

МЕХАНИЗМЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРФИРИНОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

**И. В. ЯКОВЕЦ^{1),2),3)}, И. В. ЯНКОВСКИЙ¹⁾, К. Н. БОРИСОВ¹⁾, К. А. ЖУКОВ¹⁾,
И. И. ХЛУДЕЕВ¹⁾, Л. Н. БОЛОТИНА^{2),3)}, В. П. ЗОРИН^{1),4)}**

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Центр Исследований и Автоматизации Нанси,
CNRS UMR 7039 Национальный центр научных исследований, Университет Лотарингии, Кампус наук,
54500, г. Вандовр-Нанси, Франция

³⁾Институт канцерологии Лотарингии,
пр. Бургундии, 6, 54519, г. Вандовр-Нанси, Франция

⁴⁾Белорусский государственный университет,
Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Предложен новый метод флуоресцентного анализа процессов распределения неполярного порфиринового фотосенсибилизатора темпорфина (mTHPS) между основными транспортными белками сыворотки крови. Данный метод включает в себя использование циклических олигосахаридов (циклодекстринов) для предотвращения агрегации препарата и количественного определения основных характеристик его связывания с белками сыворотки крови на основании кривых конкурентного связывания. Процессы связывания mTHPS с сывороточным альбумином человека, липопроотеины низкой плотности и липопроотеинами высокой плотности были исследованы на основании анализа кривых титрования циклодекстрином. Полученные значения констант ассоциации mTHPS с циклодекстринами были использованы для количественного определения коэффициентов распределения mTHPS между компонентами сыворотки крови. Были получены следующие значения интегральных коэффициентов распределения: сывороточный альбумин человека – $2,6 \text{ (мг/мл)}^{-1}$, липопроотеины низкой плотности – $4,8 \times 10^2 \text{ (мг/мл)}^{-1}$, липопроотеины высокой плотности – $1,0 \times 10^3 \text{ (мг/мл)}^{-1}$. Соотношения интегральных коэффициентов распределения mTHPS, полу-

Образец цитирования:

Яковец И. В., Янковский И. В., Борисов К. Н., Жуков К. А., Хлудеев И. И., Болотина Л. Н., Зорин В. П. Механизмы распределения порфириновых фотосенсибилизаторов в сыворотке крови // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2017. № 1. С. 72–80.

For citation:

Yakovets I. V., Yankovsky I. V., Barysau K. N., Jukov K. F., Khludeyev I. I., Bolotine L. N., Zorin V. P. Porphyrin photosensitizer distribution mechanisms in blood serum. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2017. No. 1. P. 73–80 (in Russ.).

Авторы:

Илья Владимирович Яковец – младший научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии, аспирант кафедры биофизики. Научный руководитель – В. П. Зорин.

Игорь Вячеславович Янковский – доктор философии; ассистент кафедры общей физики.

Кирилл Николаевич Борисов – студент физического факультета. Научный руководитель – В. П. Зорин.

Константин Андреевич Жуков – студент физического факультета. Научный руководитель – В. П. Зорин.

Иван Иванович Хлудеев – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии.

Лина Николаевна Болотина – доктор философии, доктор медицины; руководитель исследовательского отдела.

Владимир Петрович Зорин – кандидат биологических наук, доцент; заведующий НИЛ биофизики и биотехнологии.

Authors:

Ilya V. Yakavets, junior researcher at the laboratory of biophysics and biotechnology, post-graduate student at the department of biophysics.

i.yakovets@gmail.com

Igor V. Yankovsky, doctor of science (philosophy); assistant of the department of common physics.

lubom@tut.by

Kirill N. Barysau, student of the faculty of physics.

kirill_borisov98@mail.ru

Konstantin A. Jukov, student of the faculty of physics.

mr.kas1278@mail.ru

Ivan I. Khludeyev, PhD (biological); senior researcher of the laboratory of biophysics and biotechnology.

ivan2khl@mail.ru

Lina N. Bolotine, doctor of science (philosophy), doctor of science (medicine); head of research department.

l.bolotine@nancy.unicancer.fr

Vladimir P. Zorin, PhD (biology) associate professor; head of the laboratory of biophysics and biotechnology.

vpzorin@mail.ru

ченных данным методом, при связывании с белками плазмы хорошо согласуются с полученными ранее данными оценки относительного сродства данного хлорина к белкам плазмы методом гель-хроматографии.

Ключевые слова: темпорфин; фотосенсибилизатор; сыворотка крови; комплексы включения; циклодекстрины.

Благодарность. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) (проект № Б17-106), Министерства образования Республики Беларусь (совместный проект с БРФФИ № Ф16МВ-006), Института Канцерологии Лотарингии (Нанси, Франция) и Французской «Национальной лиги по борьбе с раком (CCIR-GE)». Авторы благодарят BIolitec Research GmbH (Йена, Германия) за предоставление mTHPC.

