

## ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕТИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ В ПРИСУТСТВИИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Хлудеев И.И.<sup>1,2</sup>, Самцов М.П.<sup>2</sup>, Ляшенко Л.С.<sup>3</sup>, Луговский А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники  
ул. П. Бровки, 6, г. Минск, 220013, Беларусь; e-mail: ivan2khl@mail.ru

<sup>2</sup> Институт прикладных физических проблем им. А.Н. Севченко

Белорусского государственного университета  
ул. Курчатова, 7, г. Минск 220045, Беларусь

<sup>3</sup> Белорусский государственный университет  
пр. Независимости, 4, г. Минск, Беларусь

Поступила в редакцию: 26.07.2019

**Аннотация.** В работе исследовано влияние химической структуры группы катионных полиметиновых фотосенсибилизаторов, синтезированных в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. Севченко БГУ, на их распределение среди белков сыворотки крови. С использованием метода гель-хроматографии установлено, что исходный индотрикарбоцианиновый краситель ПК154 связывается преимущественно с молекулами сывороточного альбумина. Химическая модификация, состоящая в замещении двух карбоксильных групп молекулами полиэтиленгликоля (300 кДа), приводит к увеличению сродства красителя ПК220 к липопротеинам, а использование незамещенной полиметиновой цепи блокирует связывание красителя ПК222 с белками сыворотки крови. Спектральные измерения показали, что в водных растворах красителей ПК154 и ПК220 наблюдается сильный (20-25 нм) батохромный сдвиг максимумов спектров поглощения при добавлении сыворотки крови. В то же время краситель ПК222 не реагирует на присутствие сыворотки в растворе. Анализ отдельных белковых фракций, окрашенных красителями, показал существенное влияние типа сывороточного белка в составе комплекса с полиметиновыми красителями на спектральные характеристики последних. Установлено появление коротковолнового пика в спектрах поглощения комплексов краситель-альбумин. Обсуждаются возможные биофизические механизмы процессов, приводящих к наблюдаемым особенностям поведения полиметиновых красителей в присутствии белков сыворотки крови, а также возможности их использования в медико-биологических целях.

**Ключевые слова:** полиметиновые фотосенсибилизаторы, белки сыворотки крови.

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) активно используется при лечении ряда онкологических заболеваний. Он обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами лечения злокачественных новообразований – малой инвазивностью и избирательностью воздействия на ткани-мишени. В значительной степени это обусловлено селективностью накоплению фотосенсибилизаторов (ФС) в опухолях вследствие особенностей их строения и функционирования (закисление интерстициальной жидкости, хаотичная васкулярная система, повышенное число рецепторов к липопротеинам низкой плотности). В стандартном протоколе ФДТ препарат вводят в организм внутривенно, поэтому локализация и контрастность накопления ФС зависит от процессов транспорта в кровеносной системе. Для многих ФС, которые используются в клинической практике, показано, что в кровотоке они перемещаются в составе комплексов с белками сыворотки крови (БСК), преимущественно с липопротеинами высокой (ЛВП) и низкой плотности (ЛНП) и сывороточным альбумином (САЧ) [1]. Связывание ФС с белками сыворотки крови, которое играет важную роль в механизмах транспорта ФС в организме, может заметно сказываться на спектральных и фотофизических характеристиках ФС. Поскольку для оценки содержания ФС в крови и опухолях широко используются оптические методы, необходимо знать и учитывать возможное влияние взаимодействия молекул ФС с сывороточными белками не только на их фармакокинетическое поведение в крови, но также и на их фотофизические характеристики. Вследствие этого анализ различных аспектов взаимодействия ФС с белками сыворотки крови является важным для оптимизации протоколов ФДТ.

Полиметиновые (трикарбоиндоцианиновые) красители (ПК) считаются перспективными для использования в ФДТ, поскольку они обладают интенсивной полосой поглощения (720-750 нм) в так называемой «полосе прозрачности тканей». Однако большинство ПК являются гидрофобными соединениями, которые очень слабо либо вообще нерастворимы в воде. Вследствие этого в водной среде наблюдается агрегация ПК, которая может приводить к существенным изменениям их спектральных и фотофизических характеристик. Образование комплексов ПК с белками сыворотки крови также может влиять на спектрально-флуоресцентные характеристики, во-первых, за счет разрушения агрегатов и перехода ПК в мономерное состояние, и, во-вторых, за счет изменения полярности микроокружения молекул ПК в составе комплексов краситель-белок.

