

# ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОРФИРИНОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ХИТОЗАНОВЫХ НОСИТЕЛЯХ

*С.З. Роговина, Н.Н. Глаголев, А.Б. Соловьева, Н.А. Аксенова*

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук,  
Москва, E-mail: berlin@chph.ras.ru

## INVESTIGATION OF CATALYTIC ACTIVITY OF PORPHYRINS IMMOBILIZED ON CHITOSAN CARRIERS

*S.Z. Rogovina, N.N. Glagolev, A.B. Solov'eva, N.A. Aksenova*

Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,  
Moscow, E-mail: berlin@chph.ras.ru

### ABSTRACT

The behavior of some anionic porphyrins and phthalocyanines (dimegin, phthaloditazine, photosence, photogem) in water solutions of nature (chitosan, chitosan sulfate, carboxymethylchitin, carboxymethylcellulose) and synthetic (polyallylamine) polymers is investigated. It is shown that polymers containing free amino groups (chitosan, polyallylamine) in water solutions form complexes with tetrapyrroles, which initiate their following aggregation with changing of electronic spectra. The activity of mentioned above tetrapyrroles as photosensibilizers of generation of singlet oxygen in water medium with the sample of tryptophan photooxidation reaction is studied and it is shown that the aggregation decreases their catalytic activity. It is established that the aggregation does not occur in the presence of polymers where amino groups are absent (carboxymethylchitin, carboxymethylcellulose) or partially substituted (chitosan sulfate) and also in the presence of monomer hexamethylenediamine.

Иммобилизация порфиринов на носителях различной природы с целью их дальнейшего применения в качестве катализаторов химических реакций имеет ряд преимуществ перед гомогенными катализаторами, поскольку облегчает их последующую регенерацию. Обычно системы порфирин – полимерный носитель получают либо путем совместного растворения полимера и порфирина и последующего отлива пленки, либо путем пропитки готовой пленки раствором порфирина. При этом в зависимости от природы используемого полимера может происходить химическое взаимодействие между порфирином и полимерным носителем. Каталитическая активность порфиринов, иммобилизованных на полимерных носителях в результате образования химических связей в общем случае определяется как собственной электронной структурой порфирина, так и надмолекулярной структурой исходного полимера и типом образующейся порфирин - полимерной связи.

Тетрапиррольные порфириновые и фталоцианиновые фотосенсибилизаторы (ТФС), генерирующие при освещении синглетный кислород, который активно окисляет субстрат опухолевых тканей, успешно применяются при фотодинамической терапии – эффективном методе лечения онкологических заболеваний. В последнее время ТФС начинают активно применять в иммобилизованном состоянии, используя для этих целей различные полимерные пленки, гели и пены [1]. Применение иммобилизованных порфириновых фотосенсибилизаторов позволяет решить сразу несколько проблем фотодинамической терапии: во-первых, отпадает необходимость во введении порфиринов (внутривенном, внутримышечном или подкожном) в организм пациента, а во-вторых, исключается их светотоксическое воздействие на организм и, вследствие этого, загрязнение его продуктами фотодеструкции порфиринов. Очевидно, что полимеры, используемые в качестве носителей для ТФС, должны быть нетоксичными, биосовместимыми и не уменьшать фотокаталитической активности ТФС.

С этой точки зрения природный полисахарид хитозан и его производные представляют особый интерес в качестве носителей для иммобилизации ТФС. Они обладают бактерицидностью и биodeградируемостью, что обуславливает их широкое применение в медицине. Использование хитозана для иммобилизации лекарственных препаратов и биологически активных соединений получило в последние годы бурное развитие [напр. 2, 3], однако работы по иммобилизации порфиринов в литературе практически отсутствуют [4].

В данной работе изучено влияние хитозана и его аналогов на каталитическую активность порфириновых и фталоцианиновых сенсibilизаторов (фотосенс, фотогем, фотодитазин, димегин), применяемых в настоящее время в фотодинамической терапии, в процессе генерации  $^1\text{O}_2$  в водной среде на примере модельной реакции фотоокисления триптофана.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы тетрапиррольные фотосенсibilизаторы: натриевая соль 2,7,12,18-тетраметил-3,8-ди(1-метоксиэтил)-13,17-ди(2-оксикарбонилэтил) порфирина (димегин), N-метил-ди-D-глюкаминная соль хлорина  $\text{E}_6$  (фотодитазин), смесь простых эфиров гематопорфирина (фотогем), алюминиевый комплекс сульфированного фталоцианина (фотосенс) и полисахариды: хитозан (ХТЗ) ( $M_w = 340000$ ,  $\text{СЗ} = 0,85$ ), сульфат хитозана (СХТЗ) ( $M_w = 70000$ ,  $\text{СЗ} = 0,8$ ), натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) ( $M_w = 250000$ ,  $\text{СЗ} = 1,2$ ) и карбоксиметилхитин (КМХТ) ( $M_w = 80000$ ,  $\text{СЗ} = 0,95$ ), а также полиаллиламин (ПАА), гексаметилендиамин (х.ч.) и триптофан (ч.д.а.).

