

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ СРОДСТВА ПОРФИРИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ К БИОЛОГИЧЕСКИМ СТРУКТУРАМ

И. В. Яковец¹, К. Д. Тихонов¹, И. В. Янковский^{1,2}, Л. Н. Болотина², В. П. Зорин¹

¹Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030 Минск, Беларусь;
E-mail: viprorok@mail.ru

²CNRS, CRAN, University of Lorraine, 55511, Vandoeuvre-les-Nancy, France

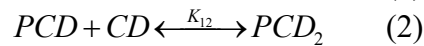
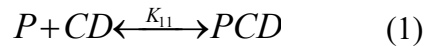
The interaction of aryl-porphyrins and cyclodextrins has been investigated. On the base of data obtained the technique of quantitative determination of porphyrin photosensitizers affinity to biological structures has been proposed.

Определение характеристик сродства лекарственных соединений к биологическим структурам играет важную роль в исследовании их фармакокинетических профилей. В настоящее время разработано большое количество различных физико-химических методов позволяющих напрямую определять характеристики сродства (хроматография, спектрально-фотометрические и флуоресцентные методы, ЯМР-спектроскопия и др.). Однако во многих случаях использование прямых методов не позволяет получить достоверную оценку сродства молекул препарата к той или иной биологической структуре. Например, в случае нерастворимых в воде лекарств, процессы агрегации их молекул вносят значительные искажения в получаемые данные.

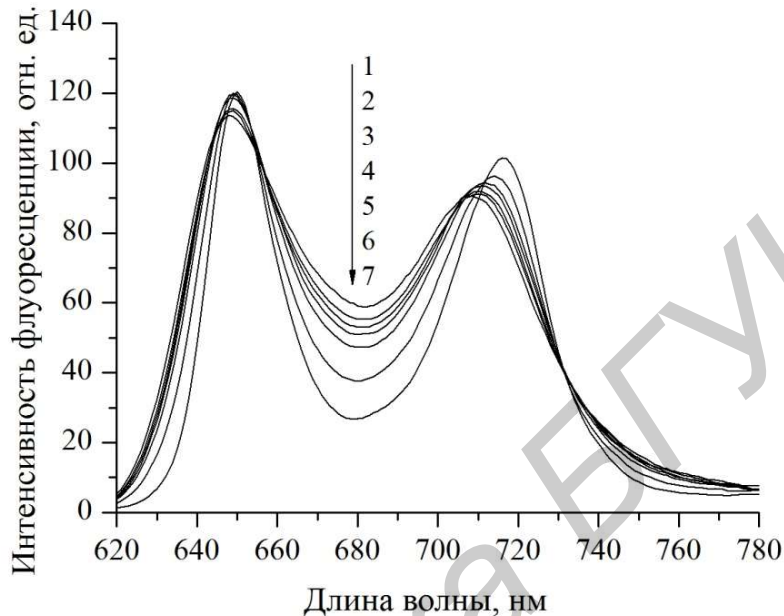
Типичным примером подобных соединений являются соединения порфиринового ряда, которые широко используются в различных отраслях медицины, в том числе и в качестве фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии. Арилзамещенные порфириновые фотосенсибилизаторы отличаются высокой склонностью к процессам самоорганизации, ведущими к образованию крупных супрамолекулярных структур. Образование агрегатов молекул ФС сопровождается потерей фотосенсибилизирующих свойств и вызывает значительные затруднения при введении препаратов в организм. Для решения данной проблемы для введения ФС применяются различные лекарственные формы (липосомы, дендримеры, циклодекстрины и др.). Использование подобных систем введения препарата обеспечивает его мономерное состояние и сохранение фотосенсибилизирующих свойств.

В данной работе рассматривается количественный метод оценки сродства ряда порфиринов к основным белкам сыворотки крови, биологическим мембранам и другим структурам, который основан на анализе процессов равновесного распределения порфиринов между биологическими структурами и производными β -циклодекстрина.

