НОА1ФцS.

Комплексообразование БСА с ТАП приводит к конформационным изменениям во вторичной белковой структуре, что отражается в уширении полосы поглощения в I амидной области, появлению пика в области 1620 см^{-1} , что по сведениям (*M. Jackson, H.H. Mantsch. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1995; E.A. Cooper et. Al. Pharm. Biotechnol. 1995*) вызвано формированием β -складчатости. Кроме того, наряду с интенсивным поглощением в области 1652 см^{-1} регистрируется интенсивное поглощение при 1632 см^{-1} , которое обусловлено появлением коротких сегментов цепи, содержащих α -спирали (*D. Barreca. Biophys. Chem. 2010*). В III амидной области регистрируется смещение максимума поглощения в высокочастотную область, связанное с α -структурированием белка, увеличение интенсивности поглощения, связанное с β -структурой и практически полное исчезновение полос, связанных с разупорядоченными участками белковой молекулы. Выявленные спектральные изменения позволяют говорить о промотировании комплексообразованием ТАП с белком локальных конформационных переходов из разупорядоченной в β -структуру (*Y. Liu, et.al Spectrochim. Acta, Part A. 2003*). Иные спектральные изменения вызывает комплексообразование НОА1ФцS с БСА (в I амидной области наряду с интенсивным поглощением в области 1630 см^{-1} , новый пик при 1620 см^{-1} не появляется), указанные данные совместно с изложенными выше литературными сведениями позволяет говорить о том, что взаимодействие НОА1ФцS с БСА вызывает конформационное

изменение: α -спирали \rightarrow коротко сегментные α -складки.

Другой важной характеристикой, позволяющей получить сведения об особенностях взаимодействия ТАП с белком, является устойчивость БСА к температурному воздействию. На кривой ДСК БСА в температурном интервале до 100 °С регистрируется эндо-эффект с $T_{\max} = 56^\circ\text{C}$, связанный с термической денатурацией альбумина, что подтверждалось ИК спектральным анализом исходных и прогретых до температуры 56°С образцов. В прогретых образцах зафиксировано значительное уменьшение интенсивности поглощения в области 476 и 525 см⁻¹ (валентные колебания S-S), что позволяют говорить об изменении третичной и вторичной структуры альбумина. Полученные сведения совпадают с литературными данными (Shun-Li Wang et al, Biophys. Chem. 2005), свидетельствующими, что разрушение дисульфидных мостиков, стабилизирующих структуру альбумина, лежит в основе пускового механизма денатурации альбуминов. Следует отметить, что T_{\max} эффекта тепловой денатурации белка существенно зависит от различных факторов, в том числе от наличия электролитов и выпариванием из раствора БСА с фоновым электролитом (0.05M), эндо-эффект, связанный с термической денатурацией альбумина, регистрируется с $T_{\max} = 69^\circ\text{C}$. Комплексообразование БСА с ТАП существенно увеличивает резистентность белка к денатурации, в то время как фталоцианин не оказывает заметного влияния (табл.5). Учитывая результаты исследования методом флуоресцентной спектроскопии, очевидно, что НОАIFцS находится в непосредственной близости к триптофановым аминокислотным остаткам белковой цепи и локализованы внутри субдоменов IB и II A.

Таблица 5. Термическая денатурация БСА, его комплексов с МГС

Вещество	$T_{\max}, ^\circ\text{C}$
БСА	56
БСА+NaCl	69
БСА+NaCl+НОАIFцS	68
БСА+NaCl+НОАITAPC	120
БСА+NaCl+НОАITAPhS	128
БСА+NaCl+НОАITAPIS	129

Молекулы ТАП расположены дальше от триптофановых остатков и их расположение позволяет дополнительно стабилизировать белковую молекулу, наиболее вероятно локализация ТАП между субдоменами IB – IIВ и IA- IIIA, чему способствует больший размер молекулы ТАП по сравнению с фталоцианином и наличие нескольких центров связывания макрогестероцикла с белковой глобулой.

