

УДК 577.33/.34; 577.355

МЕТОД АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРФИРИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ МЕЖДУ КОМПОНЕНТАМИ СЫВОРОТАМИ КРОВИ

ЖУКОВ К.А., БОРИСОВ К.Н., ЯКОВЕЦ И.В., ЗОРИН В.П.

Белорусский государственный университет, 220030, г. Минск, пр. Независимости 4, Беларусь

Аннотация. Перераспределение молекул фотосенсибилизатора (ФС) в крови играет важную роль в определении фармакокинетики ФС и результативности фотодинамической терапии (ФДТ). В данной работе была проведена оценка возможности использования метода на основе измерений поляризации флуоресценции ФС для исследования процессов распределения порфириновых ФС мТГФХ и Хл е₆ между компонентами сыворотки крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что зависимость степени поляризации флуоресценции ФС от его концентрации в сыворотке крови можно использовать для определения типа белковых структур, с которыми связаны молекулы ФС. Использование данной методики позволит облегчить отбор новых препаратов и их лекарственных форм для проведения эффективной ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, белки сыворотки крови, поляризация флуоресценции.

Abstract. The redistribution of photosensitizer (PS) molecules in the blood plays an important role in determining of PS pharmacokinetics and efficiency of photodynamic therapy (PDT). In the present work, we evaluated the possibility of application of the method based on measurements of PS fluorescence polarization on the investigation of the distribution of porphyrin PS (mTHPC and chlorin e₆) between the components of blood serum. The results suggest that the dependence of the degree of PS fluorescence polarization on porphyrin concentration in serum can be utilized to determine the type of protein structures with which PS molecules are bound. The application of this technique will facilitate the selection of new drugs and their pharmaceutical formulations for effective PDT.

Keywords: photodynamic therapy, photosensitizer, cyclodextrin, serum proteins, fluorescence polarization.

Введение

Процессы распределения ФС в организме играют важную роль в определении результативности ФДТ. При попадании ФС в кровь происходит его обратимое связывание с белками сыворотки. И хотя в сыворотке содержится около сотни различных белков, лишь немногие из них ответственны за перенос и распределение препарата-сенсибилизатора. Согласно литературным данным, необходимым условием для эффективного транспорта лекарственных средств является достаточно высокая концентрация белка (> 1 г/л), и наличие у него способности связывать транспортируемый препарат [1]. Основными транспортными белками сыворотки крови являются сывороточный альбумин человека (САЧ) (35-40 мг/мл), липопротеины высокой плотности (0,35-0,85 мг/мл) и липопротеины низкой плотности (0,66-1,40 мг/мл) [1]. Одним из основных процессов, характеризующим эффективность взаимодействия белков сыворотки и ФС является равновесное распределение ФС между компонентами сыворотки. При этом, изменение равновесного распределения приводит к изменению фармакологического поведения препарата в организме и, соответственно, эффективности проведения терапии.

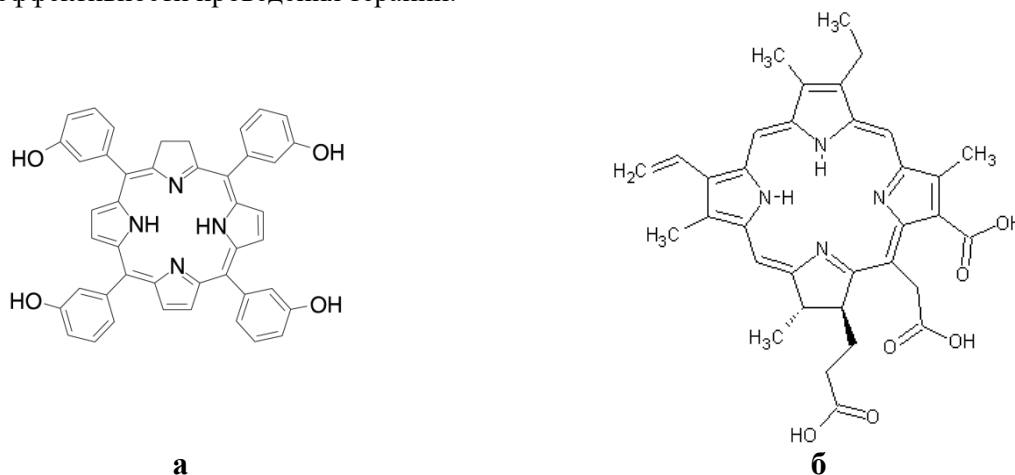


Рисунок 1 - Химическая структура мТГФХ(а) и хлорина е₆ (б)

