

Влияние наноносителя на спектральные характеристики хлорина e_6 в растворах с различными значениями pH

М. В. Пархоц¹⁾, С. В. Лепешкевич¹⁾, Yu. Cai²⁾

¹⁾ *Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: m.parkhots@ifanbel.bas-net.by*

²⁾ *Jinan University, Guangzhou, Guangdong, People's Republic of China,
e-mail: caiyu8@sohu.com*

В буферных растворах при pH 7.4 взаимодействие хлорина e_6 с наноносителем на основе сывороточного альбумина приводит к смещению полос поглощения и флуоресценции фотосенсибилизатора в длинноволновую область спектра. При уменьшении pH раствора наблюдается изменение спектральных характеристик хлорина e_6 , свидетельствующее о протонировании карбоксильных групп фотосенсибилизатора, что ослабляет его взаимодействие с аминокислотными остатками альбумина и приводит к выходу хлорина e_6 из комплекса с наноносителем.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор; хлорин e_6 ; альбумин; наноноситель; спектральные характеристики.

Influence of nanocarrier on spectral properties of chlorin e_6 in solutions with different pH values

M. V. Parkhots¹⁾, S. V. Lepeshkevich¹⁾, Yu. Cai²⁾

¹⁾ *B. I. Stepanov Institute of Physics of the NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: m.parkhots@ifanbel.bas-net.by*

²⁾ *Jinan University, Guangzhou, Guangdong, People's Republic of China,
e-mail: caiyu8@sohu.com*

In buffer solutions at pH 7.4, the interaction of chlorin e_6 with a serum albumin-based nanocarrier leads to a shift in the absorption and fluorescence bands of the photosensitizer toward longer wavelengths. With a decrease in the pH of the solution, a change in the spectral characteristics of chlorin e_6 is observed, indicating protonation of the carboxyl groups of the photosensitizer, which weakens its interaction with the amino acid residues of albumin and leads to the release of chlorin e_6 from the complex with the nanocarrier.

Keywords: photosensitizer; chlorin e_6 ; albumin; nanocarrier; spectral properties.

Введение

На сегодняшний день создание эффективных систем доставки лекарственных средств в опухолевые клетки считается одной из приоритетных задач, способствующей развитию методов лечения онкологических заболеваний, в том числе метода фотодинамической терапии. Применение наночастиц и других наноматериалов в роли транспортных систем помогает устранить основные проблемы противоопухолевых препаратов, такие как слабая избирательность накопления в опухолевых клетках и плохая растворимость в воде. Среди различных органических и неорганических материалов, используемых для создания систем доставки лекарств,

наночастицы на основе сывороточного альбумина получили широкое распространение [1].

Сывороточный альбумин является одним из наиболее распространенных белков плазмы крови, который обладает хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью, нетоксичностью и неиммуногенностью. К преимуществам альбумина можно также отнести простоту приготовления и функционализации. Более того, “наночастицы” альбумина – связанные между собой молекулы сывороточного альбумина, способны накапливаться в опухоли не только вследствие пассивного “эффекта повышенной проницаемости и удерживания”, но также за счет эффективного взаимодействия с рецептором gp60, белком эндотелиальной мембраны сосудов, и специфическим рецептором SPARC, внеклеточным матриксным гликопротеином, который сверхэкспрессируется в различных опухолях и способствует накоплению альбумина в опухолевых клетках [1]. Использование альбумина позволяет избежать образования на поверхности наночастиц так называемой “белковой короны”, которая приводит к изменению фармакокинетики, устойчивости и других параметров разрабатываемых наночастиц [2]. Наличие у альбумина как гидрофобных, так и гидрофильных областей, а также различных функциональных групп позволяет нагружать его большим количеством полярных и неполярных лекарственных соединений, что, в свою очередь, открывает возможности использования данного носителя для доставки в опухолевые клетки препаратов различного действия и, таким образом, совмещать или комбинировать различные виды терапии для более эффективного лечения онкологических заболеваний.

Целью данной работы было провести исследования влияния наночастицы на основе сывороточного альбумина на спектральные характеристики фотосенсибилизатора (ФС) хлорина e_6 в растворах с различными значениями pH.

1. Материалы и методы

Для создания наночастиц был использован бычий сывороточный альбумин (BSA) (Biosciences, США, чистота 98 %). Наночастица была предоставлена китайскими коллегами. В качестве фотосенсибилизатора использовали хлорин e_6 (РУП «Белмедпрепараты»). Исследования проводились в 10 мМ натрий-фосфатном буферном растворе pH 7.4. Для изменения pH раствора использовалась 0.1 М HCl. Значение pH контролировалось с помощью pH-метра HI8314 (фирмы HANNA Instruments). Спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Proscan MC122 (Беларусь), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Fluorolog-3 (HORIBA Scientific, Япония-США-Франция).

