

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук

На правах рукописи

ГОЛОВИНА ГАЛИНА ВЛАДИМИРОВНА

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ
ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
С АЛЬБУМИНОМ И ЛИПОПРОТЕИНАМИ**

02.00.04 – Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Кузьмин Владимир Александрович

Москва 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	03
Глава I. Литературный обзор	07
1.1 Фотодинамическая и борнейтронозахватная терапия	07
1.2 Фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии	16
1.3 Сывороточный альбумин	23
1.4 Взаимодействие сенсibilизаторов с альбумином и липопротеинами	31
Глава II. Материалы и методы исследования	47
Глава III. Результаты исследования	51
3.1 Комплексообразование Zn-, Ni- и Pd-производных пурпурина- 18 с сывороточным альбумином	51
3.2 Комплексообразование диборированных производных метилфеофорбида <i>a</i> с альбумином и липопротеинами	56
3.3 Роль кислотности среды в комплексообразовании пирофеофорбида <i>a</i> с альбумином и липопротеинами	70
Заключение	78
Выводы	79
Список используемых сокращений	81
Список используемой литературы	82

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Фотодинамическая терапия (ФДТ) и борнейтронозахватная терапия (БНЗТ) являются перспективными методами лечения онкологических заболеваний. Терапевтический эффект основан на индуцировании реакционных форм, приводящих к деструкции опухоли, воздействием света либо тепловых нейтронов на пораженный участок, содержащий фото/радиосенсибилизатор (ФС/РС). В качестве ФС/РС могут быть использованы тетрапиррольные макроциклы с различными заместителями, например, карборановыми. В случае БНЗТ тетрапиррольный фрагмент отвечает за селективную доставку препарата в опухоль, тогда как карборан обеспечивает необходимую концентрацию бора в клетке. Существуют данные об улучшении противоопухолевых характеристик ФС, несущих борные полиэдры, по сравнению с их неборированными аналогами и для ФДТ.

Количественными характеристиками, позволяющими проводить сравнение эффективности ФС/РС, являются константы комплексообразования ФС/РС с основными компонентами плазмы крови – альбумином (человеческий сывороточный альбумин, ЧСА) и липопротеинами низкой плотности (ЛНП) – переносчиками многих лекарственных препаратов. Альбумин – одноцепочечный белок с высокой конформационной приспособляемостью к различным лигандам и несущий специфический сайт связывания с гемоподобными структурами. ЛНП – частицы сферической формы диаметром до 25 нм, содержащие липиды и белки. Связывание ФС/РС с ЧСА и ЛНП может определяться различными факторами, такими как наличие заместителей в молекуле сенсибилизатора, природой центрального иона-металла и условия среды (рН).

Таким образом, **целью** настоящей работы являлось изучение влияния заместителей, природы металла и рН среды на комплексообразование

потенциальных ФС/РС с ЧСА и ЛНП физико-химическими методами. К данным ФС/РС относятся, во-первых, металлические производные пурпурина-18; металлокомплексы тетрапирролов, в частности пурпурина-18, нашли широкое применение в качестве перспективных ФС для ФДТ. Связывание ЧСА и безметального пурпурина-18 исследовано. Однако введение металла в молекулу пурпурина-18 может оказывать влияние на величину константы связывания, что, в свою очередь, обуславливает тот или иной фотодинамический эффект.

Во-вторых, нами были исследованы производные метилфеофорбида *a* (МФФ), несущие борные полиэдры. Такие объемные группы могут препятствовать взаимодействию ФС/РС с сывороточным альбумином за счет возникающих стерических затруднений. Тем не менее, высокое сродство ФС/РС к ЛНП способно компенсировать этот нежелательный эффект. В связи с этим высокий интерес представляет изучение взаимодействия ФС/РС с ЧСА и ЛНП, что является важным аспектом в определении систем переноса этих соединений.

И, наконец, объектом наших исследований являлся пиррофеофорбид *a* (ПФФ) – ФС, несущий карбоксильную группу – производные которого широко применяются в ФДТ. В опухолях рН нередко снижен, комплексообразование же ФС с макромолекулами и, следовательно, результат фотовоздействия, могут зависеть от кислотности среды. Таким образом, изучение влияния рН среды на комплексообразование ПФФ с ЧСА и ЛНП – актуальная проблема.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

– исследовать влияние центрального атома металла на процессы комплексообразования ФС с ЧСА на примере металлических производных пурпурина-18, содержащих в качестве центральных атомов Zn, Ni и Pd;

– исследовать влияние объемных периферийных заместителей на процессы комплексообразования с белками ЧСА и ЛНП на примере диборированных производных метилфеофорбида *a* и сравнить полученные значения с данными для незамещенного метилфеофорбида;

– исследовать роль кислотности среды в процессах комплексообразования на примере связывания пирофеофорбида *a* с ЧСА и ЛНП.

Научная новизна работы. Впервые изучено взаимодействие Zn-, Ni-, Pd-металлокомплексов пурпурина-18 с ЧСА и метилфеофорбида *a* и его диборированных аналогов – 13(2),17(3)-[ди(*o*-карборан-1-ил)метокси карбонил]феофорбид *a* и 13(2),17(3)-[ди(1-карба-клого-додекаборан-1-ил)метоксикарбонил]феофорбид *a* – с ЧСА и ЛНП. Нами установлено, что ЛНП – предпочтительный белок-переносчик диборированных производных. Исследовано ранее не изученное взаимодействие пирофеофорбида *a* с ЧСА и ЛНП и показано влияние среды на процессы комплексообразования. Предложен предпочтительный механизм доставки пирофеофорбида в опухоль.

Практическая значимость работы. Полученные результаты позволяют предложить механизм доставки исследуемых соединений в опухоль и оптимизировать разработку терапевтических ФС/РС на основе данных соединений.

Методы исследования. Для выполнения работы были использованы физико-химические методы: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, метод однофотонного счета, лазерный фотолиз. Обработку результатов проводили с применением программы Pro-Data Viewer version 4.2.5 и Origin 6.1. Компьютерное моделирование проводилось с использованием программ Build Model, Lead Finder, Molsoft ICM 3.6, Avogadro 1.0.3, Gamess US.

На защиту выносятся следующие положения:

- Ионы Zn^{2+} и Ni^{2+} в пурпурине-18 способны координироваться с кислородом тирозина в сайте связывания ЧСА за счет образования дополнительных аксиальных связей, тогда как координационная насыщенность Pd^{2+} препятствует такому взаимодействию.
- Введение в тетрапиррольную молекулу двух объемных заместителей-карборанов приводит к стерическим препятствиям при их комплексообразовании с ЧСА, однако не влияет на взаимодействие с ЛНП.
- Реакция комплексообразования СООН-содержащего тетрапиррола с ЧСА в отличие от его комплексообразования с ЛНП является чувствительной к рН среды.
- Механизм доставки диборированного/СООН-содержащего тетрапиррола в опухолевую ткань может быть опосредован липопротеиновым транспортом.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на X Международной конференции по физической и координационной химии порфиринов и их аналогов (Иваново, 2009), XXI Симпозиуме «Современная химическая физика» (Туапсе, 2009), IX, X и XI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН – ВУЗы (Москва, 2009–2011).

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ И БОРНЕЙТРОНОЗАХВАТНАЯ ТЕРАПИЯ

ФДТ [1] БНЗТ [2] – новые перспективные методы лечения онкологических заболеваний, представляющие альтернативу радиационной терапии, химиотерапии и хирургическому вмешательству; последние могут иметь сильные побочные эффекты, подчас угрожающие жизни пациента. Терапевтический эффект достигается комбинированным воздействием света (в случае ФДТ) либо тепловых нейтронов (БНЗТ) и сенбилизатора (ФС или РС) на патологические очаги, главным образом, новообразования. Активированный светом/нейтронами ФС/РС подвергается химическим превращениям, в ходе которых вырабатываются цитотоксичные продукты.

К основному преимуществу данных методов относится то, что в пораженных участках восстанавливаются здоровые ткани [3, 4]. Кроме того, флуоресценция сенсбилизатора позволяет определять его накопление в опухоли *in vivo*, а также выявлять локализацию опухолевой ткани на микроскопическом уровне [5, 6]. При необходимости ФДТ/БНЗТ могут быть использованы в сочетании с другими видами противоопухолевой терапии [7-9]. Можно говорить о перспективах проведения ФДТ неопухолевых заболеваний [10].