Проведен комплексный анализ абсорбционных и флуоресцентных характеристик арил-замещенных порфириновых фотосенсибилизаторов (мезо-тетра(гидроксифенил)хлорина (мТГФХ), тетра(сульфофенил)порфирина (ТСФП) и тетра(карбоксифенил)порфирина (ТКФП)) при взаимодействии с метил- β -циклодекстрином (м- β -ЦД). Разработаны спектрально-флуоресцентные методы, позволяющие установить стехиометрию и рассчитать количественные параметры комплексообразования порфиринов с м- β -ЦД (рис.1) [1, 2]. Согласно данным, приведенным в работах [3,4], при взаимодействии мТГФХ, ТСФП и ТКФП с м- β -ЦД происходит образование комплексов включения типа «гость-хозяин» со стехиометрией 1:1 и 1:2. Анализ кривых титрования арилзамещенных порфиринов м- β -ЦД с использованием методов нелинейной математической регрессии подтвердил предположение о стехиометрии комплексов и позволил получить количественные значения «кажущихся» констант ассоциации порфиринов с м- β -ЦД ($K_{11} \times K_{12} > 10^{11}$). При математической аппроксимации экспериментальных данных была использована следующая модель комплексообразования:



где P – порфирин, CD – циклодекстрин, PCD – бимолекулярный комплекс (порфирин)/(ЦД), PCD_2 – тримолекулярный комплекс (порфирин)/(2ЦД), K_{11} и K_{12} – константы ассоциации комплексов 1:1 и 1:2 соответственно.



Концентрации м-β-ЦД увеличиваются в порядке 1→7: 0; $4,0 \times 10^{-7}$; $6,0 \times 10^{-7}$; $8,0 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $6,0 \times 10^{-6}$ моль/л. Концентрация ТСФП – $1,0 \times 10^{-6}$ моль/л. Температура 25 °С.

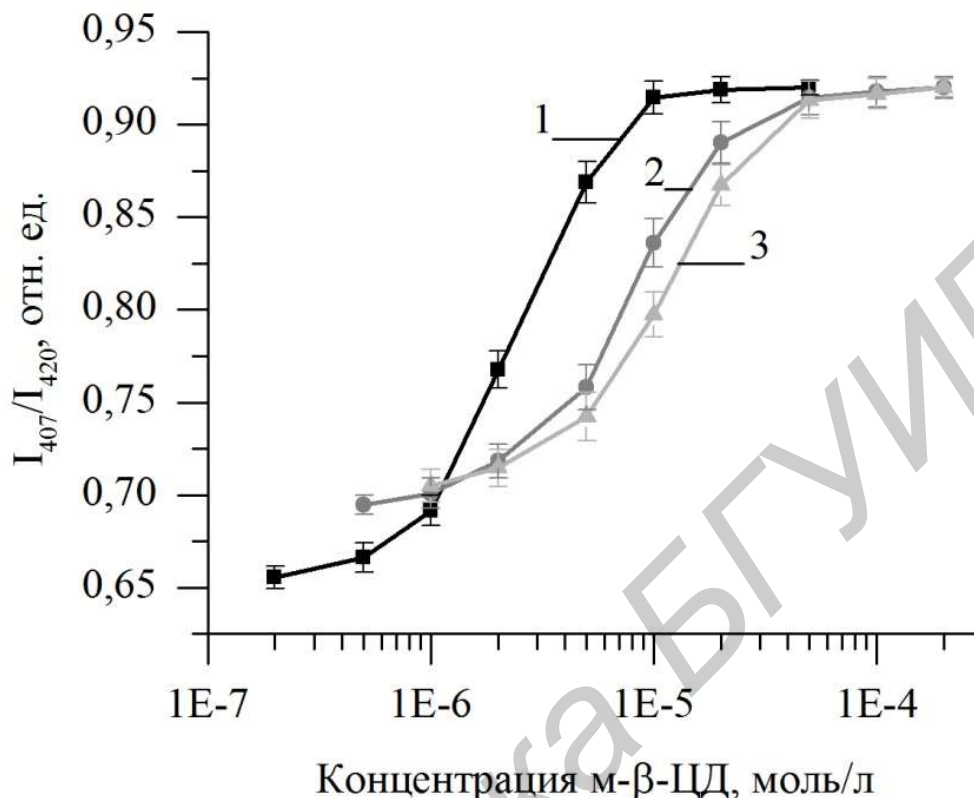
Растворитель – фосфатно-солевой буфер (рН 7,35). $\lambda_{\text{возб}} = 413$ нм.