PORPHYRIN PHOTSENSITIZER DISTRIBUTION MECHANISMS IN BLOOD SERUM

*I. V. YAKAVETS^{a, b, c}, I. V. YANKOVSKY^a, K. N. BARISAY^a, K. A. JUKOV^a,
I. I. KHLUDEYEV^a, L. N. BOLOTINE^{b, c}, V. P. ZORIN^{a, d}*

^aBelarusian State University,

Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bResearch Centre for Automatic Control of Nancy,

University of Lotaringia, Science Campus, 54500, Vandoevr-Nancy, France

^cLorraine Institute of Oncology,

Burgundy avenue, 6, 54519, Vandoevr-Nancy, France

^dBelarusian State University, International Sakharov Environmental Institute

Dolgobrodskaya street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus

Corresponding author: i.yakavets@gmail.com

A new fluorescent technique to monitor the distribution processes of non-polar porphyrin photosensitizer temoporfin (mTHPC) between main blood serum proteins has been described. The technique proposed includes the use of cyclic oligosaccharides (cyclodextrins) to prevent aggregation of the compound and to quantitatively estimate the main characteristics of mTHPC binding to the serum proteins. To determine the mTHPC affinity to transport serum proteins we have analysed the processes of mTHPC binding to methyl- β -cyclodextrin in serum proteins solutions (human serum albumin, low and high density lipoproteins). The obtained titration curves and previously determined binding constants values for the mTHPC association with methyl- β -cyclodextrin process were used to estimate relative mTHPC affinity to main transport serum proteins. The resulting values of the integrated distribution coefficients were as follows: $2,6 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ for human serum albumin, $4,8 \times 10^2 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ for low density lipoproteins and $1,0 \times 10^3 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ for high density lipoproteins. The ratios of mTHPC distribution coefficients in plasma compounds were in a good accordance with the data obtained by means of the gel-chromatography.

Key words: temoporfin; photosensitizer; blood serum; inclusion complexes; cyclodextrins.

Acknowledgements. This work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR) (project number Б17-106) and the Ministry of Education of Belarus (joint project with BRFFR number Ф16МВ-006), Institut de Cancérologie de Lorraine, French «Ligue Nationale contre le Cancer (CCIR-GE)». The authors thank biolitec research GmbH (Jena, Germany) for providing mTHPC.

Введение

Фармакокинетика лекарственных средств, вводимых внутривенно, в значительной степени определяется процессами их взаимодействия с транспортными белками сыворотки крови. Связывание с белками сыворотки предотвращает агрегацию лекарственных средств и способствует дальнейшей транспортировке по организму. В случае фотодинамической терапии (ФДТ), природа белка-«переносчика» оказывает влияние на механизмы распределения молекул фотосенсибилизатора (ФС) в опухолевой ткани. Так, перенос молекул ФС в комплексах с сывороточным альбумином увеличивает эффективность повреждения васкулярной системы и стромы опухоли при фотодинамическом воздействии, в то время как транспорт ФС в составе липопротеинов способствует доставке сенсibilизатора в опухолевые клетки [1]. Таким образом, определение характеристик процессов распределения препаратов в сыворотке крови является важной задачей, требующей разработки специальных физико-химических методов. В случае ФДТ, применение методов прямого определения характеристик распределения ФС

(таких, как ультрацентрифугирование, хроматография, электрофорез) не представляется возможным из-за слабой растворимости большинства используемых порфириновых ФС.

Хорошо известно, что липофильность ФС обуславливает оптимальную локализацию ФС в клеточных и тканевых структурах опухоли [2]. Порфириновые ФС являются преимущественно гидрофобными молекулами и обладают достаточно оптимальными фотофизическими свойствами с точки зрения ФДТ (высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода, расположение интенсивной полосы поглощения в окне «прозрачности» биологических тканей и т. д.) [3], в связи с чем нашли широкое применение в клинической практике (Фотолон®, Foscan®, Verteporfin®, Радахлорин®, Tookad®, MACE® и др. [4]). Одним из наиболее эффективных порфириновых ФС является Темопорфин (mTHPC, рис. 1), одобренный к клиническому использованию в Евросоюзе в 2001 г. для паллиативного лечения рака головы и шеи [5]. В настоящей работе будут описаны механизмы распределения порфириновых ФС в сыворотке крови на примере mTHPC.