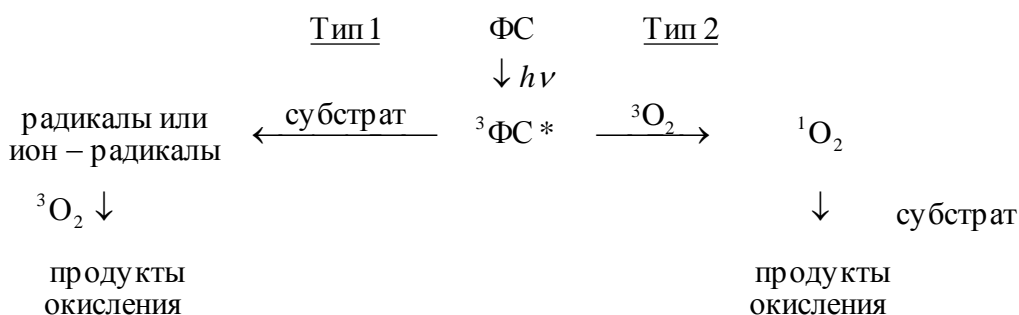
Введенные в организм молекулы ФС/РС избирательно накапливаются в опухолевой ткани благодаря уникальной способности удерживаться в злокачественных новообразованиях. Ни свет, ни сенсбилизатор сами по себе не способны генерировать цитотоксические продукты, поэтому и нормальная и злокачественная ткань могут быть обработаны одной дозой света одновременно. Таким образом, достигается селективная деструкция неопластической ткани, в то время как здоровая ткань остается нетронутой

[1]. Однако практика показывает, что опухолевая селективность также как и некроз являются сложно достижимыми [11].

Механизмы фотодинамического действия. На клеточном уровне механизм фотодинамического действия может быть описан следующим образом: $S + h\nu \rightarrow \{S^* \xrightarrow{O_2} \text{Токсичные продукты} \rightarrow \text{Повреждение клетки}\} \rightarrow \text{Некроз}$, где S и S^* – основное и возбужденное состояние ФС, соответственно. Возбужденное состояние образуется при поглощении фотона света $h\nu$. В то время как начальная и конечная стадии хорошо изучены, промежуточные процессы являются недостаточно исследованными и их понимание во многом основано на догадках. Механизм фотодинамического действия представляет собой две составляющие: 1) фотохимические и фотофизические превращения ФС и 2) биологический отклик клетки на продукты фотореакции [1].

Образование цитотоксических продуктов осуществляется двумя типам процессов, Тип 1 и Тип 2 (схема 1). Эти процессы проходят через триплетное состояние ФС T_1 , которое образуется путем интеркомбинационной конверсии (ИК) из возбужденного синглетного состояния S_1 , что представлено на диаграмме Яблонского (рисунок 1) [1].

Схема 1. Фотохимические процессы при ФДТ



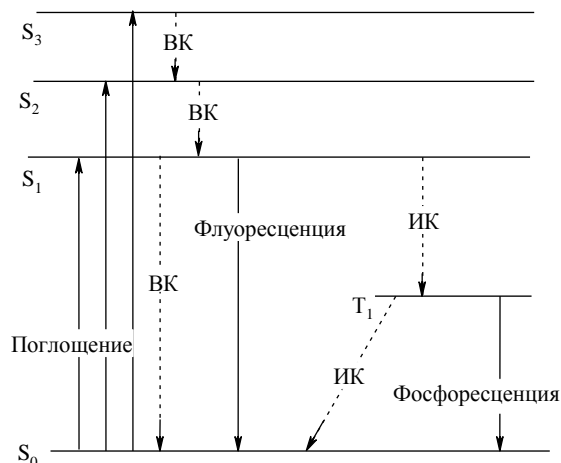
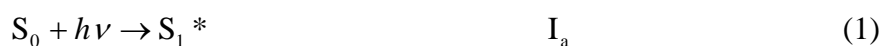


Рисунок. 1. Диаграмма Яблонского. S_0 – основное синглетное состояние ФС; S_1 , S_2 и S_3 – возбужденные синглетные состояния ФС; T_1 – триплетное состояние ФС; ВК – внутренняя конверсия и ИК – интеркомбинационная конверсия.

Механизму по Типу 1 соответствуют реакции переноса электрона (или атома водорода) между ФС и субстратом или растворителем с образованием радикалов или ион-радикалов. Радикальные или ион-радикальные формы могут в свою очередь реагировать с кислородом с образованием радикал-аниона $O_2^{\bullet-}$, который может протонироваться при низких рН и образовывать реакционно-способный радикал HO_2^{\bullet} . Следует отметить, что образование $O_2^{\bullet-}$ прямым переносом электрона от возбужденного ФС на молекулярный кислород также относится к процессу Типа 1. В случае процесса Типа 2 перенос энергии от ФС на кислород в основном состоянии приводит к образованию возбужденного синглетного кислорода 1O_2 [1].

До некоторого времени для многих систем Тип 2 считался преобладающим или даже единственно возможным процессом. Однако недавние исследования дают повод утверждать, что наличие преобладающего и тем более единственного механизма не характерно ни для одной из систем. Т.е. одновременно осуществляются и процессы по Типу 1 (перенос электрона от ФС в триплетном состоянии на биологический субстрат или нативный свободный радикал) и процессы по Типу 2 (перенос энергии с образованием синглетного кислорода), продукты которых, в конечном счете, приводят к гибели клетки [12-15]. В большинстве случаев вопрос о преобладании того или иного механизма остается всё еще неразрешенным.

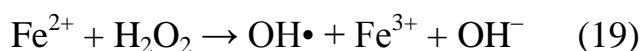
Первичные фотопроцессы, которые приводят к генерации триплетного состояния, показаны на рисунке 1. После поглощения фотона света молекула вовлекается в конкурирующие между собой процессы возврата в свое основное состояние либо генерации фотопродуктов. Избыточная энергия, полученная молекулой при поглощении света (т.е. при возбуждении и переходе электрона на один из колебательных подуровней первого синглетного состояния), растрчивается, превращаясь из электронной в колебательную, которая рассеивается в окружающую среду. В своем низшем синглетном состоянии молекула может флуоресцировать либо подвергаться безызлучательным переходам $S_1 \rightarrow S_0$, $S_1 \rightarrow T_1$. Из триплетного состояния она может либо фосфоресцировать, либо подвергаться безызлучательному переходу в основное состояние S_0 . Безызлучательные переходы, которые случаются между состояниями одной мультиплетности $S_n \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_0$, $T_n \rightarrow T_1$, называются внутренней конверсией (ВК), тогда как эти явления между состояниями различной мультиплетности, $S_1 \rightarrow T_n$ и $T_1 \rightarrow S_0$, носят название интеркомбинационной конверсии (ИК). Эти процессы с образованием цитотоксических агентов могут быть описаны следующим образом:



Справа указаны скорости процессов, параметры k_I и k_{II} являются константами скорости для реакций триплетного состояния T_1^* с субстратом R (механизм Типа I) и $(^3\Sigma_g^-) O_2$ (механизм Типа II), соответственно.

Квантовый выход синглетного кислорода зависит как от квантового выхода интеркомбинационной конверсии, так и от времени жизни триплетного состояния ФС [1]. Например, фталоцианин меди CuS_4Pc дает высокий квантовый выход интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$, $\Phi_{\text{ИК}} = 0.94$, но его триплетное состояние является слишком коротко живущим ($\tau_T = 0.065$ мкс), чтобы взаимодействовать с молекулярным кислородом $\Phi_{\Delta} \sim 0$ [16]. На величину квантового выхода синглетного кислорода оказывает влияние природа заместителей ФС. Так, в работе С. Матаи и соавт. [17] показано, что значения квантового выхода синглетного кислорода для гематопорфирина IX, производного гематопорфирина и борированного протопорфирина в нейтральных положениях имеют некоторые расхождения из-за нарушения планарности последнего. Введение же Zn в исследуемые соединения приводило к значительному уменьшению квантового выхода всех трех исследуемых соединений.

Свободный радикал сенсibilизатора $S_2^{\bullet-}$ способен реагировать с кислородом с образованием иона супероксида $O_2^{\bullet-}$ (Тип 1), который может вовлекаться в цепочку превращений с образованием крайне реакционно-способного гидроксильного радикала $\text{OH}\bullet$:



Поскольку pH в опухолях часто ниже относительно нормальной ткани, возможно, что вплоть до 10 % анион-радикала супероксида $O_2^{\bullet-}$ существует в форме $\text{HO}_2\bullet$, которая является гораздо более реакционноспособной [18].

Взаимосвязь между общей реакционной способностью частиц, называемых активными формами кислорода (АФК), по отношению к биомолекулам и диффузионным расстоянием (временем жизни) этих активных форм представлена на рисунке 2. Таким образом, время жизни

АФК ограничивает расстояние, на которое она может диффундировать в клетке. Оценочно расстояние диффузии синглетного кислорода в клетке составляет 45 нм [19]. При этом скорость его диффузии и время жизни в разных областях клетки может значительно различаться [19, 20].

Как уже было сказано выше, на практике оба механизма (Тип I и Тип II) будут происходить одновременно, конкурируя между собой. Тип I обычно встречается, когда ФС находится в очень тесном контакте с субстратом, в то время как синглетный кислород $O_2 (^1\Delta_g)$ может диффундировать перед вступлением в реакцию. Он является высоко электрофильным и будет атаковать области биомолекул, насыщенные электронами. Чтобы попытаться различить эти два механизма, используются ингибиторы, способные взаимодействовать с различными интермедиатами. Так, азид – очень эффективный тушитель синглетного кислорода, и его добавление могло бы значительно замедлить скорость для механизма по Типу II. Замена H_2O на D_2O увеличивает время жизни синглетного кислорода в десять раз, изменяя конкурентную кинетику соответственно [1].