Рисунок 1 – Спектры флуоресценции ТСФП в водном растворе, содержащем различные концентрации м-β-ЦД

Полученные данные свидетельствуют о сильной зависимости «кажущихся» констант ассоциации от концентрации мТГФХ. При увеличении концентрации порфирина в 10 раз, кажущаяся константа образования комплекса 1:1 K_{11} уменьшается более в 5 раз. Для различных порфиринов характер зависимости отличается. Например, в случае водорастворимого ТКФП константы ассоциации не зависят от концентрации порфирина вплоть до концентрации $5,0 \times 10^{-5}$ моль/л, после увеличения которой наблюдаются процессы самоагрегации его молекул. Анализ полученных зависимостей с использованием математических моделей, описывающих процессы агрегации [5], позволил вычислить «истинные» константы ассоциации арилзамещенных порфиринов с м-β-ЦД.

Процессы связывания порфиринов с основными транспортными белками сыворотки крови человека (альбумин, липопротеины низкой и высокой плотности), а также с биологическими мембранами (липидные везикулы) были исследованы на основании анализа кривых титрования циклодекстрином (рис. 2). Полученные значения констант ассоциации порфиринов с циклодекстринами были использованы для количественного определения коэффициентов распределения порфиринов в растворах белков и биологических мембран. В случае мТГФХ были получены следующие коэффициенты распределения: сывороточный альбумин человека – $2,6$ (мг/мл) $^{-1}$, липопротеины низкой плотности – $4,8 \times 10^2$ (мг/мл) $^{-1}$, липопротеины высокой плотности – $1,0 \times 10^3$ (мг/мл) $^{-1}$. Соотношения полученных данным методом коэффициентов распределения мТГФХ при связывании с белками плазмы хорошо согласуются с полученными ранее данными оценки

относительного сродства данного порфирина к белкам плазмы методом гель-хроматографии [6].



Концентрация мТГФХ – $5,0 \times 10^{-7}$ моль/л. Температура 25 °С.

Растворитель - фосфатно-солевой буфер (рН 7.35). $\lambda_{\text{рег}} = 652$ нм.

Рисунок 2 – Кривые титрования растворов мТГФХ с 1 – сывороточным альбумином, 2 – липопротеинами низкой плотности, 3 – липопротеинами высокой плотности м-β-ЦД

Литература

1. **Особенности** спектральных характеристик мета-тетра(гидроксифенил)хлорина в биологических системах / И.В. Яковец [и др.] // Вестник БГУ, Серия 1. – 2015. – № 2. – С. 39-45.
2. **Яковец И.В.** Исследование процессов комплексообразования 5,10,15,20 – тетра-(пара-сульфофенил)порфирина с метил-β-циклодекстрином / И.В. Яковец, К.Д. Тихонов // Физика конденсированного состояния. Материалы XXIII Международной научно-практической конференции аспирантов, магистрантов и студентов. - Гродно, Беларусь, 2015. – С.97-99.
3. **Enhancement** of 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)chlorin Fluorescence Emission by Inclusion in Natural and Modified Cyclodextrins / D. Demore, [et al.] // Appl. Spectr. – 1999. – Vol. 53. – No. 5. - P. 523-528.
4. **Lang K.** Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy / K. Lang, J. Mosinger, D.M. Wagnerova // Coord. Chem. Rev. – 2004. – Vol. 248. – P. 321-350.
5. **Hamelin B.** Does aggregation modulate the apparent association constant of host-guest complexes and related species? / B. Hamelin, L. Jullien // J. Chem. Soc., Faraday Trans. – 1997. – Vol. 93, No. 12. – P. 2153-2160.
6. **Interaction** of liposomal formulations of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (temoporfin) with serum proteins: protein binding and liposome destruction / V. Reshetov [et al.] // Photochem. Photobiol. - 2012. - Vol. 88, No. 5. - P. 1256-1264.