

УДК 535.37

Тарасов Д. С.^{1,2}, Самцов М. П.¹, Луговский А. П.¹, Ощепкова Ю. И.³

СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА С БЕЛКАМИ

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко» БГУ,
Минск, Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

³Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

В работе представлены результаты исследования спектрально-кинетических характеристик процесса комплексообразования индотрикарбоцианиновых красителей с бычьим сывороточным альбумином.

В последние годы возрос интерес к полиметиновым красителям как перспективным фотосенсибилизаторам (ФС) для фотодинамической терапии злокачественных новообразований и иных патогенных тканей [1]. Разработки в этом направлении ведутся в НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ. На сегодняшний день выделен индотрикарбоцианиновый краситель [2], который по своим свойствам в значительной степени удовлетворяет современным требованиям к ФС. Отличительные особенности его структуры – наличие хлорзамещенного ортофениленового мостика в цепи сопряжения и двух цепочек полиэтиленгликолей (ПЭГ) с молекулярной массой 300 Да, которые ковалентно связаны с концевыми группами.

Ранее нами установлено, что индотрикарбоцианиновый ФС способен образовывать комплексы с альбумином, одним из основных эндогенных переносчиков лекарственных препаратов [3]. В работе показано, что красители с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком в цепи сопряжения может образовывать ковалентно связанные комплексы с альбумином, в отличие от аналогичных по структуре красителей с незамещенной цепью. Для установления роли комплексообразования нового ФС с альбумином в его доставке в опухолевые ткани важно знать динамику этого процесса.

Данная работа посвящена изучению взаимодействия ФС на основе индотрикарбоцианинового красителя (ПК1), а также его структурного аналога с незамещенной цепью (ПК2), с бычьим сывороточным альбумином (БСА) во времени и в процессе титрования. Растворы БСА (Serva, Германия) готовили в натрий-калиевом фосфатном буфере Дюльбекко (0,14 моль/л) с pH=7,4 (ФСБ). Исследования проводились для группы образцов с постоянной концентрацией красителя (1,2 мкМ) и переменной концентрацией БСА (от 1,25 мкМ до 120 мкМ). Образцы готовились при температуре 20 °С, с последующей инкубацией красителя при 37 °С в течение 120 минут. Состояние красителя в растворах БСА анализировалось по спектрам поглощения и флуоресценции, измерениям квантового выхода, длительности затухания и поляризации флуоресценции. Взаимодействие красителей с БСА в процессе смешивания стоковых растворов исследовались с помощью лазерного спектрофлуориметра собственной разработки [4].

Спектральные свойства ПК1 и ПК2 в ФСБ в значительной степени определяются агрегацией в водном окружении. При концентрации красителей 1,2 мкМ также обнаруживается присутствие агрегатов, что проявляется в уширении основной полосы поглощения (рисунки 1а и 1б). С увеличением концентрации БСА для обоих красителей наблюдается смещение основной полосы поглощения в длинноволновую область, что сопровождается деформацией формы спектра, а также изменением характеристик флуоресценции красителей (таблица). По мере увеличения концентрации БСА в растворе максимум спектра флуоресценции красителя смещается в длинноволновую область, увеличиваются степень поляризации и длительность затухания его флуоресценции, возрастает относительный квантовый выход флуоресценции. Наблюдается достаточно сложный характер спектральных изменений, которые свидетельствуют о дезагрегации молекул красителя и образовании комплексов молекул красителей с БСА. В целом в зависимости от концентраций красителя и белка в растворе и их соотноше-

Секция 1. Прикладные проблемы оптики и спектроскопии

ния данные растворы представляют собой смесь мономеров и агрегатов красителя в водном окружении и комплексов красителя с БСА.

Таблица 1

Фотофизические характеристики красителей ПК1 и ПК2 при концентрации 1,2 мкМ в ФСБ и растворе БСА в ФСБ

Образец		$\lambda_{\text{погл}}$, нм	$\Delta\lambda_{\text{погл}}$, нм	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	$\Delta\lambda_{\text{фл}}$, нм	τ (20 °C), нс	ϕ (20 °C), %	P (20 °C), %
ФСБ	ПК1	709	89	739	65	0,4±0,1	3,0±0,5	23±2
	ПК2	738	63	768	51	0,4±0,1	7,0±1,0	26±2
БСА*	ПК1	732	51	747	48	1,4±0,1	22±3	46±2
	ПК2	752	51	770	49	1,3±0,1	31±3	43±2

*Примечание. Приведены параметры для образцов при концентрации БСА 120 мкМ после инкубации при 37 °C в течение 120 минут.