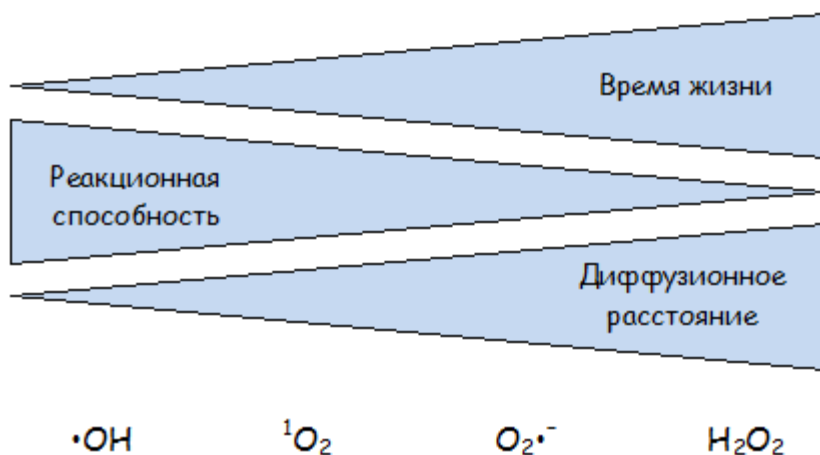


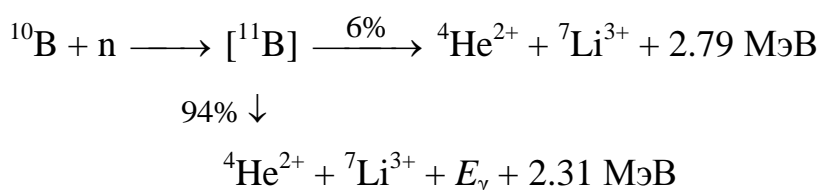
Рисунок 2. Поведение различных АФК в клетке.

Существует много способов исследования преобладающего механизма, таких как спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (определение супероксид-аниона) и инфракрасное излучение (регистрация фосфоресценции синглетного кислорода при 1270 нм). Однако, полученный по Типу II синглетный кислород может быть восстановлен ионизированными тиоловыми группами или никотинамидадениндинуклеотидом, что приводит к образованию анион-радикала супероксида $O_2^{\bullet-}$ и делает практически невозможным различить эти два механизма [18].

Необходимым компонентом для фотодинамического действия является кислород. Однако опухолевые клетки скудно обеспечены кровью, что ведет к накоплению в ткани таких продуктов как диоксид углерода и к некоторой степени анаэробного дыхания, происходящего из-за низкого парциального давления кислорода в опухоли. На уровень кислорода внутри опухоли в течение облучения будут оказывать влияние сосудистые повреждения, уменьшая поставку крови в опухоль и тем самым замедляя образование синглетного кислорода [21].

Основные положения БНЗТ. Концепция нейтронозахватной терапии была выдвинута Г.Л. Лочером в 1936 году, спустя 4 года после открытия нейтрона [22]. Лочер предложил использование нерадиоактивного изотопа ^{10}B для селективного разрушения раковых клеток при поглощении тепловых нейтронов. В результате реакции между атомным ядром и нейтроном возникает так называемая вторичная, или испускаемая радиация, носителем которой являются α -частицы (схема 2, рисунок 3).

Схема 2. Химические превращения при БНЗТ



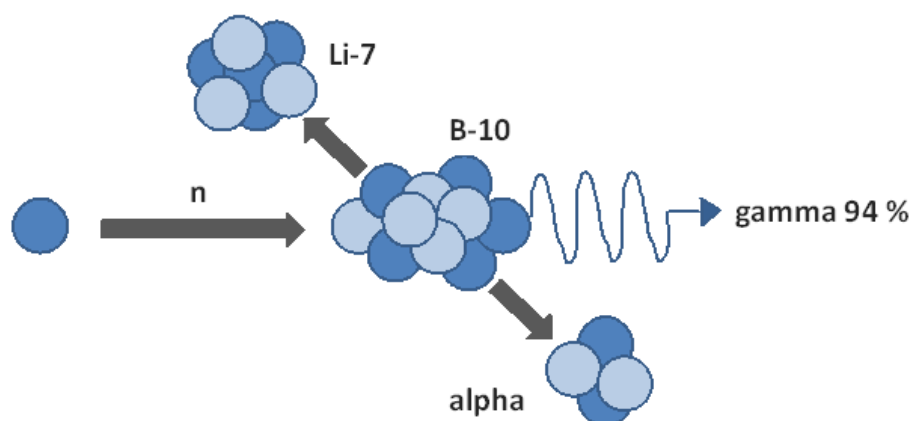


Рисунок 3. Процессы, происходящие при БНЗТ.

Если вещество, содержащее изотоп ^{10}B , ввести в злокачественную опухоль, а затем облучить пораженную область тепловыми нейтронами, то наблюдается деструкция раковых клеток. Радиус действия такой радиации около 10 мкм от места захвата. Это расстояние сопоставимо с диаметром клетки. Таким образом, если обеспечить более высокую концентрацию ^{10}B в раковой клетке по сравнению с неопухолевыми тканями, то БНЗТ позволит осуществить избирательное поражение раковой опухоли [23].

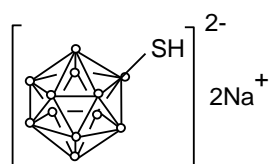
Для решения задачи избирательного разрушения злокачественной опухоли при БНЗТ необходимы три условия. Во-первых, во всей опухоли должна быть высокая концентрация атомов бора, для чего соединения бора следует, как правило, вводить внутривенно. Во-вторых, ядерный реактор должен излучать нейтроны с определенной энергией. И, в-третьих, должен быть достигнут градиент распределения атомов бора между неоплазией и нормальной тканью для уничтожения раковых клеток при минимальном повреждении окружающих тканей.

Большой интерес в качестве эффективных препаратов для БНЗТ представляют полиэдрические соединения бора – производные класса карборанов [24].

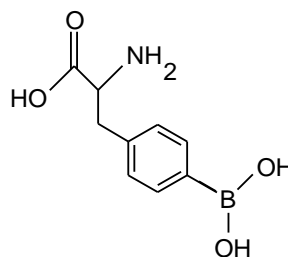
В результате многочисленных исследований установлено, что карбораны являются устойчивыми соединениями и вступают во многие реакции, что позволяет синтезировать практически все возможные органические и элементоорганические соединения, содержащие в качестве заместителя карборановую группу. Карборановые производные отличаются высоким содержанием бора в молекуле, что значительно уменьшает количество вводимого в организм вещества, и к тому же эти соединения практически нетоксичны [25]. Для икосаэдрических карборанов $C_2B_{10}H_{12}$ хорошо известны методы введения в различные органические/биохимические субстраты [24, 25].

Расчеты показали, что эффективность борированных соединений будет, по крайней мере, в два раза больше, если реакция нейтрона с изотопом ^{10}B происходит в ядре клетки, а не в цитоплазме [26]. С этой целью требуется синтез гидрофильных соединений бора с максимальным сродством к ядру в клетке опухоли.

Используемые в настоящее время в клинике при БНЗТ опухолей мозга и меланомы кожи препараты $B_{12}H_{11}SH^{2-}$ (BSH) и *n*-борфенилаланин (BPA) (рисунок 4) не являются оптимальными для БНЗТ. Они обеспечивают более или менее достаточную концентрацию бора в опухоли, но не всегда создается необходимый градиент концентраций бора между опухолью и прилежащими тканями.



BSH-динатриевая соль дианиона
ундекагидромеркапто-клозо-
-додекабората



BPA-*n*-борфенилаланин

Рисунок 4. Препараты для БНЗТ.

Актуален вопрос о создании препаратов, специфически доставляющих ^{10}B в опухолевые клетки. В настоящее время считается, что для успешного проведения БНЗТ предпочтителен как можно более высокий градиент концентраций ^{10}B между опухолью и нормальными тканями. В качестве средств доставки бора используется широкий спектр соединений, способных накапливаться в опухолях [27]. Эффективным средством доставки карборанов могут быть липосомы [28]. Особый интерес представляют тетрапиррольные соединения.

Таким образом, борсодержащий препарат должен преимущественно накапливаться в опухолевых клетках и хорошо выводиться из крови, сосудов и прилежащих нормальных тканей. Он должен обладать минимальной токсичностью. Желательно, чтобы препарат преимущественно включался в ядро клетки [2, 29, 30].

В последнее время проявляется интерес к созданию препаратов двойного терапевтического действия, которые могут быть использованы в бинарных противоопухолевых стратегиях – БНЗТ и ФДТ.

