

АННОТАЦИЯ

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

6D060600 – Химия

Мырзахметов Бауыржан Аскарбекович

Физико-химические свойства и квантово-химические расчеты фотосенсибилизаторов, используемых в фотодинамической терапии

Актуальность темы исследования. Фотосенсибилизаторы (ФС) при применении в фотодинамической терапии (ФДТ) могут изменять свои физико-химические свойства в зависимости от среды после введения в организм человека, а именно, проявлять различные свойства в зависимости от природы среды, температуры, вязкости, концентрации и pH. Поэтому одной из актуальных проблем является изучение физико-химических свойств ФС и определение эффективных условий их применения при лечении методом ФДТ.

Транспорт лекарственных средств в биологической системе зависит от их липофильности. Этот показатель определяет возможность образования комплекса между ФС и рецептором. Всасывание, распределение, метаболизм и вывод лекарственных средств из организма, токсичность – все они относятся к физико-химическим, фармакокинетическим и фармакодинамическим свойствам. Для полного понимания этих перечисленных свойств важным является определение липофильности.

Отмечено, что в основе лечения методом фотодинамической терапии лежит переход ФС в триплетное состояние, образование активных форм кислорода, поглощение и распределение ФС в клетку. Изучение этих свойств с помощью квантовых расчетов, наряду с экспериментальными результатами, дает доступ к важной информации. А именно, получение спектров ФС путем исследования возбужденного состояния, дизайн структур, контроль распределения лекарственных веществ в организме, расчет интенсивности и энергии электронных переходов дают дополнительные возможности в фотохимии и фотобиологии.

Хотя фотодинамическая терапия известна с конца 70-х годов прошлого века, в нашей стране она начала применяться лишь в 2016 году. Официально ФДТ была впервые применена в стенах медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан (МЦ Пим РК) в ноябре 2016 года.

В настоящее время ФДТ, наряду с онкологией, получает широкое применение и в других областях, таких как гинекология, урология, офтальмология. Поэтому актуальным является изучение физико-химических свойств применяемых в лечении препаратов, определение эффективных

параметров их применения путем расчета методами экспериментальной и квантовой химии.

Целью исследовательской работы является изучение физико-химических свойств фотосенсибилизаторов, используемых в фотодинамической терапии, методами экспериментальной и квантовой химии.

Задачи исследования:

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- изучение физико-химических свойств фотосенсибилизаторов в различных растворителях, при различной вязкости, концентрации, температуре и рН среды;

- выбор и обоснование эффективных параметров определения коэффициента разделения и распределения спектрофотометрическими, хроматографическими и квантово-химическими методами;

- получение оптического и вибрационного спектров фотосенсибилизаторов, расчет интенсивности и энергии электронных переходов. методом квантовой химии

Методы исследования. В работе использованы следующие современные физико-химические и квантово-химические методы исследования: УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия, флуоресценция, фосфоресценция, флуоресценция с временным разрешением, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), теория функционала плотности (ТФП).

Научная новизна исследовательской работы и основные результаты:

- Физико-химические свойства фотосенсибилизаторов I и II поколений изучены методами УФ, ИК, флуоресценции, фосфоресценции, флуоресценции с временным разрешением. Хотя изменение полярности среды не внесло существенных изменений в УФ-видимый спектр поглощения ФФ, для ПпIX и ПФа наблюдалось резкое изменение. Известно, что ПпIX должен возбуждаться при длине волны 630 нм *in vitro* или *in vivo*. Однако длина волны этого возбуждения была выбрана исходя из спектра поглощения в этаноле. Полоса QI располагалась при 641 нм вблизи физиологической среды в фосфатном буферном растворе (ФБР) и в эмбриональной телячьей сыворотке (ЭТС). Из трех ФС ПФа показал максимальное значение Φ_f , т. е. значение 0,39 в толуоле и EtOH. τ_f значения ПФа находились в пределах 6,1-7,5 нс для мономеров и 0,3-2,1 нс для агрегатов, τ_f значения ПпIX 10,3-15,9 нс для мономеров и 2,5-3,0 нс для агрегатов и τ_f значения ФФ находились в пределах 8,7-15,0 нс для мономеров и 2,2-3,4 нс для агрегатов. Максимальное значение Φ_Δ определялось в этаноле, т. е. для ПФа, ПпIX и ФФ составило 0,53, 0,92 и 0,80 соответственно. Значение τ_Δ показывало приблизительную величину в каждом растворителе для всех ФС и было соизмеримо со значениями, приведенными в литературе. Локальная вязкость может изменяться в зависимости от расположения ФС в клетках. Хотя изменение вязкости растворителя не оказало сильного влияния на максимальную длину волны полосы ПпIX и ФФ QI, было отмечено, что для ПФа полоса смещена в

коротковолновую зону 10 нм (с 678 нм до 668 нм). Флуоресценция трех ФС доказала, что при добавлении воды она снижается, а при высокой вязкости невыводимая убыль низкая. К сожалению, связь между вязкостью среды и фракциями мономера/агрегата не установлена. Причина этого заключается в том, что при смешивании различных количеств глицерина и воды полярность среды также может меняться. Поэтому изменения, наблюдаемые в вода/глицерин смесях, могут быть связаны не только с вязкостью раствора. Изменение концентрации показало тенденцию к убыванию и росту флуоресценции для ФС. То есть, если в ФБР интенсивность флуоресценции снижалась, а агрегация была высокой, то в ЗСБ наблюдалось обратное явление. Это означает, что можно видеть, что молекулы белка, присутствующие в ЭТС, уменьшают агрегацию. Хотя изменение температуры не показало значительных изменений в спектрах поглощения ПпIX и ФФ УФ. УФ-видимый спектр претерпел значительные изменения в диапазоне 10-40°C для ПФа. Поэтому при использовании фотосенсибилизаторов наиболее эффективной является температура ниже 40°C. Для ПФа в ФБР интенсивность полосы Core уменьшилась, и форма полосы Q1 изменилась, смещаясь с 680 нм на 712 нм в красную зону с точкой пересечения (изобестической) 685 нм. Точка пересечения, зарегистрированная на ЭТС, также показала 685 нм. Кроме того, повышение температуры приводит к снижению отношения агрегат/мономер. Изменение pH также показало, что для ПФа полоса Q1 смещается на короткую область 25 нм (с 704 нм до 679 нм). Как о наиболее удивительном результате можно говорить о значениях Φ_{Δ} , полученных в различных растворителях. Значения, полученные в зависимости от растворителя, также были различны. Хотя для ФФ затруднительно определение $^1\text{O}_2$ в толуоле, для ПпIX и ПФа значение Φ_{Δ} в этом растворителе составило 0,68 и 0,49 соответственно. В этаноле значение Φ_{Δ} было равно 0,92, 0,53 и 0,80 для ПпIX, ПФа и ФФ, соответственно. При использовании D_2O в качестве растворителя $^1\text{O}_2$ для ПпIX и ПФа не определялся, но Φ_{Δ} был равен 0,15 для ФФ. В реальных условиях наличие белков, липидов и других биомолекул влияет на физико-химические свойства ФС. Это означает, что использование растворителя должно контролироваться при исследованиях *in vitro*;

- Впервые коэффициенты разделения и распределения были определены методами спектрофотометрии, хроматографии и квантовой химии. В результате проведенных исследований было показано, что метод ВЭЖХ для определения коэффициента распределения представляется высокоточным, а время выполнения - быстрым. Полученные значения $\text{Log}D$ для ФС подчинялись закономерностям липофильности молекул и доказывали их высокую гидрофобность в соответствии со значениями ПФа 0,30-0,44. Значения $\text{Log}D$ ПпIX, полученные методами встряхивания колбы и ВЭЖХ, давали положительные и отрицательные величины, соответственно, но эти значения были близки друг к другу (0,19 и -0,49). Интересно, что для ФФ образовались три полосы, в результате чего были рассчитаны значения трех $\text{Log}D$, и это доказало