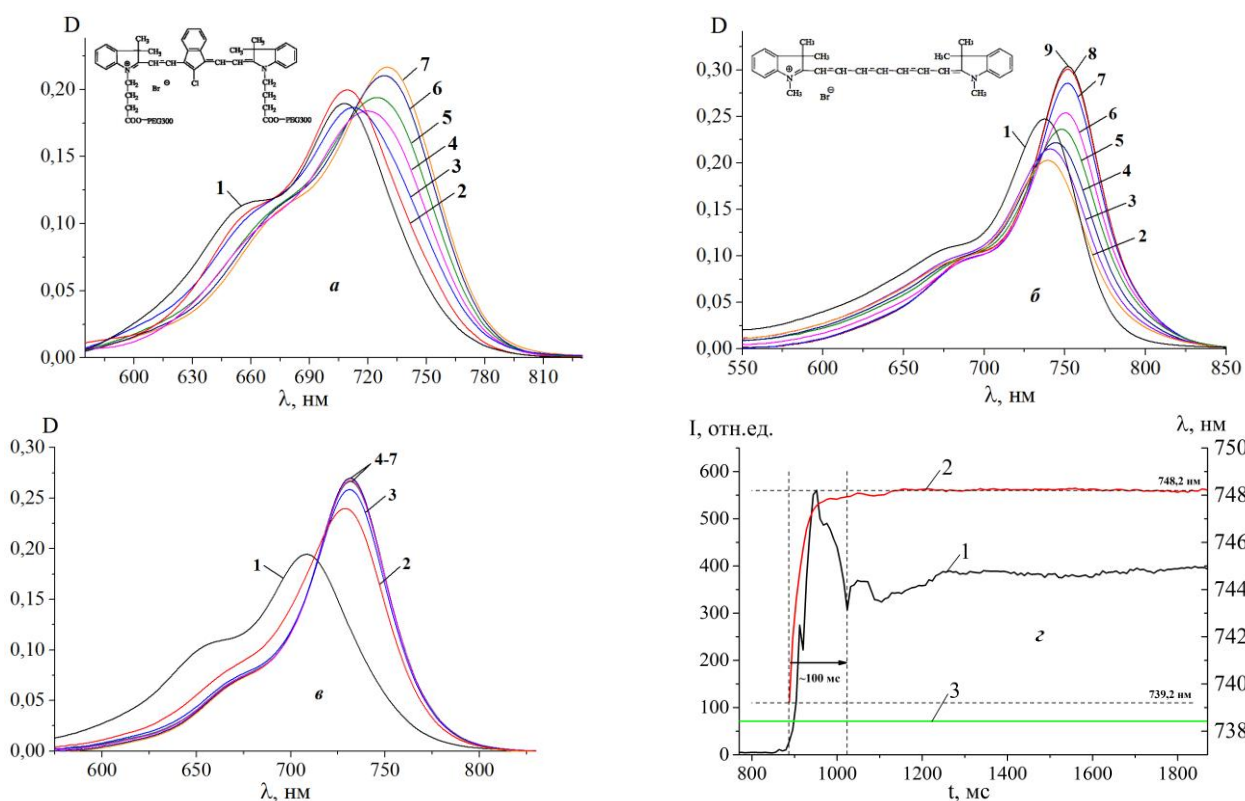


Рисунок 1 – а) Спектры поглощения ПК1 (1,2 мкМ) в растворах БСА (1 – 0 мкМ, 2 – 5 мкМ, 3 – 10 мкМ, 4 – 20 мкМ, 5 – 40 мкМ, 6 – 80 мкМ, 7 – 120 мкМ) сразу после приготовления; б) Спектры поглощения ПК2 (1,2 мкМ) в растворах БСА (1 – 0 мкМ, 2 – 1,25 мкМ, 3 – 2,5 мкМ, 4 – 5 мкМ, 5 – 10 мкМ, 6 – 20 мкМ, 7 – 60 мкМ, 8 – 80 мкМ, 9 – 120 мкМ) сразу после приготовления; в) Спектры поглощения ПК1 (1,2 мкМ) в растворах БСА (1 – 0 мкМ, 2 – 5 мкМ, 3 – 10 мкМ, 4 – 20 мкМ, 5 – 40 мкМ, 6 – 80 мкМ, 7 – 120 мкМ) после 2 часов инкубации при 37 °C; г) Кинетика изменения интенсивности (1) и положения максимума (2) флуоресценции при смешивании растворов в ФСБ красителя ПК1 (54 мкл, 100 мкМ) и БСА (546 мкл, 52,8 мкМ); интенсивность флуоресценции раствора в ФСБ красителя ПК2 при концентрации 9,0 мкМ в аналогичных условиях регистрации (3)