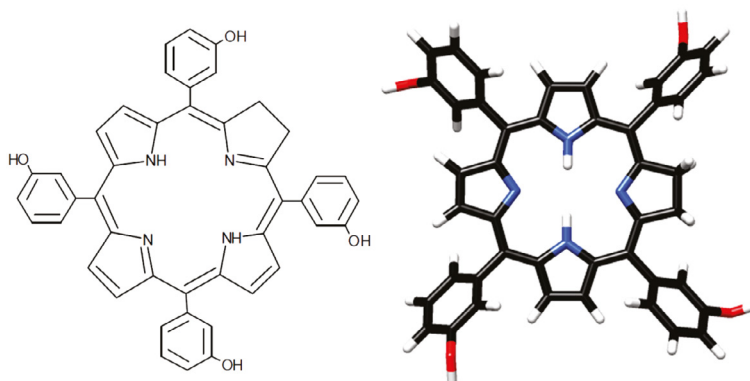


Рис. 1. Молекулярная и стерическая структура mTHPC

Fig. 1. Molecular and steric structures of mTHPC

Методы прямого определения сродства mTHPC к белкам сыворотки ограничиваются агрегацией его молекул в водной среде, в том числе и в крови. Для предотвращения процессов агрегации mTHPC был предложен ряд таких фармакологических форм, как липосомы, полимерные наночастицы, эмульсии с органическими растворителями, а также комплексы включения [6]. Согласно полученным ранее данным [7–8], производные β -ЦД с высокой эффективностью образуют комплексы включения по механизму «гость-хозяин» с mTHPC (рис. 2). Полученные константы ассоциации для комплексов включения mTHPC с М- β -ЦД принимают значения более чем 10^5 M^{-1} [8]. Столь высокие константы сродства mTHPC с М- β -ЦД объясняют значительное влияние ЦД на процессы распределения mTHPC в крови и в организме в целом [9–10]. В данной работе предлагается использовать производные β -ЦД для количественной оценки сродства mTHPC и других структурно подобных ФС к отдельным белкам сыворотки крови. С этой целью оптическими методами исследовались процессы связывания mTHPC между метил- β -циклодекстрином (М- β -ЦД) и изолированными белками сыворотки крови.

Материалы и методы исследования

Реагенты. mTHPC предоставленный компанией biolitec research GmbH (Германия), растворяли в 99,6 %-ном этиловом спирте до получения концентрации 1×10^{-3} моль/л. В работе использовали эмбриональную сыворотку телят производства «Sigma Aldrich», а также М- β -ЦД производства AraChem (Нидерланды). Содержание основного вещества составляло не менее 99 %.

Водные растворы готовили на основе фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (8 г NaCl, 0,20 г KCl, 1,44 г Na_2HPO_4 и 0,24 г KH_2PO_4 на 1 л раствора; pH=7,4). Стоковый раствор буфера при работе был разбавлен дистиллированной водой в соотношении 1:1.

Выделение компонентов сыворотки. Для выделения липопротеинов низкой (ЛНП) и высокой (ЛВП) плотности использовали последовательное центрифугирование при 40000 g в течение 36 ч на центрифуге Spinco (ЛКВ, Швеция). Объемную плотность образцов сыворотки крови доводили с помощью KBr до значений 1,063 г/мл (для ЛНП), а затем до 1,210 г/мл (для ЛВП). Полученные образцы переводили в ФСБ с помощью диализа.

Согласно [11], идентификацию выделенных фракций проводили с использованием биохимических методик анализа, оценивая при необходимости содержание белка, фосфолипидов, триглицеридов, свободного холестерина и его эфиров.

Фотометрические и флуоресцентные измерения. Характеристики флуоресценции измерялись с использованием спектрофлуориметра Solar CM-2203 (SOLAR, Беларусь), оборудованном термостатируемой ячейкой с магнитной мешалкой. Измерение концентрации мТГФХ проводили фотометрически на длине волны $\lambda=650$ нм (коэффициент экстинкции $\epsilon=30000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [12]). Оптическая плотность всех образцов на длинах волн возбуждения и регистрации флуоресценции не превышала 0,15.

Спектрально-флуоресцентный метод определения доли ФС, связанного с ЦД. Для измерения количества ФС, связанного с молекулами М- β -ЦД, в сыворотке крови использовали спектральный метод, основанный на спектральных особенностях полосы Core mTHPC при связывании с биологическими структурами [13–14]. В работе использовались следующие длины волн возбуждения флуоресценции: $\lambda_1=407$ нм и $\lambda_2=422$ нм. Регистрация флуоресценции проводилась на длине волны $\lambda=652$ нм. Для количественного описания спектрально-флуоресцентных изменений полосы Core mTHPC использовалось отношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении на $\lambda_1=407$ нм и $\lambda_2=422$ нм ($I_{\lambda_1}/I_{\lambda_2}$).