Данная работа посвящена исследованию распределения между компонентами сыворотки крови известных порфириновых фотосенсибилизаторов второго поколения темпорфина (мТГФХ) и хлорина е₆ (Хл е₆) (Рис. 1). Как известно из литературных данных, Хл е₆ преимущественно связывается и переносится сывороточным альбумином (около 70 %), в то время как мТГФХ практи-

чески полностью связывается с липопротеины (Рис. 2) [2]. Анализ равновесного распределения ФС между белками сыворотки возможен с помощью таких техник как ультрацентрифугирование и гель-хроматографию. Следует отметить, что метод гель-хроматографии, как и техника ультрацентрифугирования, требуют затраты времени и специального оборудования. Кроме того, они позволяют получать информацию только о равновесных характеристиках распределения ФС между белками сыворотки. В данной работе описывается флуоресцентный метод, основанный на измерении поляризации флуоресценции ФС, позволяющий проводить оценку распределения ФС между основными компонентами сыворотки крови.

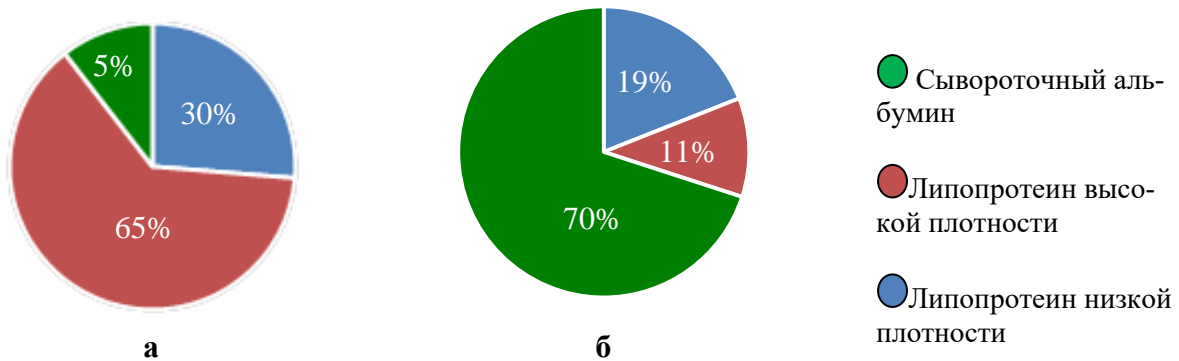


Рисунок 2 – Равновесное распределение свободного мТГФХ (а) и Хл е6 (б) между компонентами сыворотки крови человека.

Материалы и методы

В работе использовали: мета-тетра(3-гидроксифенил)хлорин (мТГФХ) представленный компанией biolitec research GmbH (Германия), Хл е6 производства Frontier Scientific (США), эмбриональную сыворотку телят производства Sigma Aldrich (США).

Характеристики флуоресценции измерялись с использованием спектрофлуориметра Solar CM-2203 (SOLAR, Беларусь), оборудованном термостатируемой ячейкой с магнитной мешалкой. Измерения проводились в водных растворах сыворотки крови человека (1% и 5%) при комнатной температуре. Оценка процессов перераспределения ФС в сыворотке крови проводилось с использованием метода, основанного на измерении степени поляризации флуоресценции ФС. Измерения степени поляризации флуоресценции проводились аналогично работе [2].

Экспериментальная часть

Для анализа распределения ФС между белками сыворотки крови использовалась методика, основанная на изменении степени поляризации флуоресценции ФС в сыворотке крови от концентрации ФС. На рисунке 3 представлена зависимость степени поляризации флуоресценции ФС (Р) в сыворотке крови от концентрации ФС.

Анализ полученных данных показал, что при малых концентрациях ФС достигается максимальное значение степени поляризации флуоресценции ФС. Это указывает на жесткую фиксацию молекул ФС в белках сыворотки и на ограниченное вращательное движение ФС. В случае, мТГФХ максимальные значения степени поляризации флуоресценции достигают 28 %, в то время как для Хл е6, Р = 15 %. Предполагается, что данное различие связано с типом структуры, с которой связаны молекулы ФС. Так, в случае мТГФХ, практически все (95%) молекулы ФС связаны с липопротеинами, обладающими относительно большим размером и низкой подвижностью. Это приводит к снижению вращательной подвижности молекул ФС и, соответственно, высоким значениям степени поляризации мТГФХ. В то же время, молекулы Хл е6 преимущественно взаимодействуют с сывороточным альбумином, относительно небольшим белком, обладающим большей вращательной подвижностью по сравнению с липопротеинами.