Для обоих красителей изменение фотофизических характеристик при введении в раствор БСА происходит крайне быстро. Так стабилизация параметров интенсивности и формы спектра флуоресценции (рисунок 1г) происходит за время не превышающее времени перемешивания растворов (~ 100 мс). Причем при комнатной температуре (20 °C) спектральные характеристики растворов обоих красителей практически стабильны во времени. За 60 минут наблюдения только для растворов красителя ПК1 отмечены небольшие изменения в спектрах поглощения и флуоресценции.

Вместе с тем при инкубации при 37 °С окрашенные красителями растворы БСА ведут себя по-разному. Спектральные и фотофизические характеристики ПК2 стабильны при инкубации в течение 2 часов наблюдения для всех исследованных концентраций БСА. Такое поведение характерно для обратимого нековалентного комплексообразования. В этом случае в растворе имеет место равновесное распределение молекул красителя, которое определяется концентрациями красителя и белка и их взаимным сродством (константой связывания). Примечательно то, что для красителя ПК2 стабилизация спектральных характеристик происходит при концентрациях БСА 60-80 мкМ.

С другой стороны, окрашенные красителем ПК1 растворы БСА не стабильны во времени (рисунок 1в): происходит монотонное смещение их спектров поглощения и флуоресценции в длинноволновую область, возрастает относительный квантовый выход флуоресценции раствора. При этом примерно через 2 часов инкубации красителя происходит стабилизация его фотофизических характеристик с концентрацией БСА в диапазоне 20-120 мкМ. По всей видимости в результате инкубации происходит увеличение доли ковалентно связанного комплекса.

С помощью подхода, который описан в работе [5], выполнено разделение на компоненты спектров поглощения красителей при различных концентрациях БСА. На основании разделения на компоненты выполнена оценка доли молекул красителей в комплексе с БСА. По данным полученных изотерм связывания выполнен расчет по методу Скэтчарда [6] константы связывания красителей с БСА в предположении эквимольной стехиометричности комплекса (на одну молекулу белка приходится только одна молекула красителя). Сразу после окрашивания красителем раствора БСА константа связывания ПК1 составляет $3,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, что ~ 2.8 раза меньше чем для ПК2 – $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Благодаря способности ПК1 образовывать ковалентные комплексы с БСА инкубация при физиологических условиях способствует более высокой степени связывания с БСА по сравнению с ПК2.

Таким образом, благодаря способности ковалентно связываться с БСА фотосенсибилизатор на основе индотрикарбоцианинового красителя с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком достигает более высокой степени связывания с БСА, по сравнению со степенью связывания, которая определяется кажущейся константой связывания при не ковалентном комплексообразовании.

Результаты получены при финансовой поддержке проекта БРФФИ Ф22УЗБ-044.

Список литературы

1. Ishchenko A. A., Syniugina A. T. Structure and Photosensitizer Ability of Polymethine Dyes in Photodynamic Therapy: A Review // Theoretical and Experimental Chemistry. – 2023. – P. 1-29.
2. Lugovski A.A., Samtsov M.P., Kaplevsky K.N., Tarasau D.S., Voropay E.S., Petrov P.T., Istomin Y.P. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2016. – Vol. 316. – P. 31-36.
3. Тарасов Д.С., Самцов М.П., Хлудеев И.И., Малюшкова Е.В., Семак И.В. Фотофизические свойства индотрикарбоцианиновых красителей при комплексообразовании с сывороточным альбумином // Журнал прикладной спектроскопии. – 2022. – Т. 89, № 5. – С. 605-613.
4. Самцов М. П., Радько А. Е., Каплевский К. Н., Шевченко К. А. Лазерный спектрометрический комплекс для флуоресцентной диагностики области локализации опухолей // Квантовая электроника : материалы V Междунар. науч.-техн. конф. (Минск, 22–25 нояб. 2004 г.) Мн.: БГУ. – 2004. – С. 20 -24.
5. Д.С. Тарасов, К.Н. Каплевский, М.П. Самцов, Е.С. Воропай Анализ спектральных свойств многокомпонентных растворов нового индотрикарбоцианинового красителя // Вестник БГУ. Сер.1. – 2015. – №2. – С. 9-12.
6. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. // Биокинетика: Практический курс. М., 1999. – 352 с.