1.2 ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Идеальный ФС должен обладать следующими свойствами:

1. Селективность. Так как основной целью лечения является селективное повреждение опухолевой ткани при сохранении смежной нормальной ткани нетронутой, необходимым требованием является селективное удерживание ФС в опухоли.
2. Поглощение в красной/ИК области. ФС должен поглощать свет исключительно в красной или ИК области спектра, $\lambda = 600 - 1000$ нм. В этой области свет не поглощается тканями, что способствует его глубокому проникновению в опухоль. ФС не должен поглощать где-либо еще в видимой

или УФ области, в противном случае тело пациента становится сенсibilизированным по отношению к солнечному свету. 3. Способность к образованию цитотоксических продуктов под действием света. 4. Отсутствие темновой токсичности. 5. Флуоресценция. Если ФС обладает флуоресценцией, это дает возможность мониторинга его накопления в опухоли. 6. Точный химический состав. 7. Растворимость в воде (желательно) [1].

ФС первого поколения. Фотодинамические свойства *in vivo* таких тетрапиррольных пигментов как порфирины известны еще с начала 1900-х, когда Мейер-Бетц начал принимать **гематопорфирин (ГП)**, чтобы исследовать его биологическое действие. Тогда же в лечении различных злокачественных новообразований широко использовалось водорастворимое **гематопорфириновое производное (ГПП)**, выпускаемое под торговой маркой **Фотофрин II**. Клинические испытания с использованием ГПП показали, что ФДТ является эффективной противоопухолевой терапией для многих видов опухолей. Порфирины стали ФС первого поколения для ФДТ [1].

Тем не менее, порфирины обладают недостатком тех или иных вышеуказанных свойств идеального ФС. Так, например, несмотря на то, что ГПП присущи низкая темновая токсичность в терапевтических дозах и селективное удерживание в опухолевых массах, сам препарат, по существу, состоит из смеси различных порфиринов, и его состав может меняться в зависимости от способа приготовления и времени хранения. Также ГПП не достаточно интенсивно поглощает свет в красной области спектра. Более того, пациенты, принимающие препарат с ГПП, становятся сенсibilизированными к видимому свету, как следствие удерживания значительных количеств ГПП в коже и его поглощения в видимой области. Эти недостатки осложняются еще и тем, что ГПП может образовывать агрегаты в зависимости от условий, что влечет за собой изменение его

биологической активности. Тенденция к агрегации – нежелательное свойство практически всех порфиринов, т.к. агрегированные структуры не являются активными [1].

Хотя в целом порфирины – не идеальные ФС для ФДТ, существует порфириновый класс, имеющий значительные преимущества в этом отношении. Это так называемые эндогенные порфирины, продуцируемые живыми клетками в процессе синтеза гема. Первая стадия процесса – образование 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) – является лимитирующей. Далее следует длинная цепочка превращений, на предпоследнем этапе которой образуется **протопорфирин IX**, эффективный ФС для ФДТ [31]. Эксперименты *in vitro*, а также на животных показали, что введение больших количеств экзогенной АЛК приводит к перегрузке естественного механизма регуляции и временному накоплению протопорфирина IX в организме или системе. АЛК может быть введена в организм перорально, внутривенно, а также местно в случае кожных раковых заболеваний [32, 33].

Теоретически присутствие экзогенной АЛК приводит к тому, что все способные к синтезу гема клетки становятся фото-сенсibilизированными. Однако степень сенсibilизации различных тканевых структур у мышей оказалась не одинаковой, что было продемонстрировано методом флуоресцентной спектроскопии. В случае опухоли ее более высокая скорость метаболизма обуславливает предпочтительную сенсibilизацию относительно нормальной ткани. Таким образом, АЛК обладает большим потенциалом в качестве ФС, особенно учитывая тот факт, что она является натуральным компонентом и ее выведение представляется гораздо более эффективным по сравнению с ФС, вводимыми внутривенно [1].

Изомеры **5,10,15,20-тетракис(о-, м- или п-гидроксифенил) порфирина (ТГФП)** [34] имеют полосу поглощения, смещенную на 20-25 нм в длинноволновую область спектра по отношению к незамещенным

порфиринам. Однако между изомерами ТГФП существует значительная разница в фотоактивности и кожной сенсibilизации.

Эффективно локализуются в опухолях **тетрасульфобензилпорфирины (ТСФП)**. Число сульфо-групп влияет на локализацию ФС и выбор транспортного белка плазмы крови. Моно- и ди-сульфированные ФС предпочтительно связываются с липопротеинами низкой и высокой плотности, тогда как три- и тетра-сульфированные – с сывороточным альбумином [35].

ФС второго поколения. Множество новых ФС второго поколения было синтезировано на основе порфиринового макроцикла. Производные обладали более интенсивным, смещенным в длинноволновую область спектром поглощения. У самих порфиринов введение заместителей не вызывает существенных изменений спектральных характеристик [1]. Конъюгация протопорфирина IX с пептидом позволила значительно повысить накопление препарата в опухоли, тем не менее, фотодинамический эффект *in vivo* оставался соизмеримым с результатами, полученными для незамещенного соединения [36]. К наиболее перспективным можно отнести катионные имидазол-замещенные металлопорфирины, особенно комплекс с палладием [37]. Димеризация порфиринов позволила получить соединения, поглощающие в области от 650–700 до 800 нм [38, 39]. Недавно синтезирован **тетра(2,4,6-тригидроксибензил)порфирин** и его цинковый комплекс с улучшенными фотофизическими свойствами. Он показал более высокую ФДТ активность по сравнению с Фотифрином и ускоренное клеточное поглощение с преимущественным накоплением в ядре [40].

Большинство же исследований было сконцентрировано на восстановленных порфиринах с интенсивной полосой поглощения в области 650-800 нм, таких как хлорины, (изо)бактериохлорины и тертаазобензопорфирины (фталоцианины). Энергетический зазор между

высшей заполненной молекулярной орбиталью и низшей свободной уменьшается в ряду порфирин>хлорин>изобактериохлорин>бактериохлорин, в результате бактериохлорин имеет наиболее длинноволновое поглощение. В качестве перспективных ФС/РС нашли широкое применение металлокомплексы тетрапирролов [41].

В случае хлоринов, сложностью является то, что они легко окисляются обратно до порфиринов. Однако, введение дополнительного кольца, как, например, в бензопорфиринах или пурпуринах, предотвращает этот нежелательных эффект [1].

Среди хлоринов наиболее эффективным ФС оказался **5,10,15,20-тетракис(м-гидроксифенил)хлорин (ТГФХ)**. Он обладает большей селективностью и цитотоксичностью и гораздо меньшей кожной фототоксичностью по сравнению с ГПП или Фотофрином®. Для лечения используется ТГФХ в количестве 0.1 мг/кг массы тела и облучающий свет с длиной волны 652 нм; период между введением препарата и облучением составляет 96 часов [42]. В настоящее время препарат выпускается под торговым названием **Темопорфин/Foscan®**. Разработана его липосомальная форма **Foslip®**. Сравнение препаратов *in vitro* показало схожие характеристики обеих форм [43].

Также перспективным ФС семейства хлоринов является производное хлорина e₆ – **N-аспартилхлорина e₆**. Оно отвечает требованиям к ФС и обладает низкой кожной фототоксичностью [44].

Бактериохлорины – тетрапирролы с двумя противоположно направленными пирролидиновыми (т. е. восстановленными пиррольными) кольцами. Они встречаются в природе в составе фотосинтетических пигментов бактерий рода *Rhodospirillales* и *Rhizobiales*. Спектры поглощения бактериохлоринов имеют максимумы в ближней ИК области, 720-780 нм, что

делает их привлекательными для ФДТ. Сравнение бактериохлорина *a* и ГПП показало бóльшую способность первого к генерации синглетного кислорода [19]. Модификация бактериохлоринов открывает большие перспективы к использованию этих соединений в ФДТ опухолей [45-47].

Бензохлорины образуются из мета-замещенных порфиринов и состоят из бензольного кольца, присоединенного к тетрапиррольной структуре. **Хлорид Си- α -мета-N,N-диметилоктаэтилбензохлориниминия** поглощает при 755 нм и не имеет определяемого времени жизни триплетного состояния. Механизм клеточной гибели осуществляется, по всей видимости, по Типу 1. Препарат вызывает минимальную фотосенсибилизацию кожи [1].

Пурпурины являются продуктами распада хлорофилла. Они поглощают в более красной области по сравнению с порфиринами, имеют высокий квантовый выход перехода в триплетное состояние, время жизни которого составляет около 100 мкс, и эффективно производят синглетный кислород [1]. Введение металла в молекулу пурпурина позволяет получить ФС с улучшенными свойствами [48]. Как эффективные ФС для ФДТ зарекомендовали себя производные пурпуринимида и бактериопурпуринимида [49, 50].