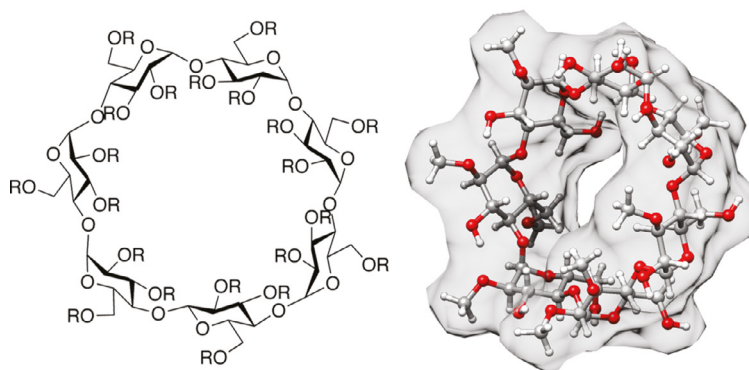


Рис. 2. Молекулярная и стерическая структура β -циклодекстрина

Fig. 2. Molecular and steric structures of β -cyclodextrin

Эксклюзионная гель-хроматография. мТНРС (1,5 мкМ) предварительно инкубировали в водных растворах 2 % сыворотки с различными концентрациями М- β -ЦД в течение 2 часов при температуре 37 °С в темноте. Методика разделения и биохимический анализ белковых фракций соответствовали описанным ранее [15], за исключением использования хроматографической колонки 1,5×35 см (Sigma, США), заполненной гелем Sephadex G-200 (GE Healthcare, США). Концентрацию мТНРС в хроматографических фракциях определяли путем измерения интенсивности флуоресценции ФС после добавления к образцу 0,2 % нейтрального детергента Triton® X-100. Значения интенсивностей флуоресценции были скорректированы с учетом объема фракции и раствора детергента.

Результаты исследований и их обсуждение

Используя техники ультрацентрифугирования и гель-хроматографии были изучены особенности процессов мТНРС между основными транспортными белками сыворотки крови [15–16]. Техника гель-хроматография позволяет проводить разделение раствора сывороточных белков по фракциям, согласно их размерам/массе. На рис. 3 представлена типичная хроматограмма раствора сыворотки крови. Использование техники биохимических маркеров показывает, что в-первую очередь из колонки выходят самые крупные транспортные белки – липопротеины низкой плотности (объем исключения 20–27 мл). Во фракциях второй полосы хроматограммы с объемами исключения от 27 до 35 мл находятся липопротеины высокой плотности и макроглобулины. В последнюю очередь из хроматографической колонки выходят сывороточный альбумин и иммуноглобулины (3 полоса, объем исключения 35–45 мл).

При пропускании через колонку образца сыворотки, окрашенного мТНРС, на основании анализа концентрации мТНРС во фракциях элюента можно количественно определить равновесное распределение ФС между белковыми компонентами (рис. 2) [10; 15]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что мТНРС в сыворотке крови распределяется следующим образом: почти 60 % связывается с липопротеинами высокой плотности, чуть более 35 % – с липопротеинами низкой плотности и около 5 % с другими сывороточными белками (кривая 1, рис. 4).

Формирование комплекса мТНРС с ЦД является обратимым процессом, то есть каждая молекула мТНРС может диссоциировать с последующим связыванием с другими молекулами (например, белками сыворотки) [10]. При добавлении малых концентраций М- β -ЦД (до 1 мкМ) изменений равновесного распределения мТНРС между белков сыворотки не наблюдаются. В случае высоких концентраций М- β -ЦД (более 50 мкМ), часть ФС связывается с ЦД, что приводит к появлению нового пика

на хроматограмме (объем исключения 50–70 мл). Таким образом, в силу малых размеров (около 3 нм [17]), комплексы включения выходят из хроматографической колонки после всех белков сыворотки крови. Относительный вес данного пика зависит от концентрации М-β-ЦД и концентрации белков сыворотки. Увеличение концентрации ЦД сопровождается ростом относительного веса фракции mТНРС в составе комплексов включения, в то время как при увеличении концентрации сыворотки наблюдается обратный эффект. Следует отметить, что присутствие М-β-ЦД не оказывает влияния на распределение mТНРС между основными транспортными сывороточными белками, что предполагает возможность использования ЦД для определения количественных характеристик связывания ФС с отдельными компонентами сыворотки крови.

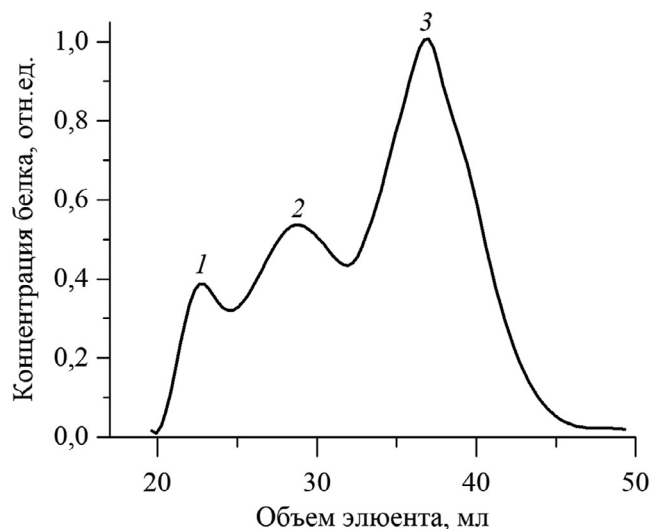


Рис. 3. Типичная хроматограмма белков сыворотки крови: 1 – липопротеины низкой плотности, 2 – липопротеины высокой плотности и макроглобулины, 3 – сывороточный альбумин и иммуноглобулины низкой плотности

