

УДК 612/902. 622. 3147

Влияние света на оптическое поглощение фотосенсибилизаторов и их комплексов с церулоплазмином человека

А. А. Закоян

*Институт биохимии им. Г.Бунятыана НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5 /1*

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотообесцвечивание, фотосенсибилизаторы, катионные порфирины, Chlorin e6, Al-phthalocyanine, церулоплазмин, абсорбционная спектроскопия

Фотосенсибилизаторы (ФС) – это природные или синтезированные хромофорсодержащие соединения, которые при поглощении света определенной длины волны способствуют генерации цитотоксически активных форм кислорода (АФК). Известно, что цитотоксичные АФК способны вызвать повреждения в тканях-мишенях, обычно раковых. На этом основано применение ФС в фотодинамической терапии (ФДТ) [13]. ФДТ представляет собой двухэтапный процесс: первый этап – введение в организм (или в раковую ткань) ФС, второй этап – активация ФС светом. Обычно ФС активируются светом видимой области спектра [2, 3, 12]. Синглетный кислород, генерированный в качестве АФК, реагирует с самим ФС и приводит к его фотообесцвечиванию и инактивированию [7]. Как *in vitro*, так и *in vivo* исследования фотообесцвечивания гематопорфирин-р- подобных соединений, а также некоторых хлоринов и фталоцианинов описаны ранее [20]. Основными методами исследования характеристик фотообесцвечивания являются флуоресцентная и абсорбционная спектроскопия. Флуоресцентная спектроскопия часто используется для обнаружения фотообесцвечивания ФС *in vivo*, а абсорбционная спектроскопия – *in vitro* [15]. Ухудшение качества ФС при освещении описывается параметром *фотостабильность* [6]. Фотодеградационная и фотосенсибилизирующая эффективность ФС зависят от окружающей среды [14, 18]. Как правило, в присутствии аминокислот и белков многие из них деградируют эффективнее, чем в чистых буферных растворах [18]. Воздействие света может также привести к деградации или перестройке мест связывания ФС на белке [19, 25]. Ранее мы изучали связывание некоторых ФС с различными белками крови, и было показано, что, помимо сыво-

роточного альбумина, гемоглобина и трансферрина, в транспорте порфиринов в организме может участвовать также церулоплазмин (ЦП) [8, 9]. Нами было показано, что в крови человека могут существовать комплексы ЦП с ФС [ЦП + ФС] [10].

Целью данного исследования является изучение воздействия света различной экспозиции на оптические поглощения ФС и их комплексов с церулоплазмином человека.

Материал и методы

Церулоплазмин был выделен из плазмы донорской крови в мономерной форме с использованием ионообменной хроматографии на целлюлозе DE-52 («Whatman», Англия) [5] и дополнительно очищен гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-150 («Pharmacia Biotech», Швеция). В работе использовали гомогенный препарат с индексом чистоты: $I = A_{280} / A_{610} < 20$ [23] в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Фотосенсибилизаторы. В качестве ФС использованы 2 катионных порфирина (TOEt4PyP и TBut4PyP) и их цинксодержащие металлопорфирины (Zn-TOEt4PyP и Zn-TBut4PyP), синтезированные на кафедре органической химии Ереванского государственного медицинского университета [16, 24]. Исследованы также клинически одобренный анионный порфирин Chlorin e6 (Lazerphyrin®), как ФС хлоринового типа, и нейтральный Al-phthalocyanine (Photosens®), в качестве ФС фталоцианинового типа [4].

Приготовление образцов (растворы ФС, комплексы [ЦП + ФС]). Растворы порфиринов и металлопорфиринов и Chlorin e6 с концентрацией 10⁻⁴ М и Al-phthalocyanine с концентрацией 1,6×10⁻⁴ М были приготовлены в дистиллированной воде при комнатной температуре.

Для получения комплексов [ЦП + ФС], смесь ФС с белком при молярном соотношении 4:1 инкубировали в течение 72 часов в холодных условиях (6-8°C). После нековалентного связывания с образованием комплекса от не связавшегося ФС освобождались на колонке с сефадексом G-25, уравновешенном 0,01 М-фосфатным буфером, pH 7,4, близком к pH крови [1].