2. Результаты и их обсуждение

Спектры поглощения и флуоресценции хлорина e_6 (Ce6) при различной концентрации альбумина в буферном растворе при pH 7.4 представлены на рис. 1 и рис. 2. Видно, что при взаимодействии с альбумином спектры поглощения и флуоресценции Ce6 смещаются в длинноволновую область спектра на 7–12 нм.

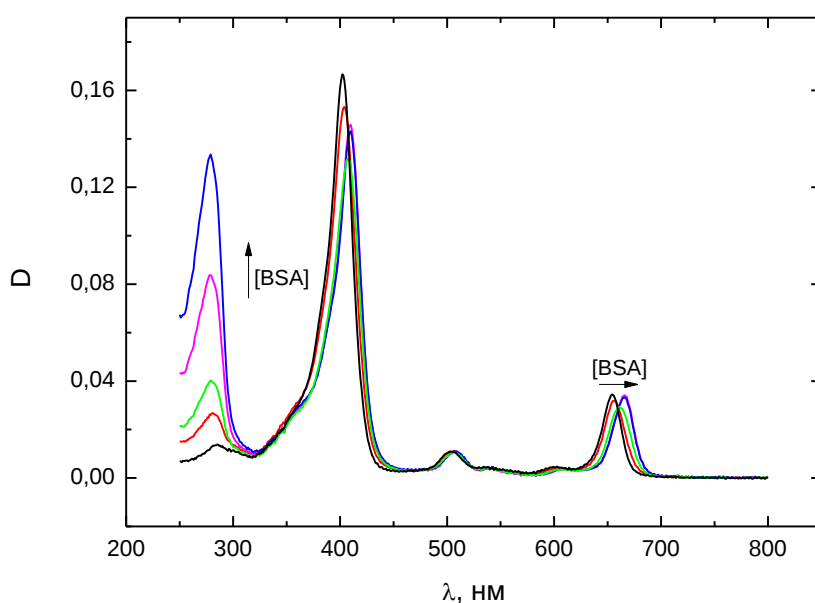


Рис. 1. Спектры поглощения хлорина e_6 в буферном растворе при pH 7.4 при увеличивающейся концентрации альбумина (BSA)

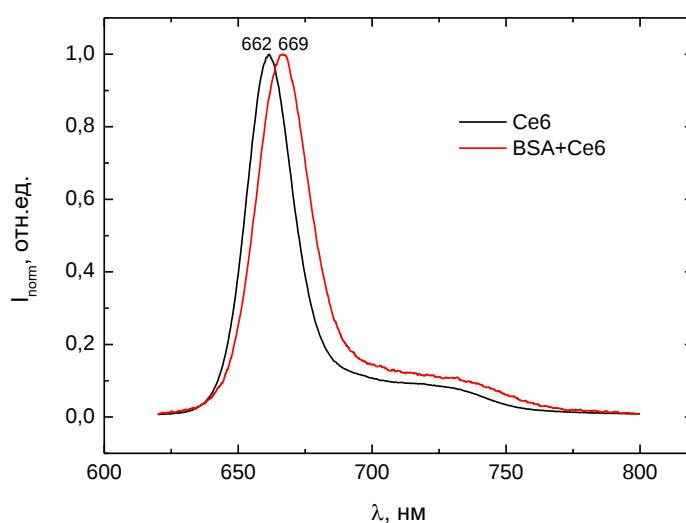


Рис. 2. Спектры флуоресценции хлорина e_6 (Ce6) в буферном растворе при pH 7.4 и его комплекса с альбумином (BSA)

При этом наблюдается тушение флуоресценции триптофановых остатков белка, свидетельствующее о связывании молекул хлорина с альбумином. Согласно литературным данным [3], Ce6 имеет два основных сайта связывания с альбумином, сайт Sudlow I и сайт связывания гема. Связывание Ce6 в данных сайтах приводит к тушению флуоресценции триптофановых остатков белка, наблюдаемую в наших экспериментах.

Исследования влияния рН на спектральные характеристики Себ проводились при молярном соотношении белка и хлорина e_6 1:1, в условиях, когда все молекулы ФС находятся в связанном с белком состоянии. Постепенное увеличение концентрации 0.1 М HCl в растворе приводит к уменьшению рН вплоть до рН 2, при этом происходит изменение абсорбционных характеристик хлорина e_6 , представленное на рис. 3.