Производные природных пигментов хлорофилла *a* и бактериохлорофилла *a* нашли свое широкое применение в качестве перспективных ФС [51]. К этой категории можно отнести феофорбид *a* – природное соединение, активный компонент *Scutellaria barbata*, продукт распада хлорофилла [52]; производные пиррофеофорбида *a* [53-56]; конъюгаты непосредственно самого хлорофилла *a* [57]. Перспективными ФС являются синтетический Pd-бактериофеофорбид (WST09) [58] и производное бактериохлорофилла *a* (WST11) [59]. WST11 в комплексе с ЧСА способно к многократному циклу переноса электрона на молекулярный кислород с

образованием частиц $O_2^{\bullet-}$ и OH^{\bullet} , которые являются важными инициаторами патофизиологических процессов в опухоли.

Среди других классов ФС второго поколения следует упомянуть фталоцианины [60, 61]. Фталоцианины проявляют интенсивную полосу поглощения в области 670 нм и практически не поглощают между 400 и 630 нм. Таким образом, они обеспечивают более глубокое проникновение света в ткани, а кожная светочувствительность остается довольно низкой. Фталоцианиновый макроцикл может присоединять различные заместители и способен координироваться практически с любым элементом периодической системы. К наиболее перспективным представителям данного класса относятся в первую очередь сульфированные фталоцианины алюминия, в особенности **ди-сульфофталоцианин алюминия**, у которого сульфо-группы расположены при соседних пиррольных фрагментах. Также к довольно перспективным ФС можно отнести и фталоцианины цинка [1].

Производные фталоцианинов, полученные при помощи варьирования центрального лиганда, обладают рядом преимуществ. Во-первых, такие соединения не могут существовать в виде изомеров в отличие от производных, несущих периферийные заместители. Смеси же изомеров могут проявлять различные свойства и являются трудно разделяемыми [62]. Во-вторых, у таких соединений меньше вероятность образования стекинговых димеров (H-димеров), т.к. лиганды препятствуют тесному взаимодействию π -систем соседних молекул [1].

Синтез борированных порфиринов и хлоринов позволяет получить вещества, обладающие свойствами, необходимыми одновременно и для ФДТ и для БНЗТ: тропность к злокачественным новообразованиям, фототоксичность и способность генерировать местную радиоактивную реакцию и цитотоксические частицы при действии тепловых нейтронов [63-65].

На сегодняшний день существует несколько официальных препаратов, созданных на основе соединений порфиринового ряда и являющихся близкими аналогами, для ФДТ опухолей. Это «Фотофрин I» и «Фотофрин II» (США), «Фотосан» (Германия), «Фотогем» (Россия) [1]. Поиск новых усовершенствованных ФС продолжается [66].

1.3 СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН

Альбумин (от лат. *Albus* – белый; в данном случае, белок яйца) является наиболее распространенным белком плазмы крови (составляет примерно 60% от общего количества белков в плазме). Он характеризуется высокой растворимостью в водной среде и низкой вязкостью в растворе, стабильностью и достаточно высокой плотностью отрицательных зарядов на поверхности молекулы. Молекула сывороточного альбумина асимметрична и при pH 5-7 представляет собой вытянутый эллипсоид вращения с большой и малой осями 140 и 40 Å, соответственно [67]. В отличие от других белков плазмы, которые имеют единственную характерную функцию, альбумин выполняет несколько физиологических функций. Он вносит основной вклад в коллоидно-осмотическое давление крови, является возможным источником аминокислот для различных тканей [68] и служит в качестве транспортного средства для различных эндогенных и экзогенных соединений [69].

Высокая растворимость этого белка, по всей вероятности, связана с присутствием на поверхности его молекулы большого количества ионизированных групп. Так, при pH крови (7.4) альбумин имеет 181 ионизированную группу, 81 из которых заряжены положительно, а 100 – отрицательно, т.е. при нейтральных pH молекула белка имеет чистый отрицательный заряд, равный 19. Так как число карбоксильных групп больше, чем число основных групп, изоэлектрическая точка сывороточного

альбумина ниже, чем рН 7.0, и составляет 4.7. Растворы альбумина постоянно содержат несколько агрегированных (~ 3 %) молекул, которые образуются в результате денатурации нативных молекул в течение выделения и хранения белка [67].

ЧСА (как и все исследованные сывороточные альбумины) состоит из одной полипептидной цепи. Он содержит 585 аминокислотных остатков и может быть подразделен на три гомологичных домена: I (1-190), II (191-382) и III (383-582). Каждый домен в свою очередь подразделен на два субдомена, А и В, включающие в себя три спирали (X, Y и Z). Трехмерная структура белка преимущественно стабилизируется 17 дисульфидными мостиками [69].

Полная последовательность аминокислот ЧСА впервые была опубликована двумя независимыми группами ученых в 1975 году [70, 71].

Существует альтернативная модель, в которой предполагается наличие четырех доменов в молекуле альбумина. В этом случае субдомены 1А и 3В формируют две малые боковые единицы (I и IV), а субдомены 1В+2А и 2В+3А составляют две большие центральные единицы (II и III) [72, 73].

Гибкость альбумина, вероятно, осуществляется посредством конформационных изменений в секциях, соединяющих домены, и в относительно длинных и полярных внутримолекулярных петельных областях. Вероятно также, что расстояние между формирующими домен спиралями может варьироваться; например, когда альбумин взаимодействует с лигандом [69].

Альбумин, в зависимости от рН среды, может существовать в нескольких изомерных формах. Изомерная форма, стабильная вблизи изоэлектрической точки (рН 5-7), называется N-формой; форма, стабильная при низких рН (3.5-4.5) – F-формой; а форма, стабильная при высоких рН (7-9) – В-формой. Ниже рН 3 молекула сильно расширяется, что приводит к

увеличению числа контактов тирозинов и некоторых гидрофобных остатков с растворителем. Эта форма называется Е-формой. Все эти рН-зависимые изменения обратимы. Еще одна форма, которая обнаруживается благодаря ее меньшей электрофоретической подвижности по сравнению с N-формой, называется А-формой. Переход к этой форме происходит при рН 9 и становится необратимым при рН около 10. Таким образом, взаимодействие сывороточного альбумина с ионами водорода приводит к тому, что этот белок в зависимости от величин рН существует в разных изомерных формах. Другими словами, молекулы альбумина способны легко подвергаться нескольким рН-зависимым конформационным изменениям. Эти конформационные изменения называются N-F (рН 3.5-4.5), N-B (рН 7-9), F-E (ниже рН 3.5) B-A (выше рН 9) переходами. При изменении рН от 4.5 до 2.0 или от 7.0 до 11.0, происходит обратимое расширение молекулы. Дело в том, что при низких рН большинство отрицательно заряженных свободных карбоксильных групп молекулы белка нейтрализуется протонами, что вызывает потерю баланса электростатических сил внутри молекулы, и, в свою очередь, избыток положительного заряда вызывает расширение молекулы. А при высоких рН молекула обладает избытком отрицательного заряда, который вызывает расширение в этой области рН. Можно предположить, что, как N-F, так и N-B переход, приводит к разделению доменов молекулы альбумина, раскрывая при этом междоменные области. Однако, при N-B переходе домены, по-видимому, раздвигаются не так далеко, как при N-F переходе. По своей природе N-F и N-B переходы являются переходами в предденатурационное состояние [67].

Наиболее общая разновидность ЧСА называется альбумином *A*. Однако встречаются и различные модификации, среди которых можно выделить альбумины «Олифант» в семьях германского происхождения и «Анн-Арбор» в семьях датского происхождения [74], а также «Мексико-1» и «Мексико-2» среди индейцев в Мексике и на юго-западе США [75].

Конформационная подвижность альбумина. Протеины в растворе – не статические структуры, а молекулы, принимающие различные конформационные состояния. Это подтверждается способностью водородных атомов в пептидных связях протеинов обмениваться с дейтерием или тритием в водном растворе [76, 77]. Е. С. Бенсон и соавт. [78] исследовали водородно-дейтериевый обмен бычьего сывороточного альбумина (БСА) при различных значениях рН (в пределах от 3 до 8.5). Они наблюдали четыре различных класса водородных атомов в протеине. В одном из классов обмен осуществлялся так быстро, что его не представлялось возможным зафиксировать техническими средствами. Далее следовали два «медленных» класса с константами скорости первого порядка, составляющими примерно $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $3 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, и один класс с очень медленно обменивающимися атомами (обмен не был осуществлен в течение 24 часов при 25° С). Число водородных атомов, не вступающих в обмен, было наибольшим при рН 5. В более поздней публикации [79] было показано, что это число постоянно в рН диапазоне от 5.0 до 6.4. Эти наблюдения указывают на то, что в этом рН интервале альбумин является наиболее компактным и стабильным. При более высоких и более низких значениях рН уменьшение числа очень медленно обменивающихся водородных атомов сопровождалось возрастанием числа очень быстро обменивающихся атомов. О. Хвидт и К. Велевик [80] проводили исследования обмена водород-дейтерий в ЧСА. Они наблюдали, что этот протеин также имеет высокую степень подвижности с наибольшим числом не вступающих в обмен водородных атомов в том же рН-диапазоне, как и у БСА.