Условия освещения. Образцы (растворы ФС и [ЦП+ФС]) подвергались двум типам облучения: 1) естественному солнечному облучению (70 мВт/см²) и 2) облучению вольфрамовой лампой мощностью 50 Вт (30 мВт/см²) с диапазоном излучения 350 – 1100 нм. Все препараты подвергали облучению в течение 0, 5, 15, 30, 60 мин, после чего регистрировали спектры поглощения. В качестве контроля использовали спектры образцов, инкубированных в темноте, которые фактически не изменялись.

УФ-ВИД спектроскопия. Спектры оптического поглощения образцов на разных стадиях исследования регистрировали при комнатной

температуре на приборе Shimadzu UV-VISIBLE Recording Spectrophotometer UV-2100 (Япония), в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Origin 7.0 (Origin Lab Corporation). Статистически значимыми считались результаты со значением достоверности $p < 0,05$. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Анализ оптических спектров и их изменений проводили путем их регистрации в диапазоне 250-700 нм. Спектры поглощения регистрировали непосредственно после 0, 5, 15, 30 и 60 мин облучения двумя типами освещения, как описано в Методах. На рисунках и в таблице результаты, полученные при освещении естественным солнечным излучением, обозначены буквой “S”; а результаты, полученные после освещения вольфрамовой лампой, обозначены буквой “P”.

Спектры оптического поглощения порфиринов и металлопорфиринов в водном растворе имеют максимумы поглощения на полосе Core (420-440 нм), а также более слабо выраженные α - и β - полосы гемовых молекул в области 550-650 нм. Chlorin е6 имеет дополнительный пик при $\lambda \sim 672$ нм, а Al-phthalocyanine – при $\lambda \sim 676$ нм. Световая экспозиция растворов порфиринов и металлопорфиринов и Chlorin е6 не приводила к изменению формы спектров. Наблюдалось только уменьшение интенсивности максимумов без смещения. Спектр поглощения Al-phthalocyanine под воздействием света не претерпевал никаких изменений. Эти данные хорошо коррелируют с результатами, представленными в литературе. Уменьшение интенсивности поглощения (или флуоресценции) обычно называется *фотообесцвечиванием*. В научной литературе описаны такие явления в *in vitro* и *in vivo* условиях для различных ФС [6, 11, 15, 17, 18, 20, 21, 25].

На рис. 1 показано фотообесцвечивание растворов ФС. В виде % от исходной интенсивности представлены интенсивности поглощения при 420-440 нм для порфиринов и металлопорфиринов, при 676 нм для Al-phthalocyanine и при 672 нм для Chlorin е6 после 60 мин воздействия света. Статистически оцененные по пяти независимым экспериментам значения стандартных отклонений для каждого фотосенсибилизатора представлены соответствующими величинами.

Из данных рис. 1 следует, что фотообесцвечивание растворов всех порфиринов и металлопорфиринов при облучении вольфрамовой лампой было незначительным (после облучения 60 мин интенсивность поглощения растворов при максимуме поглощения полосы Core (420-440 нм) была