амфифильный характер этого ФС. Два рассчитанных значения показали полярные свойства ФФ, а одно значение - неполярные (-2,73, -1,23 и 0,15 соответственно). Тот факт, что значения $\text{Log}P$ могут быть предсказаны различными методами теоретической химии, показал, что это отличный шанс. Было установлено, что данный подход играет большую роль, когда нет образца соединения ФС, необходимого для исследования. Другими словами, теория функционала плотности (ТФП) с гибридными (B3LYP) и длинномерными (ω B97X-D) функционалами была признана как важный инструмент расчета липофильности ФС. Модели растворителей, основанные на модели сольватации, (МСП) основанной на плотности, поляризуемой непрерывности в форме кондуктора (К-МПН) и поляризуемой непрерывности на основе формального интегрального уравнения (ФИУ-МПН) были использованы для определения $\text{Log}P$ значений молекул ПпIX и ПФа с помощью 6-31G(d), 6-31+G(d,p) и 6-311++G(d,p). Сложность структуры ФФ не позволила вычислить значение $\text{Log}P$ этого ФС. По МСП в базовых наборах 6-31+G(d,p) и 6-311++G(d,p) было показано, что значения $\text{Log}P$, определенные с помощью функционала ω B97X-D могут быть рассчитаны лучше;

- Методом квантовой химии получены оптический и вибрационный спектры фотосенсибилизаторов, рассчитаны интенсивность и энергия электронных переходов. Методом квантовой химии можно получать оптические и вибрационные спектры фотосенсибилизаторов ПпIX и ПФа в толуоле и воде и рассчитывать интенсивность и энергию электронных переходов. Расчет УФ-видимого и ИК-спектров ПФа и ПпIX по моделям растворителя МСП, К-МПН по двум теориям ω B97X-D, B3LYP и базовому набору 6-31+G(d,p) позволил получить значения, очень близкие к экспериментальному результату. В то время как экспериментальным путем были получены Core и четыре полосы Q, в результате расчета были получены интенсивные Core и две полосы Q_x и Q_y низкой интенсивности. B3LYP показал, что спектры, вычисленные в результате ω B97X-D, по сравнению с функционалом, аналогичны экспериментальным спектрам. То есть уровни энергии орбиталей, рассчитанные для четырех-орбитальной модели Гутермана, показали более высокое значение при использовании функционала ω B97X-D. Поэтому установлено, что функционал имеет большое значение даже при расчете электронных спектров. Интенсивность полос, полученная в результате эксперимента и расчета, показала прямую тенденцию. То есть полоса Core показала высокую интенсивность как экспериментальным, так и расчетным путем. Поскольку различия по энергии молекул ПФа в связ, связ-1 и разл, разл+1 орбиталей велики, спектры, полученные расчетным путем, получены с высокой точностью. Кроме того, на уровне теории B3LYP и базисного набора 6-31+G(d,p) общий ИК-спектр молекулы ПФа, рассчитанный в вакууме и воде по модели растворителя МСП и К-МПН, показал результаты, близкие к экспериментальным результатам по сравнению со спектрами, полученными по теории ω B97X-D. В дальнейшем было

доказано, что данный метод играет важную роль в изучении электронных и оптических/вибрационных свойств новых синтезируемых ФС.