Ж. Р. Лакович и Г. Вебер [81] доказали существование структурных колебаний в протеинах в наносекундном временном масштабе. Наиболее вероятно, что колебания влекут за собой отделение групп, связанных с энергиями не более чем в несколько ккал/моль. Скорости колебаний,

обнаруженных экспериментально, находятся в соответствии с величинами, оцененными энергетическими вычислениями [82]. И. Мунро и соавт. [83] исследовали динамику ЧСА и наблюдали, что при 8 °С аминокислотный остаток вращается вместе с целым протеином или большей его частью (время вращательной корреляции составляет 31.4 нс), тогда как при 43° С триптофановый остаток приобретает вращательную свободу и, став независимым от целого протеина, вращается очень быстро (время вращательной корреляции – 0.14 нс).

Было выявлено существование различных конформационных колебаний альбумина с временными константами, отличающимися несколькими порядками величины. Движения с большой амплитудой («дыхание»), вероятно, случаются в области поверхности протеиновой молекулы. Эти движения, по всей видимости, вовлекают части альбумина различных размеров, которые могут двигаться одновременно или поочередно. И. Уэда и Н. Го [84] предложили модель, в соответствии с которой различные части глобулярного протеина могут колебаться независимо друг от друга. Это находится в соответствии с гипотезой о некооперативности, которую выдвинули Э. С. Бенсон и Б. Е. Халавай [79] и О. Хвидт и К. Валевик [80] в случае сывороточного альбумина. Движения большой амплитуды в противоположность движениям малой амплитуды могут играть важную роль в связывании лигандов. Движения малой амплитуды могут встречаться как во внешних, так и во внутренних частях альбумина, хотя не обязательно с одними и теми же амплитудам, например, в результате работы различных механизмов затухания. Детальная природа колебаний альбумина не является широко изученной, и наблюдения движений чаще всего носят качественный характер. Например, такие вопросы, как, какие части протеина задействованы в каждом конкретном случае; пределы конформационных изменений; вид внутримолекулярных

связывающих сил, вовлеченных в различные колебания; а также контрольный механизм управления, всё еще не до конца исследованы [69].

Некоторые наблюдения свидетельствуют о стабилизации молекулы альбумина, когда лиганды обратимо связаны с ним. Например, жирные кислоты (ЖК) защищают протеин от воздействия теплоты [85-87], тогда как обезжиренный альбумин не стабилен при хранении [88]. Додецилсульфат в молярных соотношениях лиганда к протеину ниже 10 уменьшает расширение альбумина при высоких значениях рН [89] и защищает его от денатурации при нагревании [87] и воздействии мочевины [90]. Ж. А. Рейнольдс и соавт. [91] также говорят о стабилизации БСА, когда менее 10 моль додецилсульфата связаны с протеином. Кроме того, тестостерон, андростерон и некоторые другие стероиды, Ca^{2+} и малые количества этанола способны ингибировать гидролиз ЧСА и БСА трипсином [92]. Г. Маркус [93] и Г. Маркус и соавт. [94] наблюдали, что связывание L-триптофана, метилового оранжевого, кристаллического фиолетового и некоторых других красителей с сывороточным альбумином уменьшает скорость расщепления протеина различными энзимами. Пентахлорфенол, 2,4-динитрофенол, 2,4,6-тринитрофенол, дикумарин и другие лиганды приводят к уменьшению протеолиза БСА трипсином и проназой [95]. Следует отметить, что в большинстве случаев стабилизирующий эффект наблюдается только когда с молекулой альбумина связано не более двух молекул лиганда. Этот эффект достигается при связывании лигандов с различными областями белка, и протеин является защищенным от денатурирующих агентов различной природы.

Г. Маркус и соавт. [94] более подробно исследовали расщепление ЧСА трипсином и химотрипсином в присутствии и в отсутствие различных лигандов. Связывание отрицательно заряженных азокрасителей не только уменьшало скорость ферментативного расщепления, но также приводило к образованию фрагментов альбумина, которые отличались от фрагментов,

полученных при расщеплении несвязанного белка. Состав смеси фрагментов альбумина также мог варьироваться в зависимости от того или иного лиганда. Т. П. Кинг [96] наблюдал, что при расщеплении БСА пепсином, добавление октаноата приводит к образованию главным образом больших фрагментов. Протеолиз же в отсутствие октаноата дает комплексную смесь малых фрагментов. Однако связывание лигандов не всегда сопровождается меньшей протеолитической атакой. Так, например, связывание альбумина с положительно заряженными трифенилметановыми красителями вызывает увеличение скорости его расщепления трипсином и приводит к образованию другого набора фрагментов этого белка [94]. М. Т. Райан [92] обнаружил, что связывание прогестерона и его производных, кортизола и холестана, также увеличивает скорость расщепления энзимами БСА. Связывание прогестерона и кортизола увеличивает и протеолиз ЧСА.

Взаимодействие с анионными лигандами приводит к более компактной структуре молекулы альбумина и/или к ограничению степеней свободы некоторых групп белка, особенно тех, которые расположены вблизи сайтов связывания. Например, связывание нескольких молей додецилсульфата с БСА (не > 10) приводит к уменьшению объема протеина [97]. Кроме того, связывание алифатических лигандов может приводить к увеличению числа необмениваемых водородных атомов [79, 80]. Это «сжатие» молекулы альбумина, вероятно, и является причиной меньшей тенденции к протеолитической атаке. Связывание же катионных лигандов, очевидно, приводит к «разрыхлению» структуры альбумина. Увеличение общего объема альбумина наблюдается при его взаимодействии с различными ионами металлов [98, 99], а связывание с десятью ионами меди приводит к заметному возрастанию числа легко обмениваемых водородных атомов [100]. Так, возросшая скорость расщепления энзимами (при связывании, например, положительно заряженных трифенилметановых красителей [94]) могла бы быть результатом «разрыхления» структуры альбумина,

вызванного связыванием. Однако оказывается, что вызванное связыванием отрицательно заряженных лигандов общее «сжатие» альбумина сопровождается одновременным «разрыхлением» некоторых других его частей. Напротив, связывание положительно заряженных соединений приводит к уменьшенной подвижности меченых частей молекулы альбумина. Изменения подвижности могут быть обусловлены некоторыми вызываемыми лигандами конформационными изменениями, результатом которых является не только снижение/увеличение скоростей расщепления энзимами, но также и различающийся состав фрагментов белка.

Можно предложить следующие теории влияния связывания лигандов на конформацию альбумина: 1. Альбумин в растворе является не системой идентичных молекул, а набором изомерных протеинов примерно равной энергии в термодинамическом равновесии друг с другом [101, 102]. Добавление лиганда к раствору альбумина сопровождается предпочтительным взаимодействием между лигандом и изомерной формой альбумина, приводя к наиболее стабильному комплексу (конформации лиганд-изомер с наибольшей константой связывания). 2. Колебание альбумина такое явное, что молекула лиганда способна модифицировать конфигурацию области связывания в процессе связывания таким образом, что достигается большее соответствие между лигандом и данной областью (сайтом связывания), т.е. альбумин «приспосабливается» к лиганду [69].

П. А. Адамс и М. К. Берман [103] проводили детальное кинетическое исследование взаимодействия гемина с ЧСА в системе диметилсульфоксид:вода 3:5 (по объему). Авторы предположили, что комплекс гемин-альбумин образован в ходе двухступенчатого процесса. Первый шаг – химически контролируемый процесс, включающий в себя взаимодействие гемина с группой на поверхности протеина (предположительно, остаток гистидина) со значением pK 5.9. За

образованием промежуточного комплекса лиганд-протеин следует включение молекулы гемина в сайт связывания белка, определяемое энтропией.

Хотя результаты исследований дают возможность предполагать, что альбумин «приспосабливается» к лиганду в процессе связывания, такая гибкость не является неограниченной. Было установлено, что даже относительно простые заместители могут вызывать значительные изменения во взаимодействии лиганд-протеин. Также некоторые заместители в одних положениях увеличивают связывающее сродство, тогда как, будучи помещенными в другие положения, уменьшают связывание. Таким образом, связывание лиганда с альбумином является стереоспецифическим, и специфичность связывания/константа связывания могут во многом определяться присутствием определенной химической группы [69].

1.4 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С АЛЬБУМИНОМ И ЛИПОПРОТЕИНАМИ

Селективная доставка ФС в опухоль является первым этапом ФДТ/БНЗТ. При попадании ФС в кровь происходит его обратимое связывание с протеинами плазмы. Это обуславливает распределение в тканях и фармакокинетическое поведение ФС *in vivo*. И хотя в плазме содержится около сотни различных белков, лишь немногие из них (не более 13) ответственны за перенос и распределение препарата-сенсibilизатора. Необходимым условием хорошей работы белка является его достаточно высокая концентрация (> 1 г/л) и способность связывать транспортируемый препарат [104]. Однако здесь следует оговориться, что «слишком» высокое значение константы связывания может препятствовать проникновению препарата из плазмы в ткань, а также его последующему выведению из

организма. Относительное распределение ФС между компонентами плазмы является важным детерминантом их эффективности. А смещение равновесия препарат-белок способно изменять долю доступного тканям препарата и потенциально влиять на его фармакологическую эффективность [105].