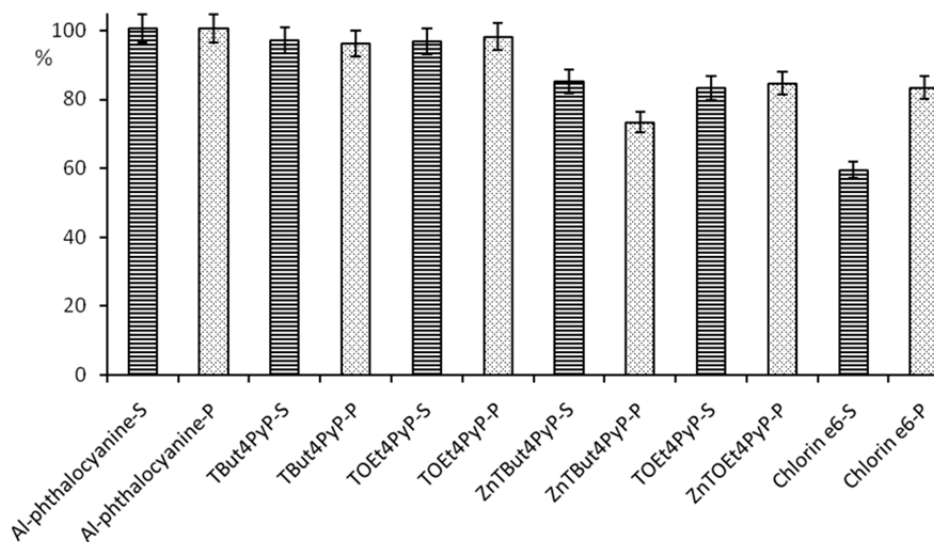


Рис. 1. Фотообесцвечивание растворов ФС после 60 мин воздействия света. На оси ординат представлена интенсивность поглощения после 60 мин воздействия света как % начального поглощения (0 мин). На рисунке приведены средние значения пяти независимых экспериментов ($n = 5$). Стандартное отклонение значений не превышает 5%, $p < 0.05$

на уровне 73,27-98,11% исходной интенсивности). Под действием естественного солнечного излучения растворы фотообесцвечивались несколько значительнее (интенсивность этого же поглощения растворов уменьшилась на 2,91 – 16,78%). Интенсивность поглощения растворов Chlorin e6 при $\lambda \sim 672$ нм после облучения вольфрамовой лампой уменьшалась на 16,7% и более значительно – под действием естественного солнечного излучения (интенсивность этого же поглощения уменьшилась на 40,8%).

Растворы Al-phthalocyanine независимо от режима освещения не подвергались фотообесцвечиванию, т.е. из исследованных ФС Al-phthalocyanine является наиболее фотостабильным.

Спектры поглощения комплексов ЦП с Zn-порфирином Zn-TBut4PyP (рис. 2) имели два основных пика: за один из них при $\lambda_{max} \sim 280$ нм отвечает белковая молекула, а второй, с максимумом поглощения полосы Core при $\lambda_{max} \sim 420-440$ нм, является характерным поглощением гемовых молекул.

Наблюдаемое комплексообразование ЦП со всеми катионными порфиринами и металлопорфиринами является следствием электростатического взаимодействия этих положительно заряженных молекул с отрицательно заряженной поверхностью белковой макромолекулы ЦП [10]. Под воздействием света во всех исследованных комплексах увеличивалась

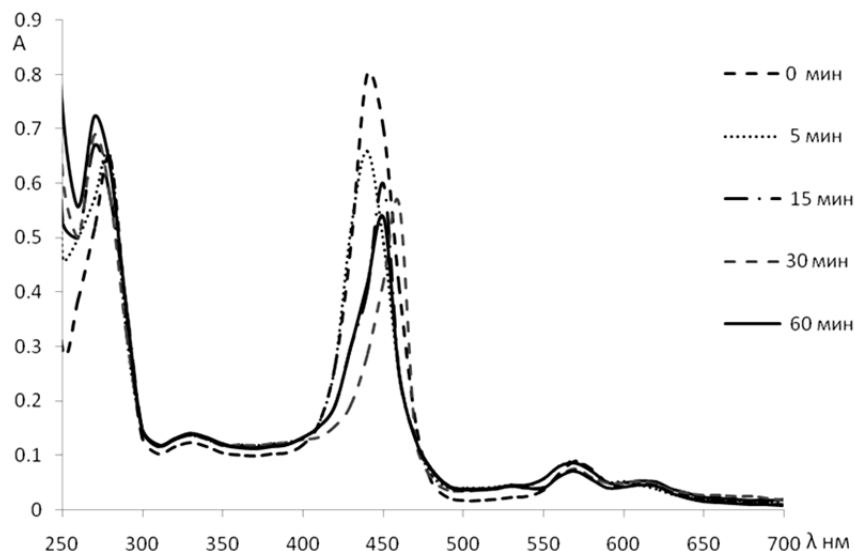


Рис. 2. Спектры поглощения катионного металлопорфирина Zn-TBut4PyP, связанного с ЦП человека, и его изменения после облучения. Оба типа облучения, описанные в Методах, приводили к идентичному результату. Длительность облучения показана справа. Аналогичные спектры были получены для комплекса [ЦП + Zn-TOEt4PyP]

интенсивность белкового поглощения при 280 нм (гиперхромный эффект, рис. 2) и наблюдался гипсохромный сдвиг этой полосы (в синюю, коротковолновую область поглощения, таблица). Поведение другого основного пика спектра (полосы Soret) было иным. С увеличением времени воздействия света в комплексах ЦП с порфиринами и металлопорфиринами интенсивность поглощения полосы Soret при 420-440 нм уменьшалась (гипохромный эффект, рис. 2) и наблюдался батохромный сдвиг (в красную область поглощения, таблица).