Фотоокисление триптофана (ТФ) проводили в бидистиллированной воде кислородом воздуха при комнатной температуре в кварцевой кювете. Освещение реакции смеси осуществляли светом ртутной лампы ДРШ-1000 с водяным фильтром и соответствующими стеклянными светофильтрами: Интенсивность падающего света определяли на измерителе мощности ИМО-2. За кинетикой реакции следили по изменению концентрации триптофана, которую определяли по уменьшению оптической плотности полосы поглощения триптофана с  $\lambda = 280$  нм. Электронные спектры поглощения (ЭСП) ТФС снимали на спектрофотометре UV-VIS (Genesys<sup>TM</sup>-2) в водных растворах и на кварцевых подложках. Квантовые выходы реакции фотоокисления ТФ ( $\Phi_{\text{ТФ}}$ ) в присутствии ТФС вычисляли как отношение числа окисленных в начальный момент времени молекул ТФ (рассчитывались по линейному участку кинетической кривой) к числу квантов света, поглощенных ТФС за это время.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение ЭСП исследованных ТФС показало, что в присутствии хитозана происходит изменение ЭСП всех фотосенсibilизаторов: снижается интенсивность и наблюдается уширение полосы  $\text{Core}$  (наиболее интенсивной полосы поглощения в ЭСП тетрапирролов, вызванной исключительно электронными переходами в сопряженной  $\pi$ -системе макроцикла) [5]. Обычно такие изменения в электронных спектрах поглощения тетрапирролов связывают с процессами агрегации, наблюдаемыми в концентрированных растворах ТФС или в твердой фазе, например в пленках типа Лэнгмюра-Блоджетт [6]. В данной работе подобные изменения наблюдались в ЭСП "островковых" пленок димегина и фотодитазина, образующихся на кварцевой подложке при их испарении из водных растворов хитозана. Возможно, изменения такого рода в ЭСП ТФС в присутствии хитозана могут быть связаны с агрегацией молекул порфиринов вокруг свободных аминогрупп полимера.

Для проверки этого предположения было изучено фотоокисление триптофана в присутствии ТФС, иммобилизованных на производных хитозана, в которых аминогруппы частично замещены, — сульфате хитозана и карбоксиметилхитине, а также на натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, отличающейся от хитозана отсутствием в ее структуре свободных аминогрупп, и полиаллиламине — ли-

нейном полимере, имеющем свободную аминогруппу в каждом звене макромолекулы. Оказалось, что натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сульфат хитозана и карбоксиметилхитин не влияют на фотокаталитическую активность и не меняют ЭСП порфиринов. В присутствии же полиаллиламина в ЭСП всех исследованных порфиринов наблюдаются изменения, аналогичные изменениям в ЭСП порфиринов в присутствии хитозана.

С целью количественной оценки влияния указанных полимеров на эффективность процесса фотогенерации синглетного кислорода в присутствии различных ТФС были измерены кинетические параметры процесса: эффективная константа скорости фотоокисления триптофана  $K_{эфф}$  ( $K_{эфф} = \Delta C_{ТФ} / \Delta t \cdot C_{ТФ} \cdot C_{ТФС}$ ) и квантовый выход реакции. Полученные результаты приведены в таблице. Как видно из представленных в таблице данных, в присутствии хитозана величина  $K_{эфф}$  снижается примерно в 10–20 раз, а  $\Phi_{ТФ}$  — в 4–10 раз для всех исследованных ТФС. Аналогичный эффект наблюдается и в присутствии полиаллиламина:  $K_{эфф}$  и  $\Phi_{ТФ}$  уменьшаются в 26 и 13 раз для димегина, в 16 и 7 раз для фотодитазина и в 4 и 3 раза для фотосенса, соответственно.