Оценка гидродинамических свойств растворов БСА с МГС в условиях фотоактивации МГС в спектральном диапазоне от ближнего УФ до 850 нм показала, что БСА в условиях эксперимента фотолизу не подвергается. Таким образом, учитывая устойчивость и состав комплексов ТАП с БСА, сохранение нативной конформации белка в составе комплекса, а так же фотостабильность белка при фотоактивации МГС, можно заключить, что альбумин может быть использован как транспортный белок для ТАП и система ТАП-БСА может быть рекомендована для дальнейших исследований

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Впервые проведено систематическое экспериментальное исследование взаимодействия новых фотосенсибилизаторов порфиринового, порфиразинового ряда с синтетическими и биополимерами. Установлено, что:

1. Поли-N-винилпирролидон может быть использован в качестве транспортной системы для 5,10,15,20-тетракис(4'-гидрокси-3',5'-ди-третбутилфенил)-21Н,23Н-

порфирина, т.к. образуется устойчивый полимерный комплекс за счет образования водородных связей между С=О группой полимера и протоном гидроксильных групп порфирина, на 60 элементарных звеньев ПВП приходится одна молекула порфирина, при этом конформация полимера существенных изменений не претерпевает, а при световом облучении транспортная система не подвергается деструкции.

2. Склонность к димеризации НОАТАП увеличивается в ряду: НОАТАПPhS < НОАТАПС < НОАТАПС. Большая термодинамическая устойчивость димеров (НОАТАПС)₂ по сравнению с (НОАТАПС)₂, обусловлена не только большим сродством к протону карбоксильной группы по сравнению с сульфо-заместителем, но и стерическими препятствиями, оказываемыми более объемными заместителями.
3. НОАТАП по сравнению с НОАТФцS значительно устойчивее к фотолузу, обладают меньшим квантовым выходом возбужденного триплетного состояния, но большим временем жизни возбужденного триплетного состояния.
4. Имобилизация изученных МГС на ПМАГ осуществляется за счет взаимодействия сульфогрупп (ZnФцS, НОАТАПPhS, НОАТАПС) или карбоксильных групп НОАТАПС с гуанидиновым фрагментом полимера ПМАГ. Уменьшение кинематической вязкости растворов комплексов ПМАГ с МГС по сравнению с растворами ПМАГ свидетельствует о том, что имобилизация МГС осуществляется на поверхности полимера, что приводит к растягиванию полимерного клубка и стабилизации его конформации.
5. УФ облучение и облучение светом дальневолновой части спектра приводит к деструкции ПМАГ, в присутствии МГС деструкция полимера протекает в 2-4 раза эффективнее, в зависимости от МГС, поэтому ПМАГ не целесообразно использовать в качестве транспортного агента.
6. Комплексообразование МГС с БСА является многоцентровым, с участием периферийных заместителей и π-системы МГС, атомов кислорода антрахиноновых фрагментов (в случае ТАП) и приводит к локальным конформационным изменениям во вторичной белковой структуре. При этом ТАП локализованы между противолежащими субдоменами IA - IIIA и IIIB - IV, обеспечивая их «сшивку» и повышенную терморезистентность белка.
7. БСА является оптимальной транспортной системой для ТАП, т.к. обеспечивает их эффективное связывание ($K_b = 10^5 + 10^7$), сохраняя при этом нативную структуру и демонстрируя фотостабильность, оставляя вакантными основные сайты связывания и может быть рекомендован для дальнейших исследований.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. N. Lebedeva, T. Popova, M. Kozbial, M. Wszelaka-Rylik, Yu. Gubarev, P. Gierycz. Influence of complex formation with tetraantraquinoporphyrazines and tetrasulphophthalocyanine on thermal stability of bovine serum albumin. // Journal of Porphyrines and Phthalocyanines. V. 15. 2011. p. 223-229
2. Popova T., Lebedeva N., Semeykin A. Interaction between poly-N-vinylpyrrolidone, 5,10,15,20-tetraphenylporphyrine and 5,10,15,20-tetra(4'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)-21H, 23H-porphyrine. // Journal of Solution Chemistry. V. 39. 2010. p. 1113-1121.
3. Павлычева Н.А., Попова Т.Е., Лебедева Н.Ш., Хаширова С.Ю., Вьюгин А. И. Межмолекулярное взаимодействие полиметакрилата гуанидина с натриевой солью цинк(II)тетра-4-сульфопталоцианина в водной среде. // ЖСХ. 2009. т. 50. № 5. стр. 975-980.