**Таблица 1.** Влияние присутствия белков сыворотки крови на спектры поглощения полиметиновых красителей в водных растворах

Краситель	Максимум спектра поглощения, нм				
	ФСБ рН 7,4	Сыворотка 2%	ЛНП	САЧ	
ПК154	704	730	752	731	636
ПК220	708	728	737	725	626
ПК222	744	745	–		–

Целью исследования являлось изучение распределения ПК среди белков сыворотки крови и оценка влияния комплексообразования ПК с различными транспортными белками на спектральные и фотохимические характеристики красителей.

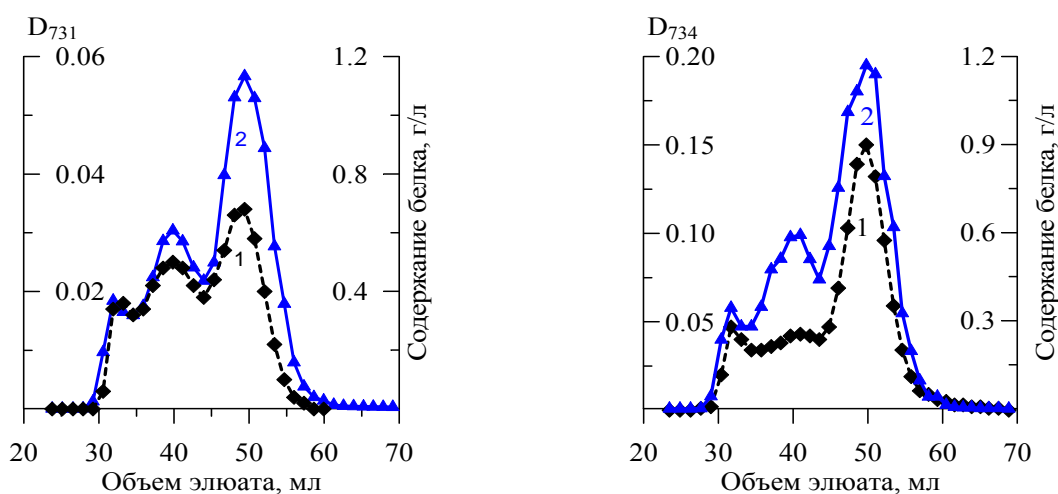
В работе использовали синтезированные в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. Севченко [2] красители: ПК154 и его производное ПК220, полученное путем замещения двух карбоксильных групп молекулами полиэтиленгликоля с молекулярной массой 400 кДа. Исходные растворы ПК с концентрацией  $5 \times 10^{-4}$  моль/л готовили в этаноле (ПК154) и в дистиллированной воде (ПК220). Спектры поглощения и люминесценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра СОЛАР СМ-2203. Оценку связывания ПК с компонентами сыворотки крови человека проводили методом эксклюзионной гель-хроматографии на колонках Sigma (1,5×50 см) с гелем Sephadex G-200, уравновешенным фосфатно-солевым буфером Дюльбекко рН 7,4 (ФСБ), который использовался также и в качестве элюента.

Исследуемые красители по показателю водорастворимости можно расположить в ряду ПК154<ПК220≤ПК222. Анализ спектров поглощения, результаты которого приведены в таблице 1, показывает, что имеются сильные различия в поведении ПК в водной среде.

Для ПК154 и ПК220 добавление сыворотки крови в раствор приводит к сильному батохромному сдвигу максимумов спектров поглощения. В то же время ПК222 никак не реагирует на присутствие в растворе сыворотки. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о том, что молекулы ПК154 и ПК220 в фосфатном буфере находятся в агрегированном состоянии. Добавление сыворотки приводит к дезагрегации красителей, по крайней мере, частичной, вследствие образования комплексов с сывороточными белками. Для ПК222 подобный эффект не наблюдается, что говорит о том, что молекулы ПК222 в водных растворах изначально присутствуют в мономерной форме.