К основным белкам-переносчикам можно отнести ЧСА (35-40 мг/мл), липопротеины высокой (0.35-0.85 мг/мл), низкой (0.66-1.4 мг/мл) и очень низкой (0.2-0.4 мг/мл) плотности и кислый альфа-1-гликопротеин [104]. Для эффективной доставки ФС в опухоль требуется, как минимум, один из них [106-108]. Способность же ФС связываться с теми или иными из указанных транспортных белков во многом определяется гидрофильно-гидрофобными свойствами ФС [109, 110]. Было установлено, что с уменьшением полярности ФС возрастает его связывание с ЛНП, а с ЧСА, напротив, уменьшается [35, 111-113]; причем на связывание также способно влиять положение заряда в молекуле ФС [111]. Т.е., относительно гидрофильные препараты связываются преимущественно с сывороточным альбумином, который не всегда является только инертным переносчиком, но также может определять свойства ФС. Так, например, связывание с альбумином приводит к повышенной растворимости в плазме длинноцепочечных жирных кислот (ДЖК) и билирубина и к уменьшению токсичности последнего [69]. Связывание с альбумином увеличивает фототоксичность ФС отношению к опухолевым клеткам HepG2 и J774 [114]. Липопротеины, напротив, служат макромолекулярным транспортом для относительно гидрофобных соединений [105, 115]. Они весьма привлекательны в качестве белков-переносчиков, т.к. высокая экспрессия липопротеиновых рецепторов в опухоли позволяет обеспечить более полный захват и удерживание ФС относительно нормальной ткани [116-118].

Чтобы объяснить селективный захват ФС на основе тетрапирролов неопластическими тканями, был выдвинут ряд гипотез. Во-первых, различные исследования показали, что рН внутритканевой жидкости в

опухолях ниже, чем в нормальных тканях [119-121]. Ацидификация обусловлена выделением молочной кислоты опухолевыми клетками, для которых характерна высокая скорость анаэробного метаболизма глюкозы [119, 122]. Хотя величина рН зависит от размера и гистологии опухоли, среднее значение составляет порядка 7.0. Тогда как рН для подкожных нормальных тканей характеризуется средним значением 7.5 [120]. В серии из 14 опухолей человека различной гистологии было найдено среднее значение величины рН порядка 6.81. Существует довольно значительное варьирование рН и внутри опухоли, когда эта величина может достигать до отметки 5.55 [121]. Градиент рН является важным определяющим фактором селективного захвата опухолями карбоксилсодержащих ФС [123-126].

Другим важным фактором включения ФС в опухолевую клетку является его связывание с ЛНП. Повышенные требования холестерина пролиферирующими тканями приводят к гиперэкспрессии рецепторов ЛНП на поверхности клетки [127, 128]. Включение в клетку связанного с липопротеинами ФС – один из основных механизмов предпочтительной аккумуляции ФС опухолями. Напротив, опухолевые клетки, проявляющие низкую активность ЛНП-рецепторов, являются устойчивыми к ФДТ. Тем не менее, однозначная корреляция между взаимодействием ФС с ЛНП и его селективной аккумуляцией в опухоли все еще находится под вопросом. Отсутствие такой корреляции в некоторых случаях свидетельствует о том, что существуют альтернативные механизмы проникновения ФС в опухоль [129]. Липидные структуры ЛНП также могут служить субстратом для фотоиндуцированной реакции перекисного окисления и, таким образом, увеличивать общую биологическую эффективность ФС [130]. Следовательно, сродство ФС к ЛНП, а также число молекул ФС, приходящихся на одну частицу ЛНП, и их распределение между различными отделами ЛНП – важные параметры.

Кроме того, биологическая доступность ФС управляется конкурентным связыванием с альбумином [131]. Следует отметить, что проницаемость неососудов позволяет связанным ФС просачиваться в опухолевую строму, что могло бы также вести к некоторому селективному удерживанию [132].

Сывороточный альбумин подробно описан в предыдущей части.

Липопротеины – пластичные частицы сферической формы с диаметром 3.5×10^{-9} – 6.0×10^{-6} м. Ядро липопротеина состоит из неполярных частиц, главным образом в форме триацилглицерида и этерифицированного холестерина, внешняя поверхность – из фосфолипидного монослоя (с облегчающими солюбилизацию полярными головками), усеянного амфифильными молекулами, такими как неэтерифицированный холестерин и особые протеины, называемые апопротеинами (рисунок 5). Апопротеины, заключенные в фосфолипидный монослой, определяют структурные и функциональные свойства молекулы (например, обеспечивают ее узнаваемость клеточными рецепторами). Одна из классификаций липопротеинов основывается на плотности частиц и включает липопротеины высокой плотности (ЛВП, $1.063 < \rho < 1.21$ г/мл), липопротеины низкой плотности (ЛНП, $1.006 < \rho < 1.063$ г/мл), липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП, $0.94 < \rho < 1.006$ г/мл) и самые крупные частицы, хиломикроны ($\rho < 0.94$ г/мл). Липопротеины проявляют ряд физико-химических свойств, близких к микроэмульсиям (ЛВП и ЛНП) и макроэмульсиям (ЛОНП и хиломикроны). ЛНП – частицы диаметром 180-250 Å, состоящие главным образом из холестерина и его эфиров и содержащие одну молекулу ApoB100. Они отвечают за 70-80% циркулирующего холестерина человека и служат для его доставки к периферийным тканям [105].

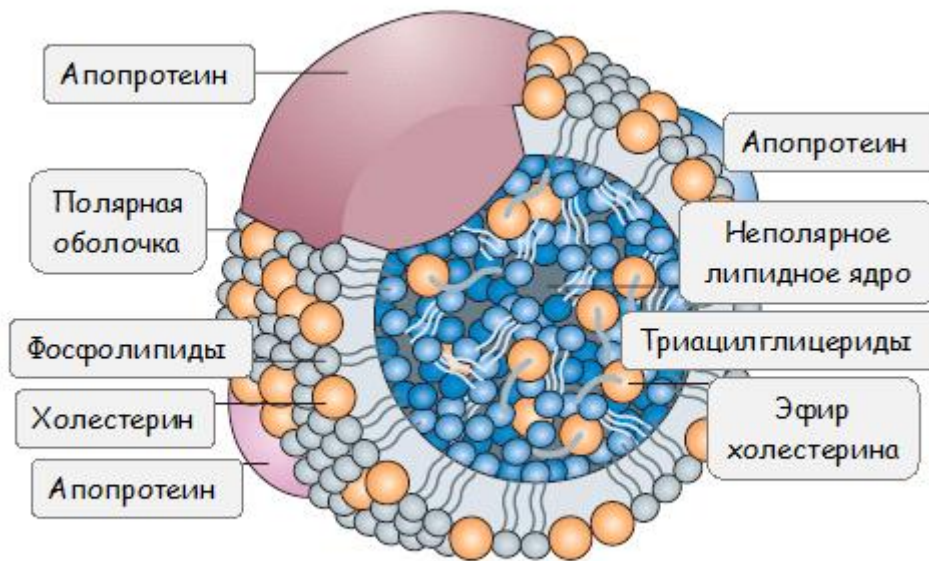


Рисунок 5. Структура липопротеина [105].

Характер взаимодействия препарата с липопротеинами отличается от связывания с альбумином или кислым альфа-1-гликопротеином, что, вероятно, обусловлено уникальной природой липопротеинов. Связывание может осуществляться как внутри неполярного ядра, так и во внешней, более полярной его части. Предпочтение препарата связываться с той или иной областью липопротеина, по всей видимости, определяется его коэффициентом распределения в системе октанол-вода. Можно было бы предположить, что препарат способен связываться со специфическими сайтами на апопротеине (по аналогии с альбумином), однако таких специфических сайтов до сих пор не выявлено. В различных физиологических и патологических состояниях состав циркулирующих липопротеинов меняется, что может приводить и к изменениям степени связывания препарат-липопротеин [105].

Сайты связывания альбумина. Характерной особенностью взаимодействия альбумин-лиганд является наличие одного или двух сайтов

связывания высокого сродства и ряда сайтов с более низким сродством. Более того, при высоких пропорциях лиганда к альбумину, несколько дополнительных молекул лиганда могут связываться с низким сродством и в неспецифической манере. Следует отметить, что связывание лигандов в неспецифической манере с низким сродством с областями на поверхности белка является общим свойством многих протеинов [69].