Помимо различий в максимальных уровнях поляризации флуоресценции ФС, также наблюдались отличия при изменении концентрации ФС в растворе. При увеличении концентрации мТГФХ, степень поляризации снижалась вплоть до минимальных значений при концентрациях (10^{-5} моль/л). Полученные результаты являются следствием процесса концентрационной деполяризации флуоресценции ФС при связывании нескольких молекул ФС с одним транспортным белком. Так, с увеличением концентрации, на одном липопротеине может локализоваться более 5 мо-

лекул ФС, что достаточно для безызлучательного переноса энергии возбуждения между ними и деполяризации флуоресценции ФС [3]. Что касается Хл ϵ_6 , то он преимущественно связывается с сывороточным альбумином, у которого есть только 1 центр связывания. Также стоит учитывать, что сывороточного альбумина значительно больше, примерно в 100 раз, чем липопротеинов, в связи с чем при увеличении концентрации Хл ϵ_6 не достигается столь высокая локальная концентрация ФС, необходимая для появления эффектов концентрационной деполяризации.

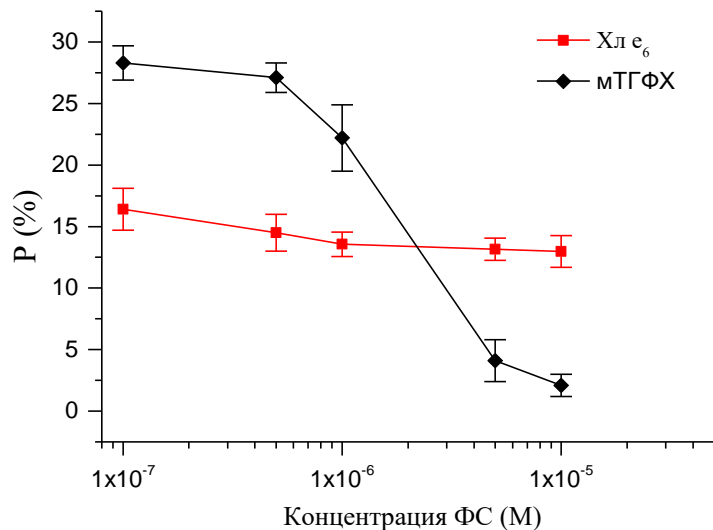


Рисунок 3 – Зависимость степени поляризации флуоресценции ФС от его концентрации в растворе сыворотки 5%. Время инкубации 3 часа при 25 °С.

Таким образом, анализ зависимостей степени поляризации ФС от его концентрации в растворах сыворотки крови позволяет определить тип белковых структур, с которыми связан ФС. Более того, наличие зависимости между степенью поляризации флуоресценции и уровнем нагрузки белков сыворотки ФС позволяет использовать данную флуоресцентную характеристику для регистрации кинетики перераспределения молекул ФС из состава липопротеинов на аналогичные структуры.

Заключение

В данной работе была проведена оценка возможности использования метода на основе измерений характеристик поляризации флуоресценции ФС для исследования процессов распределения порфириновых ФС мТГФХ и Хл ϵ_6 между компонентами сыворотки крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что зависимость степени поляризации флуоресценции ФС от его концентрации в сыворотке крови можно использовать для определения типа белковых структур, с которыми связаны молекулы ФС. Разработанная методика позволяет проводить анализ кинетических процессов распределения ФС между белками сыворотки и тем самым дополняет арсенал экспериментальных методик, используемых для изучения фармакокинетических свойств ФС. Таким образом, использование данной методики позволит облегчить отбор новых препаратов и их лекарственных форм для проведения эффективной ФДТ.

Список литературы

1. Узденский А. Б.. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. СПб.: Наука, 2010.
2. Yakavets I.V., Yankovsky I.V., Khludeyev I.I., Lassalle H.-P., Bezdetnaya L.N., Zorin V.P. Optical Methods for the Analysis of the Temoprofin Photosensitizer Distribution Between Serum Proteins and Methyl- β -Cyclodextrin Nanocarriers in Blood Serum. *J Appl Spectrosc*, 2018, vol. 84, pp. 1030-1036.3.
3. Chen, R.F., Knutson, J.R. Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers. *Anal. Biochem.*, 1988, Vol. 172, P. 61-77.