При разделении образцов сыворотки крови человека, окрашенной ПК154 и ПК220, с помощью метода эксклюзионной гель-хроматографии было установлено, что исследуемые соединения выходят из колонки вместе с фракциями САЧ, ЛВП и ЛНП (рис. 1).

Это свидетельствует о том, что данные ПК образуют комплексы с БСК. Следует отметить, что длительность предварительной инкубации образцов окрашенной ПК сыворотки, которая необходима для достижения равновесного распределения каждого из красителей среди белков сыворотки, сильно различалась. Так, при комнатной температуре после введения в образец сыворотки водного раствора ПК154 требовалось 2 часа прединкубации, а для ПК220 – 24 часа для достижения равновесия. Это может быть связано с особенностями структуры молекул – скорость диффузии у компактных молекул ПК154 вероятно существенно выше в сравнении с громоздкими молекулами ПК220. Это косвенно подтверждается тем фактом, что при повышении температуры инкубации до 37 °С время достижения равновесного распределения для ПК220 сокращалось до 2 часов.



**Рисунок 1.** Связывание красителей ПК220 (левая панель) и ПК154 (правая панель) с белками сыворотки крови человека: 1 – оптическая плотность фракций в максимуме поглощения ПК, 2 – концентрация белка во фракциях

Для ПК222 краситель выходил из колонки одним пиком, причем объем исключения для красителя был значительно больше, чем для белковых фракций. Это позволяет сделать вывод о том, что ПК222 практически не взаимодействует с белками сыворотки крови, и находится в водной фазе в мономерном состоянии.

Для гидрофобного ПК154 относительное количество пигмента, обнаруженного во фракциях САЧ, было почти в 2 раза больше в сравнении с количеством пигмента во всех липопротеиновых фракциях, что свидетельствует о преимущественном связывании молекул ПК154 с молекулами САЧ. В то время как для водорастворимого ПК220 характерно относительно высокое сродство к липопротеинам, поскольку более 50% суммарного количества красителя обнаруживается во фракциях ЛВП+ЛНП. При анализе спектров поглощения ПК было показано, что как ПК154, так и ПК220 при попадании в водную среду (фосфатный буфер, pH 7,4) подвержены самоагрегации, поскольку наблюдался гипсохромный сдвиг полосы поглощения данных красителей по сравнению со спектрами поглощения в неорганических растворителях [3]. Титрование образцов водных растворов ПК аликвотами сыворотки крови привело к смещению максимумов спектров поглощения в красную область, что характерно для процессов дезагрегации некоторых неполярных ФС, например, фталоцианинов [4]. При добавлении даже небольших количеств сыворотки крови человека наблюдается батохромный сдвиг полос. Для ПК154 максимум спектра поглощения смещается от 704 нм (ФСБ) до 732 нм (1% сыворотки). Схожий эффект наблюдали и для ПК220, однако требовались более высокие концентрации сыворотки. Так, максимальный длинноволновый сдвиг максимума спектра поглощения от 709 нм (ФСБ) до 729 нм имел место при концентрации сыворотки  $\geq 2\%$ .

Анализ спектров поглощения ПК в различных белковых фракциях, полученных при гель-хроматографическом разделении образцов окрашенной сыворотки крови человека, обнаружил существенные различия в спектральных характеристиках. Как видно из представленных на рисунке 2 результатов полосы поглощения ПК в комплексах с липопротеинами сдвинуты в длинноволновую область в сравнении со спектрами поглощения комплексов ПК-САЧ.