4. Попова Т.Е., Павлычева Н.А., Лебедева Н.Ш., Хаширова С.Ю. Получение композита на основе полиметакрилата гуанидина и натриевой соли цинкового комплекса тетразамещенного фталоцианина. // В тезисах докладов V Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация для нанотехнологий, техники и медицины». Иваново 23-26 сентября 2008 г., с. 186.
5. Попова Т. Е. Исследование взаимодействия полиметакрилата гуанидина с натриевой солью цинк(II)тетра-4-сульфофталоцианина в водной среде. // В тезисах докладов III Региональной конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем». Иваново 18-21 ноября 2008 г., с.54.
6. Попова Т.Е., Лебедева Н.Ш., Семейкин А. С. Устойчивость тетрафенилпорфиринов к термоокислению. // В тезисах докладов VI Всероссийской школы-семинара по структурной макрокинетики для молодых ученых. Черноголовка 26-28 ноября 2008 г., сс. 96-98.
7. Popova T., Lebedeva N., Semeikin A. Thermodynamic stability poly-N-vinylpyrrolidone and 5,10,15,20-tetra(4'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)-21H, 23H-porphyrine complex. // Abstracts of XVII International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia RCCT. Казань 29 июня – 3 июля 2009 г., с. 487.
8. Попова Т.Е., Лебедева Н.Ш., Семейкин А. С. Получение композита на основе поли-N-винилпирролидона и 5,10,15,20-тетраакис(4'-гидрокси-3',5'-ди-третбутил-фенил)-21H,23H-порфирина. // В материалах V Международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы». Нальчик 10-14 сентября 2009 г., сс. 157-159.
9. Попова Т. Е. Полимерные комплексы поли-N-винилпирролидона с порфиринами. // В тезисах докладов IV Региональной конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем». Иваново 17-20 ноября 2009 г., с. 42.
10. Попова Т. Е. Разработка полимерных препаратов для фотодинамической таргетной терапии. // В материалах Межвузовской научно-практической конференции «Актуальные вопросы общей и специальной химии». Иваново 21-23 декабря 2009 г., с. 49.
11. Попова Т. Е. Состояние тетраантрахинонпорфиразинов в водных растворах. // В материалах Межвузовской конференции аспирантов, курсантов и слушателей. Иваново 7-10 июня 2010 г., с. 50.
12. Попова Т. Е., Губарев Ю. А. Исследование димеризации тетраантрахинонпорфиразинов в водных растворах. // В тезисах докладов V Региональной конференции молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем». Иваново 16-19 ноября 2010 г., сс. 38-39.
13. Попова Т. Е., Захарова Г. В., Губарев Ю. А., Лебедева Н. Ш. Влияние расширения ароматической системы при переходе от фталоцианинов к тетраантрахинонпорфиразинам на физико-химические свойства макрогетероциклических соединений. // В тезисах докладов II Молодежной конференции-школы «Физико-химические методы в химии координационных соединений». Суздаль 6-11 июня 2011 г., с. 266.
14. Лебедева Н. Ш., Попова Т. Е. Особенности взаимодействия алюминиевых комплексов макрогетероциклических соединений с альбумином // В тезисах докладов XXV Международной Чугаевской конференции по координационной химии. Суздаль 6-11 июня 2011. Тез. конф. с. 437.

Автор выражает благодарность своим научным руководителям д.х.н. Лебедевой Н.Ш. и к.х.н. Губареву Ю.А., а также чл.-корр. РАН Чибисову А.К. за помощь при обсуждении результатов.

Подписано в печать 04.11.2011. Формат 60x84 1/16. Бумага писчая.
Усл.печ.л. 0,93. Уч.-изд.л. 1,03. Тираж 80 экз. Заказ 2694

**ФГБОУ ВПО Ивановский государственный
химико-технологический университет**

Отпечатано на полиграфическом оборудовании
кафедры экономики и финансов ФГБОУ ВПО «ИГХТУ»
153000, г. Иваново, пр. Ф. Энгельса, 7