Fig. 3. Typical chromatogram of blood serum proteins: 1 – low density lipoproteins, 2 – high density lipoproteins and macroglobulins, 3 – serum albumin and low density immunoglobulins

Результаты хроматографического анализа по распределению mТНРС между белками сыворотки и М-β-ЦД коррелируют с данными, полученными оптическими методами, разработанными в НИЛ биофизики и биотехнологии БГУ (Минск, Беларусь). Согласно работам [10; 13; 14], различия оптических характеристик mТНРС в составе комплексов включения с ЦД и в составе комплексов с белками сыворотки (величина кругового дихроизма, степень поляризации флуоресценции и др.) могут быть использованы для количественного анализа равновесных процессов распределения mТНРС. Более того, разработанные оптические методы позволяют детально изучать относительно быстрые кинетические процессы распределения ФС в сыворотке.

На рис. 5 представлены кинетики распределения mТНРС между комплексами включения с М-β-ЦД и белками сыворотки крови с использованием спектрально-флуоресцентной методики, основанной на изменении формы полосы Core mТНРС при связывании с различными биологическими структурами [13; 14]. Как было показано ранее, связывание молекулы mТНРС с белками сыворотки крови приводит к уменьшению интенсивности одной из компонент полосы Core mТНРС, вследствие конформационных изменений молекулы mТНРС, в то время как при образовании комплексов включения с ЦД наблюдается обратный эффект. Для количественного описания данной спектральной особенности было предложено использовать отношения интенсивностей флуоресценции mТНРС при возбуждении в различных участках полосы Core $I_{\lambda_1}/I_{\lambda_2}$. В случае перераспределения mТНРС между М-β-ЦД и белками сыворотки крови использовался возбуждающий свет с длинами волн $\lambda_1 = 407$ нм и $\lambda_2 = 422$ нм. Таким образом, при связывании ФС с молекулами ЦД величина $I_{407}/I_{422} = 0,63$.

Изменение концентрации ЦД в сыворотке крови сопровождается смещением равновесия в процессах образования комплексов включения, что обуславливает перераспределение ФС между комплексами включения и белками сыворотки, о чем свидетельствует уменьшение параметра I_{407}/I_{422} . При этом полному связыванию mТНРС с белковыми структурами соответствует значение параметра $I_{407}/I_{422} = 0,41$. В зависимости от концентрации М-β-ЦД равновесные значения I_{407}/I_{422} достигаются в течение 5–10 мин. Следует отметить, что увеличение концентрации сыворотки в 5 раз (от 1 до 5 %) приводит

к ускорению процесса перераспределения и смещению равновесного распределения mTHPC в сторону белков сыворотки.

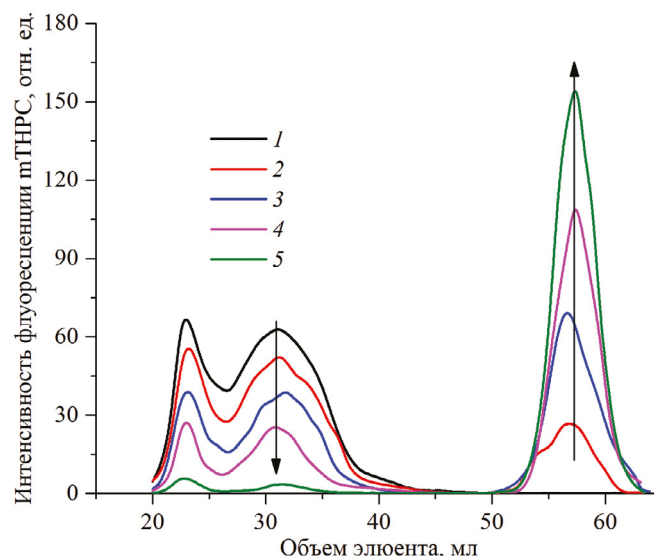


Рис. 4. Профили элюции 2 % раствора сыворотки с 1,5 мкМ mTHPC с добавлением различных концентраций М-β-ЦД: 1 – 0; 2 – 5; 3 – 10; 4 – 20; 5 – 200 мкМ

Fig. 4. Elution profiles of blood serum (2 %) with 2 μM mTHPC with addition of various M-β-CD concentrations: 1 – 0; 2 – 5; 3 – 10; 4 – 20; 5 – 200 μM