Таким образом, изменения в спектрах поглощения указывают на то, что происходит значительное конформационное изменение белка в микроокружении фотосенсибилизаторов и/или происходят изменения в связывании порфиринов и металлопорфиринов с ЦП.

В комплексах с Chlorin e6 при увеличении времени воздействия наблюдалось значительное уменьшение интенсивности поглощения при λ_{max} ~ 672 нм и его сдвиг в синюю область поглощения (гипсохромный эффект, таблица).

Таблица

Сдвиги пиков поглощения (нм) относительно исходного спектра в растворах комплексов [ЦП+ФС] после 60 минут облучения естественным солнечным светом (S) и вольфрамовой лампой (P)*

N	Комплексы [ЦП+ФС]	S	P	S	P
		~ 280 нм		420-440 нм	
1	[ЦП + TBut4PyP]	-6	-7	6,5	6,5
2	[ЦП + TOEt4PyP]	-5,5	-5	9,5	9,5
3	[ЦП + Zn-TBut4PyP]	-8	-8	7	6,5
4	[ЦП + Zn-TOEt4PyP]	-12,5	-8,5	0,5	0,5
		~ 280 нм		~ 672 нм	
5	[ЦП + Chlorin e6]	-4	-4	-6	-1,5
		~ 280 нм		~ 676 нм	
6	[ЦП + Al-phthalocyanine]	-5,5	-2,5	0	0

*Приведены средние значения пяти независимых экспериментов (n = 5). Стандартное отклонение значений не превышает 5%, $p \leq 0,05$

Учитывая тот факт, что Chlorin e6 является наименее фотостабильным из исследованных ФС (значительное фотообесцвечивание растворов Chlorin e6, рис. 1), можно предположить, что при его облучении имеют место два процесса – наряду с его фотообесцвечиванием, происходит также изменение его связывания с белком. В комплексах ЦП с Al-phthalocyanine с увеличением времени воздействия света положение пика при длине волны ~ 676 нм не менялось. Это может указывать на то, что, по-видимому, при воздействии света в комплексе никаких изменений в связывании Al-phthalocyanine с ЦП не происходит. Хорошо известно, что в спектрах поглощения белков полоса поглощения с $\lambda_{\max} = 275-280$ нм обусловлена поглощением энергии света ароматическими аминокислотами (триптофан, тирозин, фенилаланин) [22]. При этом основной вклад в это поглощение и определяющим характер спектра белкового поглощения имеют именно триптофановые остатки. Возможно, воздействие света влияет на ароматические аминокислоты ЦП, что приводит к гипсохромному сдвигу (в синюю область спектра) полос поглощения изучаемых комплексов.

Выводы

- Фотообесцвечивание всех растворов катионных порфиринов и металлопорфиринов при различных способах облучения светом было незначительным, тогда как для растворов Chlorin e6 наблюдалось значительное фотообесцвечивание. Растворы Al-phthalocyanine, независимо от режима освещения, не подвергались фотообесцвечиванию, это свидетельствует о том, что из исследованных ФС они наиболее фотостабильны.

- Воздействие света приводит к изменениям в спектрах поглощения комплексов ЦП с порфиринами и металлопорфиринами. Это можно рассматривать как косвенное указание на конформационные изменения белкового микроокружения или характера их связывания с ЦП.
- Из изученных ФС наименее фотостабилен Chlorin e6. Однако, наряду с его фотообесцвечиванием, свет, вероятно, влияет также на характер его связывания с ЦП.