Для ПК 154 разница в положении максимумов поглощения во фракции ЛНП и САЧ превышала 20 нм, в то время как максимумы поглощения комплексов ПК220-ЛНП и ПК220-САЧ различались всего на 12 нм. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что молекулы ПК в составе комплексов с ЛНП находятся в более неполярном микроокружении в сравнении с комплексами с САЧ. Можно предположить, что молекулы ПК могут погружаться в липидный слой липопротеиновой частицы, в то время как связывание с молекулами САЧ происходит на сайтах с различным сродством к молекулам ПК. Можно также предположить, что глубина встраивания молекул ПК154 больше, чем для молекул ПК220, у которых длинные цепочки полиэтиленгликоля могут играть роль «якорей», ограничивающих глубину погружения в липидную оболочку ЛНП. Следует отметить, что при экстракции ПК из состава комплексов с белками сыворотки крови также наблюдаются существенные различия в поведении красителей. Так для ПК 154 процесс распределения в двухфазной системе бутанол-сыворотка приводил к переходу более 85% красителя в органический растворитель, в то время как почти весь ПК220 оставался в водной фазе. Данный факт не связан с различиями в водорастворимости ПК, поскольку при смешивании растворов красителей в воде или фосфатном буфере с бутанолом около 97% как ПК154, так и ПК220 переходили в органический растворитель. Можно предположить, что в процессе образования комплексов ПК220 с белками сыворотки происходит ковалентное связывание красителя с белками, которое блокирует процесс перераспределения ПК220 с белков в органическую фазу.

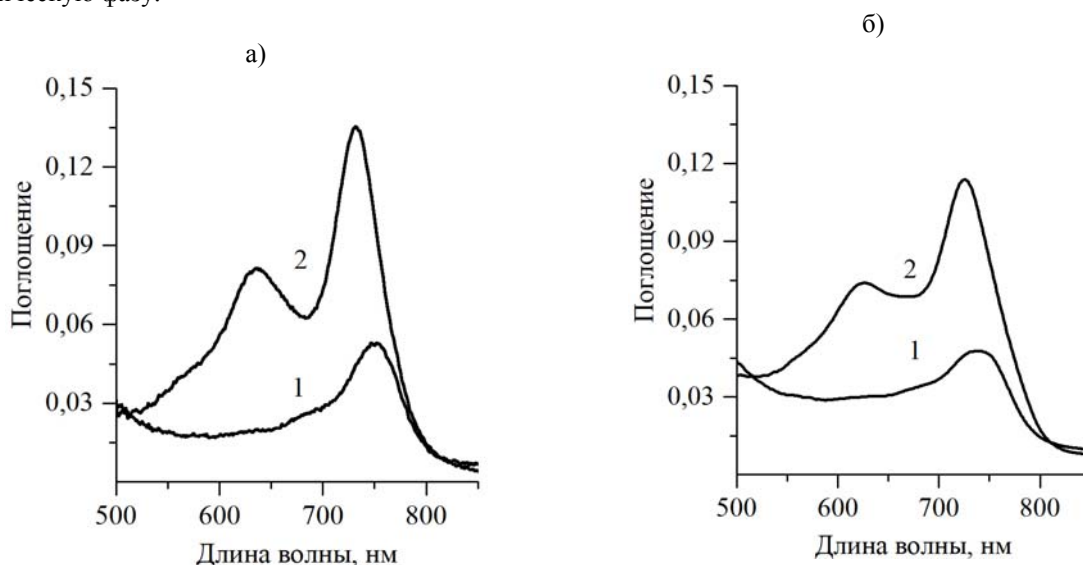


Рисунок 2. Спектры поглощения ПК154 (а) и ПК220 (б) в составе комплексов с ЛНП (1) и САЧ (2)

Кроме того, в спектрах поглощения альбуминовых фракций дополнительно появляются полосы поглощения с максимумами при 636 нм для ПК154 и 626 нм для ПК220. Появление этих полос связано не с процессами агрегации-деагрегации красителей, а с образованием в образцах неких структур, имеющих отличные от ПК спектры поглощения. Вероятно, это происходит в процессе частичной дегградации молекул ПК. Это подтверждается результатами проведенного ранее масс-спектрометрического анализа растворов ПК, в ходе которого были обнаружены соединения, поглощающие в области 630 нм и имеющие молекулярную массу приблизительно в два раза меньшую, чем молекулярная масса исходного красителя.