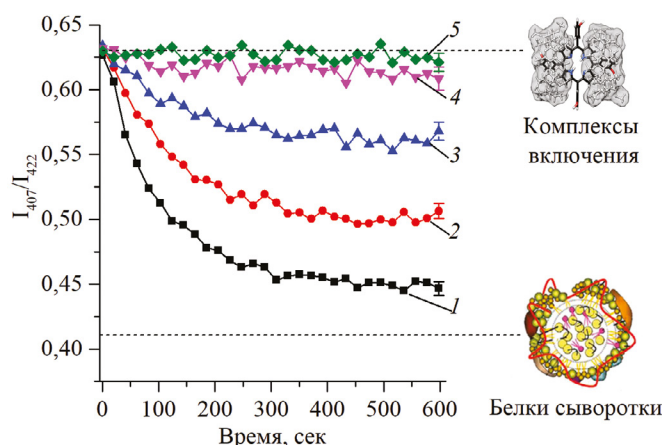


Рис. 5. Кинетики перераспределения mTHPC (0,5 мкМ) на транспортные белки сыворотки из состава комплексов включения с М-β-ЦД: 1 – 5; 2 – 10; 3 – 20; 4 – 50; 5 – 200 мкМ. Концентрация сыворотки – 1 %.

Fig. 5. Redistribution kinetics of 0,5 μM mTHPC to transport serum proteins from inclusion complexes with M-β-CD: 1 – 5; 2 – 10; 3 – 20; 4 – 50; 5 – 200 μM

Спектрально-флуоресцентные методы позволяют исследовать процессы равновесного связывания mTHPC с отдельными компонентами сыворотки крови. На рис. 6 представлены кривые равновесного распределения mTHPC между отдельными компонентами сыворотки крови и М-β-ЦД. Полученные результаты свидетельствуют о различном сродстве mTHPC к отдельным белкам сыворотки крови. Аналогичные результаты были получены с использованием методического подхода, основанного на изменении анизотропии флуоресценции mTHPC [10]. В данном подходе используются различия в скорости вращательной релаксации mTHPC в составе комплексов с белками сыворотки крови и ЦД, обусловленные различиями их размеров/масс. Так, в случае комплексов включения mTHPC с ЦД (размер 2–3 нм [17]) величина степени поляризации не превышает 3–4 %, то связывание mTHPC в составе

относительно больших белков сыворотки крови (8–30 нм [18]) обеспечивает высокое значение степени поляризации флуоресценции ФС (25–30 %).

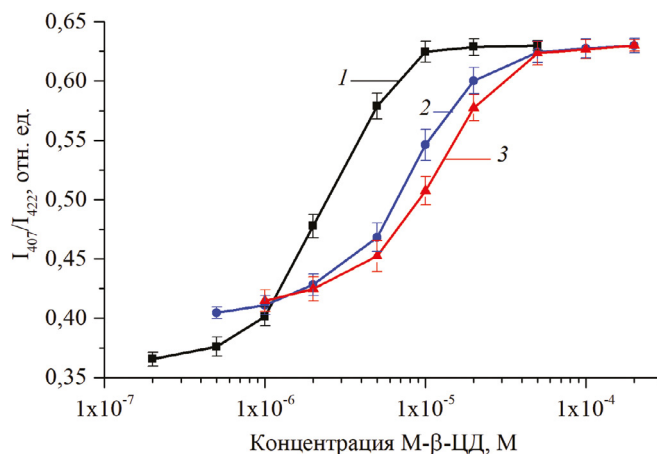


Рис. 6. Зависимость параметра I_{407}/I_{422} полосы Соре mTHPC (0,5 мкМ) при связывании с компонентах сыворотки крови от концентрации М-β-ЦД в растворе: 1 – сывороточный альбумин человека (2 мг/мл); 2 – липопротеины низкой плотности (0,1 мг/мл); 3 – липопротеины высокой плотности (0,1 мг/мл).

Fig. 6. Dependence of I_{407}/I_{422} Soret Band parameter of 0,5 μ M mTHPC bound to serum components on M- β -CD concentration in solution of: 1 – human serum albumin (2 mg/ml); 2 – low density lipoproteins (0,1 mg/ml); 3 – high density lipoproteins (0,1 mg/ml)

Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что М-β-ЦД оказывают значительное влияние на процессы распределения mTHPC между белками сыворотки крови. Установленные закономерности изменения относительного содержания комплексов включения mTHPC с М-β-ЦД в сыворотке крови в зависимости от концентрации М-β-ЦД свидетельствуют о том, что наличие стабильных комплексов включения mTHPC с М-β-ЦД наблюдается лишь при добавлении высоких концентраций М-β-ЦД (более 5 мкМ). Наличие таких молекул ФС имеет принципиальное значение в условиях распределения β-ЦД в крови, так как комплексы включения отличаются по фармакокинетическим свойствам от сывороточных белков. В то же время присутствие М-β-ЦД не оказывает влияния на распределение mTHPC между основными транспортными белками сыворотки крови, что позволяет нам использовать ЦД для количественной оценки характеристик связывания ФС с основными компонентами сыворотки крови.