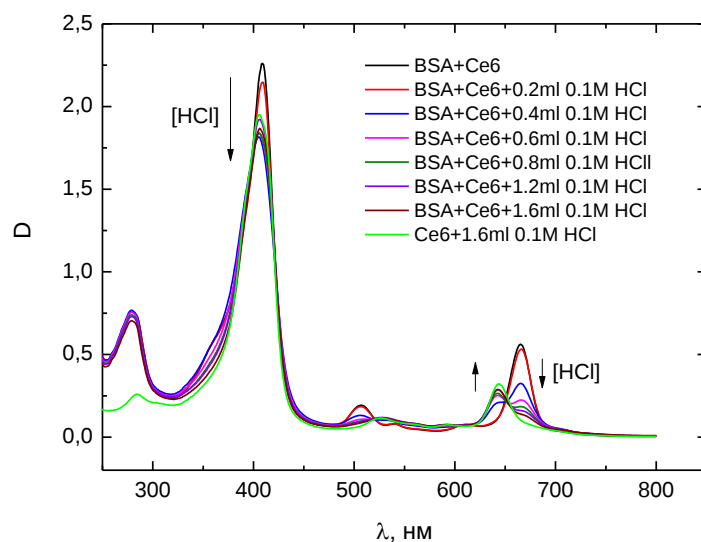


Рис. 3. Спектры поглощения хлорина e_6 в комплексе с альбумином при различных значениях рН раствора

Обнаружено, что при рН 6.0 (0.2 мл 0.1М HCl) наблюдаются незначительные изменения спектральных характеристик Себ, однако дальнейшее уменьшение рН приводит к уменьшению интенсивности полосы поглощения в области 666 нм, характерной для комплекса BSA-Себ, и появлению новой полосы в области 643 нм (рис. 3). При этом полосы поглощения в области 500–530 нм постепенно размываются, а полоса Соре уширяется и смещаются в коротковолновую сторону на 4 нм. Следует отметить, что даже при рН 2.0 полоса в области 666 нм до конца не исчезает. Для сравнения на рис. 3 представлен также спектр поглощения Себ в отсутствии альбумина при рН 2.0.

Согласно проведенным ранее исследованиям и литературным данным [4, 5] молекулы хлорина в водных средах могут образовывать агрегаты, особенно в кислой области значений рН. Кроме того, из расчетных [3] и экспериментальных данных [6, 7] следует, что связывание молекул хлорина e_6 в двух основных сайтах альбумина (сайт Sudlow I и сайт связывания гема) существенно зависит от наличия депротонированных карбоксильных групп на периферии хлорина e_6 . Отрицательно заряженные COO^- способствуют стабилизации молекул Себ в гидрофобных полостях белка за счет образования солевых мостиков с положительно заряженными аминокислотными остатками белка. Из сравнения литературных и экспериментальных данных, можно сделать заключение, что уменьшение рН раствора способствует выходу молекул Себ из комплекса с альбумином.

Заключение

Показано, что в буферных растворах при pH 7.4 взаимодействие хлорина e₆ с наноносителем на основе сывороточного альбумина приводит к смещению полос поглощения и флуоресценции фотосенсибилизатора в длинноволновую область спектра на 7–12 нм. Уменьшение pH раствора приводит к изменению спектральных характеристик хлорина e₆, свидетельствующему о протонировании карбоксильных групп фотосенсибилизатора, что, в свою очередь, ослабляет его взаимодействие с аминокислотными остатками альбумина и приводит к выходу молекул хлорина e₆ из комплекса с наноносителем. Наличие небольшой полосы поглощения в области 666 нм при pH 2.0 свидетельствует о неполном разрушении комплекса фотосенсибилизатора с белком даже при достаточно низких значениях pH раствора.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф25КИ-31).

Библиографические ссылки

1. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems / A. O. Elzoghby [et al.] // *J. Control Release*. 2012. V. 157. P. 168–182.
2. Nienhaus K. Nanoparticles for biomedical applications: exploring and exploiting molecular interactions at the nano-bio interface / K. Nienhaus, H. Wang, G. U Nienhaus. // *Mater. Today Adv.* 2020. V. 5. P. 100036-1–100036-20.
3. Dissecting the Interactions between Chlorin e6 and Human Serum Albumin / A. Marconi [et al.] // *Molecules*. 2023. V. 28. P. 2348-1–2348-15.
4. Increased Binding of Chlorin e6 to Lipoproteins at Low pH Values / Cunderlíková B. [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000. V. 32. P. 759–768.
5. Динамика и эффективность фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода хлорином e₆: влияние pH раствора и поливинилпирролидона / М.В. Пархоц [и др.] // *Опт. Спектр.* 2009. Т. 107, № 6. С. 1026–1032.
6. pH-Dependent Changes in the Mechanisms of Transport of Chlorine e6 and Its Derivatives in the Blood / Khludeev I.I. [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. 160. P. 208–212.
7. The pH-Dependent Distribution of the Photosensitizer Chlorin E6 among Plasma Proteins and Membranes: A Physico-Chemical Approach / Mojzisova H. [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2007. 1768. P. 366–374.