Кинетические параметры фотоокисления триптофана в воде в присутствии ТФС и водорастворимых полимеров ( $\lambda = 420\text{--}1000$  нм для растворов, содержащих димегин и фотогем, и  $580\text{--}1000$  нм для растворов, содержащих фотодитазин и фотосенс;  $[ТФС] = 1 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $[ТФ] = 2,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $[полимер] = 0,002\text{--}0,003$  г/мл)

ТФС	Полимер	КЭФФ $10^{-2}$ , моль $^{-1}$ ·с $^{-1}$ ·л	ФТФ
Димегин	–	2,6	0,013
Димегин	ХТЗ	0,3	0,003
Димегин	КМЦ	2,2	0,010
Димегин	ХТЗ-F127	1,0	0,005
Димегин	СХТЗ	3,0	0,008
Димегин	КМХТН	2,8	0,006
Димегин	ПАА	0,1	0,001
Фотодитазин	–	1,6	0,007
Фотодитазин	ХТЗ	0,1	0,001
Фотодитазин	КМЦ	1,3	0,006
Фотодитазин	СХТЗ	1,6	0,007
Фотодитазин	ПАА	0,1	0,001
Фотосенс	–	3,0	0,009
Фотосенс	ХТЗ	0,3	0,001
Фотосенс	КМЦ	2,8	0,009
Фотосенс	СХТЗ	3,3	0,008
Фотосенс	ПАА	0,8	0,003
Фотогем	–	2,7	0,013
Фотогем	ХТЗ	0,1	0,001
Фотогем	КМЦ	2,8	0,013

Исходя из полученных данных, можно предположить, что при использовании хитозана и полиаллиламина для иммобилизации ТФС происходит образование комплексов между аминогруппами полимеров и карбоксильными группами порфиринов (димегин, фотодитазин и фотогем) или сульфогруппами (фотосенс), в результате чего наблюдается увеличение локальной концентрации ТФС вблизи полимерных цепей, приводящее к агрегированию порфиринов. Действительно, снижение активности ТФС происходит только в присутствии полимеров, содержащих аминогруппы, поскольку при добавлении в реакционную систему мономер

ра гексаметилендиамина никаких изменений кинетических параметров реакции не наблюдается. Очевидно, протеканием агрегационных процессов может быть обусловлено и наблюдаемое падение фотокаталитической активности тетрапирролов, так как агрегация обычно снижает фотосенсибилизирующую способность ТФС 7.

Поскольку известно, что солюбилизация препятствует агрегации порфиринов [8], было изучено влияние хитозана на каталитическую активность димегина, предварительно солюбилизованного полимерным ПАВ – плуроником F-127 (блок-сополимером этиленоксида и пропиленоксида, 30:70 масс.%). Оказалось, что в этом случае  $K_{эфф}$  и  $\Phi_{тф}$  увеличиваются в 3 и 2 раза соответственно по сравнению с системой хитозан – несолюбилизованный ДМГ (см. таблицу).

Таким образом, в водных растворах хитозана и полиаллиламина наблюдается агрегация молекул ТФС, инициированная образованием ионных связей между аминогруппами макромолекул хитозана или полиаллиламина и карбоксильными группами порфиринов или сульфогруппами фотосенса, сопровождаемая снижением фотокаталитической активности ТФС в реакции окисления триптофана; при использовании производных хитозана с замещенными аминогруппами подобного эффекта не наблюдается.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в качестве полимерного носителя для иммобилизации ТФС и получения фотокаталитически активных образцов следует использовать не хитозан, а его производные с замещенными аминогруппами – сульфат хитозана и карбоксиметилхитин, а также натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы. Другим способом, позволяющим применять хитозан для иммобилизации ТФС, является введение ТФС в хитозан в солюбилизованном состоянии в виде комплекса с плуроником F127.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Bonnett R., Galia A.* // Biotechnol. & Biotechnol. 1994. Eq.8. № 1. P. 68.
2. *Felt O., Buri P., Gurny R.* // Drug. Dev. Ind. Pharm. 1998 V. 24. P. 979.
3. *Paul W., Sharma S.P.* // Pharm. Sci. 2000. № 10. P. 5.
4. *Роговина С.З., Соловьева А.Б., Ахсенова Н.А., Жаров А.А.* // Высокомолек. соед. А. 2004. Т. 46. № 3. С. 421.
5. *К.А.Аскарлов, Б.Д.Березин, Р.П.Евстигнеева и др.* Порфирины: структура, свойства, синтез. М.: Наука, 1985. С. 333.
6. *Tanimura K., Kawal T., Sakata T.* // J. Phys. Chem. 1980. V. 84. P. 751.
7. *Таубер А.Ю., Нижник А.Н., Миронов А.Ф., Гайдук М.И., Григорьянц В.В.* // Биофизика. 1989. Т. 34. Вып. 3. С. 364.
8. *Hioka N., Chowdhary R.K., Chansarkar N., Delmarre D., Sternberg E. and Dolphin D.* // Can. J. Chem. 2002. V. 80. P. 1321.