Поступила 26.06.20

Լույսի ազդեցությունը ֆոտոսենսիբիլիզատորների և մարդու ցերուլոպլազմինի հետ դրանց կոմպլեքսների օպտիկական կլանման վրա

Ա. Ա. Զարոյան

Աշխատանքում ներկայացվել է տարբեր տևողությամբ լուսավորման ազդեցությունը ֆոտոսենսիբիլիզատորների՝ պորֆիրիններ և մետաղապորֆիրիններ, քլորին e6, Al-ֆթալոցիանին, և մարդու ցերուլոպլազմինի հետ դրանց կոմպլեքսների օպտիկական կլանման սպեկտրների վրա: Պարզվել է, որ թվարկած բոլոր կատիոնային պորֆիրինների լուծույթներն աննշան են գունազրկվում թե՛ բնական՝ արևային ճառագայթման, թե՛ վոլֆրամի լամպով ճառագայթման ժամանակ: Երկու դեպքում էլ Սորեի տիրություն (420-440 նմ) լուծույթների կլանման ինտենսիվությունները գտնվում են սկզբնականի նկատմամբ 84,62-97,09 % մակարդակի վրա՝ ընդհուպ մինչև կիրառված ամենաերկարատև (60 րոպե) լուսավորում: Միայն քլորին e6-ի լուծույթները ճառագայթման երկու պայմաններում էլ ենթարկվել են զգալի ֆոտոգունազրկման: Այս լուծույթների $\lambda \sim 672$ նմ-ում օպտիկական կլանման ինտենսիվությունը ճառագայթման ժամանակից կախված նվազել էր 16,7% - 40,48%-ով: Եվ հակառակը, Al-ֆթալոցիանինի լուծույթները չեն ենթարկվել գունազրկման անկախ ճառագայթման ձևից և ժամանակից: Ուսումնասիրվել է նաև մարդու ցերուլոպլազմինի հետ ֆոտոսենսիբիլիզատորների կոմպլեքսների լուծույթների օպտիկական կլանումների վրա նշված ճառագայթման երկու ձևերի ազդեցությունը: 60 րոպե լուսավորման արդյունքում դիտվում են օպտիկական կլանումների մաքսիմումների հիպոսթրոմ և բատոքրոմ շեղումներ, որոնք կարող են վկայել կամ ֆոտոսենսիբիլիզատորների անկայունության, կամ դրանց հետ կոմպլեքսում գտնվող ցերուլո-

պլազմինի կոնֆորմացիայի փոփոխության, կամ սպիտակուց-ֆոտոսենսիթիզատոր կապի փոփոխման մասին:

The Effect of Light on the Optical Absorption of Photosensitizers and Their Complexes with Human Ceruloplasmin

A. A. Zakoyan

This study presented the effect of various light expositions on the optical absorption spectra of photosensitizers such as porphyrins, metalloporphyrins, Chlorin e6, Al-phthalocyanine and their complexes with human ceruloplasmin. All of the listed cationic porphyrins were insignificantly photobleached during both the natural solar radiation and irradiation with a tungsten lamp. In both cases, the intensity of absorption of the solution at the peak of the Soret band (420-440 nm) was at the level of 84.62 - 97.09 % of the initial, up to the longest (60 minutes) lighting. Only Chlorin e6 solutions significantly photobleached under both irradiation conditions. The optical absorption intensity of these solutions at $\lambda \sim 672$ nm decreased by 16,7% - 40,48 % depending on the irradiation time. Conversely, Al-phthalocyanine solutions did not undergo photobleaching regardless of the time and type of exposure. It has been studied also the effect of two types of irradiation on the optical absorption of the complexes of human Ceruloplasmin with all the mentioned photosensitizers. Prolonged illumination (60 min) resulted in hypsochromic and bathochromic shifts of the optical absorption maximum. Obtained phenomena can indicate either instability of the photosensitizers, or a conformational change in the Ceruloplasmin in their complex, and also changes in the protein-photosensitizer bond.

Литература

1. Робинсон Дж. Р. Основы регуляции кислотно-щелочного равновесия (пер. с англ.), М., 1969.
2. Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, Photodiagn. Photodyn. Ther., 1, 279-293, 2004.
3. Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signalling, cell metabolism and modes of cell death, Photodiagn. Photodyn. Ther. 2, 1-23, 2005a.
4. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future, Chem. Rec., 17, 775-802, 2017.
5. Deutsch H. F. The preparation of crystalline ceruloplasmin from human plasma, Archives of Biochemistry and Biophysics, 89(2), 225-229, 1960. doi:10.1016/0003-9861(60)90048-5
6. Ferreira J., Kurachi C., Moriyama L.T. et al. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy for different photosensitizers, Laser Phys. Lett., 3(2), 91-95, 2006.
7. Gomer, C.J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. 54, 1093-1107, 1991.