Практическая значимость работы. Полученные результаты по исследованию физико-химических свойств препаратов, применяемых при лечении опухолевых заболеваний, выявили высокую практическую значимость определения оптимальных условий их применения. Кроме того, основные предложенные эффективные параметры определения липофильности и методика квантово-химических расчетов открывают большие возможности для их использования в ФДТ в будущем.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Зафиксированы значительные сдвиговые изменения в полосах поглощения ПпIX и ПФа. До настоящего времени в исследованиях *in vitro* или *in vivo*, проводимых с помощью ПпIX, было установлено, что при длине волны 630 нм полоса QI находится на длине волны 641 нм в растворе фосфатного буфера и в растворителях эмбриональной телячьей сыворотке, которые аналогичны физиологической среде. Кроме того, влияние вязкости, температуры и pH велико для молекул ПФа. Возможность образования синглетного кислорода в водной среде для указанных фотосенсибилизаторов осуществляется с помощью зеленого датчика для определения синглетного кислорода, который позволяет определить квантовый выход и время жизни синглетного кислорода в различных растворителях.

2. В результате проведенных исследований по определению коэффициента распределения метод ВЭЖХ рекомендуется как высокоточный, и быстрый. Впервые вычислен коэффициент разделения для молекул ПпIX и ПФа методом ТФП в моделях растворителей на основе модели сольватации (МСП) на основе плотности, поляризуемой непрерывности в форме кондуктора (К-ПКМ) и поляризуемой непрерывности на основе формального интегрального уравнения (ФИУ-ПКМ), и он показывает значение, близкое к результатам, полученным экспериментальным путем. По результатам ВЭЖХ ФФ имеет три значения липофильности, причем два из них гидрофильные и одно гидрофобное, что доказывает амфифильность ФС. Также, впервые использована ТФП в качестве метода квантовой химии для ПпIX и ПФа, что при определении этого параметра позволяет получить более точные результаты, чем по другим методам.

3. Методом квантовой химии можно получить оптический и вибрационный спектры фотосенсибилизаторов ПпIX и ПФа в толуоле и воде и рассчитать интенсивность и энергию электронных переходов. Также в результате анализа оптических спектров, полученных на моделях растворителя МСП и К-МПН, модель растворителя К-МПН показывает результат, близкий к экспериментальному.

Связь темы диссертационной работы с научно-исследовательской работой и различными государственными программами. Часть диссертационной работы выполнена в Университете Лоррейн по международной

программе Эразмус+, созданной по инициативе и при форсированном финансировании Европейского Союза, направленной на повышение качества высшего образования студентов по академической мобильности.

Личный вклад докторанта в подготовку каждой публикации:

1. Larue L., Myrzakhmetov B., Ben-Mihoub A., Moussaron A., Thomas N., Arnoux P., Baros F., Vanderesse R., Acherar S., Frochot C. Fighting Hypoxia to Improve PDT. *Pharmaceuticals* (**Q1, IF=5.4**) 2019; 12:163 стр;

2. Myrzakhmetov B., Arnoux P., Mordon S., Acherar S., Tsoy I., Frochot C. Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a, and Photofrin® in Different Conditions. *Pharmaceuticals* (**Q1, IF=5.2**) 2021; 14:138 стр;

3. Myrzakhmetov, B., Honorien, J., Arnoux, P., Fournet, R., Tsoy, I., Frochot, C., *Luminescence* (**Q2, IF=3.7**) 2022, 37, 1597 стр.

Результаты исследования также прошли клиническую апробацию в лаборатории ONCOTHA1 «Лазерная и иммунотерапия в онкологии», французской университетской больнице Лилль и Национальном институте здоровья и медицинских исследований.

Докторант провел анализ публикаций по направлению исследования и написал принадлежащую ему часть в обзорной статье (Fighting Hypoxia to Improve PDT). В статьях (Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a, and Photofrin® in Different Conditions and Lipophilicity prediction of three photosensitizers by liquid–liquid extraction, HPLC, and DFT methods) представлены результаты экспериментов, а также анализ полученных данных и формулировка выводов, выполненные диссертантом лично.

В настоящее время в связи с полученными перспективными результатами по квантово-химическим расчетам ведется работа по оформлению статьи в соответствии с требованиями журнала, входящего в квартиль Q1.