Таким образом, образование комплексов ПК с транспортными белками сыворотки крови способствует переходу красителей из агрегированного в мономерное состояние. При этом наблюдается bathochromный сдвиг спектров поглощения ПК в составе комплексов, величина которого зависит как от химической структуры красителя, так и от природы белка-носителя. Молекулы ПК, связанные с САЧ, в большей степени подвержены дегградации в сравнении с молекулами красителя в составе комплексов ПК-ЛНП. Наблюдаемое более высокое сродство ПК220 к липопротеинам может положительно влиять на скорость накопления этого соединения в опухолевых клетках, имеющих, как известно, повышенное количество экспонированных на поверхности рецепторов к ЛНП. В то же время активное связывание ПК154 с альбумином может способствовать накоплению этого красителя в строме солидных опухолей. Инертный водорастворимый ПК222 может представлять интерес для использования в ангиографических исследованиях сосудистого кровотока.

Проведенные исследования показывают, что образование комплексов ПК с белками сыворотки крови существенно влияет на спектральные характеристики полиметиновых фотосенсибилизаторов. Природа белка-носителя сказывается как на спектрах поглощения ПК в составе комплексов, так и на интенсивности протекания процессов дегградации ПК. Установленные особенности требуют более тщательного подхода к разработке методик измерения содержания ПК в плазме крови с использованием оптических методов.

#### Список литературы / References:

1. Hasan T. et al. *Photosensitizer Transport and Distribution. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition.* Hamilton: BC Decker, 2003.
2. Lugovski A. et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2016, vol. 316, pp. 31-36.
3. Белько Н.В. и др. Влияние комплексообразования с белками плазмы крови на спектральные характеристики трикарбоцианиновых красителей. *Весті БДПУ. Серія 3. Фізика. Математика. Інформатика. Біологія. Географія*, 2018, № 1. с. 14-20. [Belko N. et al. Influence of complex formation with blood plasma proteins on the spectral characteristics of tricarboyanine dyes. *BSPU Bulletin. Series 3. Physics. Mathematics. Informatics. Biology. Geography*, 2018, no. 1, pp.14-20 (In Ukr.)]
4. Harvey, P.D. Recent advances in free and metalated multiporphyrin assemblies and arrays; a photophysical behavior and energy transfer perspective. *The porphyrin handbook. Elsevier Science, USA*, 2003, vol. 18, pp. 63-250.

### PHOTOPHYSICAL PROPERTY OF POLYMETHINE PHOTOSENSITIZERS BEHAVIOR IN AN AQUEOUS SOLUTION IN THE PRESENCE OF SERUM PROTEINS

Khluduev I.I.<sup>1,2</sup>, Samtsov M.P.<sup>2</sup>, Lyashenko L.S.<sup>3</sup>, Lugovski A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics

*P. Brovka str., 6, Minsk, 220013, Belarus; e-mail: ivan2khl@mail.ru*

<sup>2</sup>Institute of Applied Physical Problems named after A.N. Sevchenko Belarusian State University

*Kurchatova str., 7, Minsk, 220045, Belarus*

<sup>3</sup>Belarusian State University

*Independence ave., 4, Minsk, Belarus*

**Abstract.** In this work, the influence of the chemical structure of a group of cationic polymethine photosensitizers synthesized in the spectroscopy laboratory of the Institute of Applied Physical Problems, them. Sevchenko BSU, on their distribution among serum proteins. Using the method of gel chromatography, it was established that the initial indotricarbocyanine dye PD154 binds mainly to serum albumin molecules. The chemical modification consisting in replacing the two carboxyl groups with polyethylene glycol molecules (300 kDa) leads to an increase in the affinity of PD220 for lipoproteins, and the use of an unsubstituted polymethine chain blocks the binding of PD222 to serum proteins. Spectral measurements have shown that in aqueous solutions of PD154 and PD220 dyes, a strong (20-25 nm) bathochromic peak of the absorption spectra is observed when blood serum is added. At the same time, the dye PD222 does not react to the presence of serum in the solution. Analysis of individual protein fractions stained with dyes showed a significant effect of the type of whey protein in the complex with polymethine dyes on the spectral characteristics of the latter. The appearance of a short-wave peak in the absorption spectra of the dye-albumin complexes was established. Possible biophysical mechanisms of the processes leading to the observed behavioral features of polymethine dyes in the presence of serum proteins, as well as the possibility of their use in biomedical purposes, are discussed.

**Key words:** *polymethine photosensitizers, serum proteins.*