8. *Gyulkhandanyan A. G., Parkhats M. V., Knyuksho V. N. et al.* Binding of cationic porphyrins and metalloporphyrins to the human transferrin for photodynamic therapy of tumors, Proc. of SPIE, 10685, 1068504-1 -1068504-9, 2018.
9. *Gyulkhandanyan A. G., Zakoyan A. A., Gyulkhandanyan Aram G. et al.* Ceruloplasmin - a potential carrier of photosensitizers for photodynamic therapy of tumors, Proc. of SPIE, 11079, 110791T-1 - 110791T-3, 2019.
10. *Gyulkhandanyan A. G., Zakoyan A. A., Mkrtchyan L. V. et al.* Binding of ceruloplasmin with cationic porphyrins: pH and salt composition of a medium, Proc. of SPIE, 11363, (2 April 2020, Photonics Europe Digital Forum), <https://doi.org/10.1117/12.2556021>
11. *Gyulkhandanyan G. V., Ghazaryan R. K., Paronyan M. H. et al.* Photophysical properties and photodynamic efficiency of cationic porphyrins, Proc. of SPIE, 8942, 894212-1 - 894212-9, 2014.
12. *Huang, L., Xuan, Y., Koide, Y. et al.* Type I and type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in-vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria, Lasers Surg. Med. 44, 490-499, 2012.
13. *Kruger C., Abrahamse H.*, Utilisation of Targeted Nanoparticle Photosensitiser Drug Delivery Systems for the Enhancement of Photodynamic Therapy, Molecules, 23, 2628, 2018.
14. *Lavi A., Weitman H., Holmes R.T., Smith K. M. Ehrenberg B.* The Depth of Porphyrin in a Membrane and the Membrane's Physical Properties Affect the Photosensitizing Efficiency, Biophysical Journal, 82(4), 2101–2110, 2002.
15. *Liu H.-Q., Wang Y.-M., Li W.-F. et al.* Photobleaching characteristics of α -(8-quinolinoxy) zinc phthalocyanine, a new type of amphipathic complex, Open Chem., 15, 400-411, 2017.
16. *Madakyan V. N., Kazaryan R. K., Khachatryan M. A. et al.* New derivatives of meso-tetra (4-pyridyl) porphyrin and their some trans-formations, Khimiya heterociklicheskih soedinenii, 2, 212-216, 1986.
17. *Menezes P. F. C., Imasato H., Bagnato V. S., Sibata Cl. H., Perussi J.R.* Influence of pH on the Phototransformation Process of Photogem, Laser Physics, 19(7), 1457–1462, 2009.
18. *Moan J.* Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. Cancer Lett., 33(1), 45-53, 1986.
19. *Moan J., Streckytr G., Bagdonas S., BechØ., Bregi K.* Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid, Int. J. Cancer, 70, 90–97, 1997.
20. *Rotomskis R., Bagdonas S., Streckyte G. et al.* Phototransformation of Sensitisers: 3. Implications for Clinical Dosimetry, Lasers Med Sci, 13, 271-278, 1998.
21. *Rotomskis R., Streckyte G., Bagdonas S.* Phototransformations of sensitizers I. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution, Photochemistry and Photobiology, 39(2), 167-171, 1997.
22. *Schmid F.-X.* Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry Encyclopedia of life sciences / & 2001 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group /www.els.net
23. *Sokolov A. V., Dadinova L. A., Petoukhov M. V. et al.* Structural Study of the Complex Formed by Ceruloplasmin and Macrophage Migration Inhibitory Factor, Biochemistry, 83 (6), 701-707, 2018.
24. *Tovmasyan A. G., Ghazaryan R. K., Sahakyan L. et al.* Synthesis and anticancer activity of new water-soluble cationic metalloporphyrins. European Conferences on Biomedical Optics 2007, Munich, Germany, Technical Abstract Summaries, 71-72, 2007.
25. *Uzdensky A., Iani V., Ma L.-W., Moan J.* Photobleaching of Hypericin Bound to Human Serum Albumin, Cultured Adenocarcinoma Cells and Nude Mice Skin, Photochemistry and Photobiology, 76(3), 320-328, 2002.