Количественная оценка коэффициентов распределения mTHPC между основными компонентами сыворотки. На основании полученных в ходе работы данных был предложен метод определения сродства слаборастворимых ФС к биологическим структурам. Данный метод основан на анализе кривых титрования раствора препарата с биологическими структурами производными ЦД. Анализ полученных кривых титрования с использованием определенных ранее констант ассоциации с ЦД позволяет в свою очередь количественно оценить коэффициенты распределения mTHPC в случае различных компонентов сыворотки крови.

Для количественного анализа полученных кривых титрования были использованы константы ассоциации mTHPC с М-β-ЦД, полученные ранее в лаборатории НИЛ биофизики и биотехнологии БГУ (Минск, Беларусь) [19]. Были определены следующие интегральные коэффициенты распределения (константы ассоциации в случае сывороточного альбумина) mTHPC с основными белками сыворотки крови (K_s): сывороточный альбумин человека – $2,6 \text{ (моль/л)}^{-1}$, липопротеины низкой плотности – $4,8 \times 10^2 \text{ (моль/л)}^{-1}$, липопротеины высокой плотности – $1,0 \times 10^3 \text{ (моль/л)}^{-1}$. Соотношения полученных данных методом коэффициентов распределения mTHPC при связывании с белками плазмы хорошо согласуются с полученными ранее данными оценки относительного сродства данного ФС к белкам плазмы методом гель-хроматографии [15].

Заключение

В ходе работы было изучено влияние М-β-ЦД на кинетические и равновесные процессы распределения mTHPC в сыворотке крови. Определены константы ассоциации mTHPC с основными транспортными белками сыворотки и установлены закономерности изменения относительного содержания комплексов включения mTHPC с ЦД в сыворотке крови в зависимости от концентрации ЦД. Процессы перераспределения ФС определяются механизмами конкурентного связывания и носят обратимый

характер. Увеличение концентрации ЦД ведет к смещению равновесия в сторону комплексов включения и появлению в сыворотке крови фракции молекул ФС, связанных с ЦД. Полученные результаты позволяют предположить значительное влияние молекул ЦД на процессы проникновения и распределения mTHPC в опухолевой ткани.

Библиографические ссылки

1. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers // *Int. J. Biochem.* 1993. Vol. 25 (10). P. 1369–1375.
2. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2004. Vol. 1 (4). P. 279–293.
3. Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., et al. Photodynamic therapy of cancer: An update // *CA. Cancer J. Clin.* 2011. Vol. 61(4). P. 250–281.
4. Abrahamse H., Hamblin M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem. J.* 2016. Vol. 473. (4). P. 347–364.
5. Senge M. O., Brandt J. C. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) - a second-generation photosensitizer // *Photochem. Photobiol.* 2011. Vol. 87 (6). P. 1240–1296.
6. Marchal S. El Hor A., Millard M., et al. Anticancer Drug Delivery: An Update on Clinically Applied Nanotherapeutics // *Drugs.* 2015. Vol. 75 (14). P. 1601–1611.
7. Demore D., Kasselouri A., Bourdon O., et al. Enhancement of 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)chlorin Fluorescence Emission by Inclusion in Natural and Modified Cyclodextrins // *Appl. Spectrosc.* 1999. Vol. 53 (5). P. 523–527.
8. Bautista-Sanchez A., Kasselouri A., Desroches M. C., et al. Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005. Vol. 81 (3). P. 154–162.
9. Stella V. J., He Q. Cyclodextrins // *Toxicol. Pathol.* 2008. Vol. 36 (1). P. 30–42.
10. Yankovsky I., Bastien E., Yakavets I., et al. Inclusion complexation with β -cyclodextrin derivatives alters photodynamic activity and biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin // *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 91. P. 172–182.
11. Wasan K., Cassidy S. M., Kennedy A. L., et al. Lipoprotein Isolation and Analysis from Serum by Preparative Ultracentrifugation // *Methods Mol. Medicine.* 2001. Vol. 52. P. 27–35.
12. Bonnett R., Charlesworth P., Djelal B. D., et al. (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1999. Vol. 2. P. 325–328.
13. Яковец И. В., Янковский И. В., Болотина Л. И. и др. Особенности спектральных характеристик мета-тетра(гидроксифенил)хлорина в биологических системах // *Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика.* 2015. № 2. С. 39–45.
14. Yakavets I., Yankovsky I., Bolotine L., et al. Soret band shape indicates mTHPC distribution between β -cyclodextrins and serum proteins // *Dyes Pigments.* 2017. Vol. 137. P. 299–306.
15. Sasnouski S., Zorin V., Khludeyev I., et al. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1725 (3). P. 394–402.
16. Michael-Titus A. T., Whelpton R., Yaqub Z. Binding of temoporfin to the lipoprotein fractions of human serum. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995. Vol. 40 (6). P. 594–597.
17. Glisoni R. J., Chiappetta D. A., Moglioni A. G., et al. Novel 1-indanone Thiosemicarbazone Antiviral Candidates: Aqueous Solubilization and Physical Stabilization by Means of Cyclodextrins // *Pharm. Res.* 2011. Vol. 29 (3). P. 739–755.
18. Dobiášová M., Urbanová Z., Samánek M. Relations between particle size of HDL and LDL lipoproteins and cholesterol esterification rate // *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 2005. Vol. 54 (2). P. 159–165.
19. Яковец И. В., Янковский И. В., Борисов К. Н. и др. Spectral techniques for photosensitizer redistribution in blood serum // Прикладные проблемы оптики, информатики, радиофизики и физики конденсированного состояния : материалы третьей Междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 11–12 мая 2017 г.). Минск, 2017. С. 154–156.

References

1. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.* 1993. Vol. 25 (10). P. 1369–1375.
2. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2004. Vol. 1 (4). P. 279–293.
3. Agostinis P., Berg K., Cengel K. A., et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA. Cancer J. Clin.* 2011. Vol. 61(4). P. 250–281.
4. Abrahamse H., Hamblin M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* 2016. Vol. 473. (4). P. 347–364.
5. Senge M. O., Brandt J. C. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin) - a second-generation photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* 2011. Vol. 87 (6). P. 1240–1296.
6. Marchal S. El Hor A., Millard M., et al. Anticancer Drug Delivery: An Update on Clinically Applied Nanotherapeutics. *Drugs.* 2015. Vol. 75 (14). P. 1601–1611.
7. Demore D., Kasselouri A., Bourdon O., et al. Enhancement of 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)chlorin Fluorescence Emission by Inclusion in Natural and Modified Cyclodextrins. *Appl. Spectrosc.* 1999. Vol. 53 (5). P. 523–527.
8. Bautista-Sanchez A., Kasselouri A., Desroches M. C., et al. Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005. Vol. 81 (3). P. 154–162.
9. Stella V. J., He Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 2008. Vol. 36 (1). P. 30–42.
10. Yankovsky I., Bastien E., Yakavets I., et al. Inclusion complexation with β -cyclodextrin derivatives alters photodynamic activity and biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 91. P. 172–182.

11. Wasan K., Cassidy S. M., Kennedy A. L., et al. Lipoprotein Isolation and Analysis from Serum by Preparative Ultracentrifugation. *Methods Mol. Medicine*. 2001. Vol. 52. P. 27–35.
12. Bonnett R., Charlesworth P., Djelal B. D., et al. (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. 1999. Vol. 2. P. 325–328.
13. Yakovec, I. V., Yankovsky I. V., Bolotine L. N., et al. Spectral characteristics of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in biological systems. *Vestnik BSU. Seriya I, Physics. Mathematics. Information Science*. 2015. No 2. P. 39–45 (in Russ.).
14. Yakavets I., Yankovsky I., Bolotine L., et al. Soret band shape indicates mTHPC distribution between β -cyclodextrins and serum proteins. *Dyes Pigments*. 2017. Vol. 137. P. 299–306.
15. Sasnouski S., Zorin V., Khludeyev I., et al. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. Vol. 1725 (3). P. 394–402.
16. Michael-Titus A. T., Whelpton R., Yaqub Z. Binding of temoporfin to the lipoprotein fractions of human serum. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995. Vol. 40 (6). P. 594–597.
17. Glisoni R. J., Chiappetta D. A., Moglioni A. G., et al. Novel 1-indanone Thiosemicarbazone Antiviral Candidates: Aqueous Solubilization and Physical Stabilization by Means of Cyclodextrins. *Pharm. Res.* 2011. Vol. 29 (3). P. 739–755.
18. Dobiášová M., Urbanová Z., Samánek M. Relations between particle size of HDL and LDL lipoproteins and cholesterol esterification rate. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 2005. Vol. 54 (2). P. 159–165.
19. Yakavets I. V., Yankovsky I. V., Barysau K. N., et al. Spectral techniques for photosensitizer redistribution in blood serum. *Applied problems of optics, informatics, radiophysics and condensed matter physics : materialy 3 mezdynar. konf.* (Minsk, 11–12 mai, 2017). Minsk, 2017. P. 154–156 (in Russ.).

Статья поступила в редакцию 29.05.2017
Received by editorial board 29.05.2017