Среди эндогенных лигандов, обладающих высоким сродством к альбумину, выделяют гемин, билирубин и ДЖК. Константа связывания для гемина составляет $5.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (рН 7.5, 23 °С, обезжиренный альбумин) [133] и $1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (рН 7.0, 24 °С, необезжиренный альбумин) [103]. Константы связывания большого числа отрицательно заряженных и электростатически нейтральных лигандов составляют $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$. Несмотря на то, что альбумин несет отрицательный заряд при физиологическом рН, он склонен связывать отрицательно заряженные лиганды (например, варфарин) в предпочтении к лигандам, несущим положительный заряд [68, 134]. Альбумин также способен связывать и некоторые положительно заряженные препараты (например, лидокаин) с константой связывания, сопоставимой с этой же величиной для наиболее отрицательно заряженных соединений. Кроме того, альбумин способен связывать различные неорганические лиганды, например Cl^- , Zn^{2+} , Ni^{2+} и др. [69].

Способность альбумина нековалентно связываться с большим числом лигандов обусловлена существованием, по крайней мере, шести сайтов связывания высокого сродства, которые представлены в таблице 1 и на рисунке 6 [69].

Сайты связывания I, IV и V являются очень специфичными. С сайтом I с высоким сродством связываются только ДЖК. Сайты IV и V хорошо подходят для связывания металлических ионов и гемина, соответственно.

Таблица 1. Сайты связывания в альбумине

Сайт	Лиганд	
I	ДЖК	
II	L-тироксин D- и L-триптофан кларазепат	октаноат p-иод-бензоат хлорид-ион
III	билирубин некоторые красители, например, фенолсульфопфталеиновый иопаноат	
IV	Cu^{2+} Ni^{2+}	
V	гемин	
VI	салицилат сульфаэтидол сульфатазол	хлорпропамид толбутамид индометацин

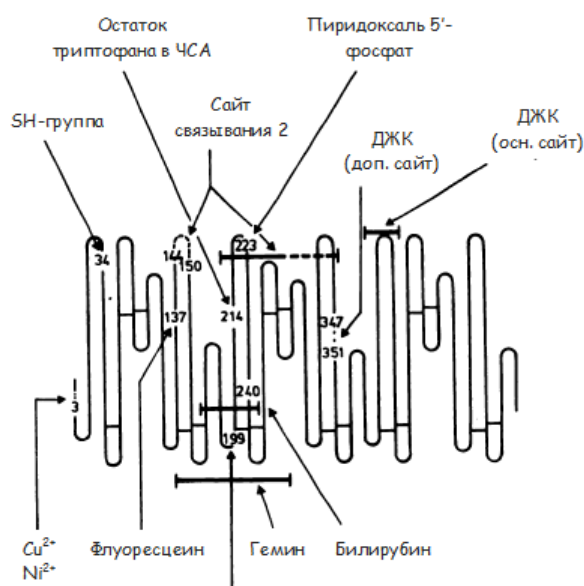


Рисунок 6. Сайты связывания в молекуле альбумина [69].

алифатических и неорганических лигандов. Кроме того, он, по всей вероятности, функционирует и как вторичный сайт связывания ДЖК. Таким образом, уникальная способность альбумина связывать с высоким сродством лиганды основывается на существовании нескольких областей связывания, обладающих различными степенями специфичности [69].

Большинство сайтов связывания лигандов, по-видимому, размещено в части альбуминовой молекулы, именуемой субдоменами 1В и 2А [69].

Тогда как сайты связывания III и VI вовлечены во взаимодействие с ароматическими лигандами различной природы. Другие типы лигандов (алифатические или неорганические) взаимодействуют с этими областями с низким сродством. Очевидно, наименее специфичным является сайт связывания II, который приспособлен для различных ароматических, короткоцепочечных

3. Хркал и соавт. [135] исследовали взаимодействие между гемом (сайт связывания 5) и тремя различными фрагментами ЧСА. Хотя все пептиды (1-123, 124-298 и 299-585) были способны связывать гемин с относительно высоким сродством, величина константы связывания и кинетические исследования говорили о том, что основной сайт связывания расположен в последовательности 124-298. Авторы предположили, что присутствие С-терминальной части альбумина является существенным для пространственной конфигурации сайта связывания гемина.

Взаимодействие ЧСА и ЛНП с тетрапиррольными ФС. В ЧСА для порфириновых мономеров был идентифицирован сайт связывания высокого сродства [136, 137]. В ряду дикарбоксильных порфиринов от менее гидрофобного гематопорфирина к более гидрофобному протопорфиру константы связывания варьировали между 1×10^6 и $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [112]. Было обнаружено, что сродство гематопорфирина немного выше в рН диапазоне 6.8 – 7.5 ($3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) чем при рН 8 ($1.27 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) [138].

Можно предположить, что сайт связывания дикарбоксильных порфиринов идентичен сайту связывания гема (или гемина – продукта окисления гема) [129], который располагается в субдомене IV [139].

Константа связывания гемина с ЧСА в системе ДМСО:вода 3:5 (по объему) составляет 10^8 M^{-1} [103].

Кристаллическая структура комплекса ЧСА:гемин:миристант (1:1:4) содержит молекулу гемина, связанную в гидрофобном D-образном кармане субдомена IV и молекулы миристана, связанные в шести сайтах связывания белка, что соответствует сайтам связывания ЖК 2-7. Сайт связывания ЖК 1 занят гемом при данных экспериментальных условиях и препятствует связыванию ЖК из-за возникающих стерических препятствий (рисунок 7).

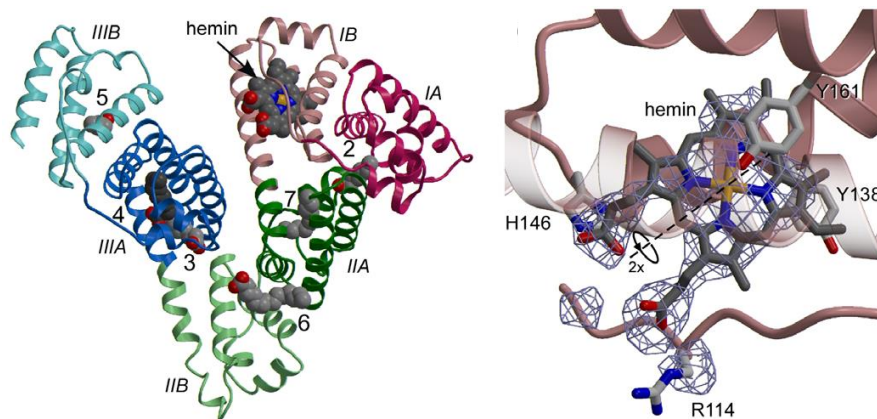


Рисунок 7. Кристаллическая структура комплекса ЧСА:гемин:миристат. Гемин: углерод – серый, азот – синий, кислород – красный и железо – оранжевый. Сайты связывания ЖК отмечены цифрами 2-7 [137].

Гидрофобное порфириновое кольцо спрятано в ядре субдомена, а пропионовокислые группы расположены у широкого входа в карман, где они могут взаимодействовать с растворителем и некоторыми основными аминокислотными боковыми цепями. В отсутствие лиганда карман частично закрыт двумя остатками тирозина (138 и 161), которые складываются друг на друге [140]. При связывании с гемом обе боковые цепи поворачиваются на 90° , таким образом, открывая карман и помогая зафиксировать лиганд в области связывания. Очень похожее вращение этих боковых цепей наблюдалось и при связывании ЖК [141]. Другие боковые цепи, включая лейцин-139, гистидин-146, изолейцин-142 и лейцин-154, претерпевают некоторые изменения. В целом же наблюдается небольшое расширение субдомена IV. Подобное расширение было отмечено и при связывании ЖК с данным сайтом связывания белка [142]. Расширение может быть ограничено дисульфидными мостиками между цистеином-124 и цистеином-169.

Все структурные компоненты субдомена IV вносят вклад в сайт связывания гемина. Аминокислотные остатки, выстилающие внутреннюю поверхность кармана, являются гидрофобными, за исключением тирозина-138 и тирозина-161. Гидроксильная группа тирозина-138 расположена во внешней области домена, где она взаимодействует с растворителем, тогда как

гидроксильная группа тирозина-161 напрямую взаимодействует с центральным атомом Fe^{3+} . Вход в карман обращен к междоменному разъему и содержит три основных остатка, которые координируют две пропионовокислые группы гемина. Лизин-190 занимает центральную позицию и образует солевые мостики с обеими пропионовокислыми группами (2.7 и 3.0 Å); Гистидин-146 обеспечивает электростатическое взаимодействие с одним карбоксилатом (3.0 Å), тогда как группа гуанидиния в аргинине-114 взаимодействует с другим (2.8 Å). Аргинин-117, расположенный у входа в карман, не участвует в координировании пропионовокислых групп гемина. Таким образом, гемин располагается в гидрофобном кармане, и его пропионовокислые группы взаимодействуют с триадой основных остатков – лизином, аргинином и гистидином – у входа в карман. Электростатические взаимодействия пропионовокислых групп несомненно важны для связывания гемина [137].

ФС второго поколения хлорин еб может связываться с ЧСА сходным образом, причем три его карбоксильные группы обеспечивают даже лучшую стабилизацию посредством солевых мостиков с остатками оснований [129].

В работе Х. Мойжишовой и соавт. [129] было исследовано взаимодействие хлорина еб с ЧСА и ЛНП в условиях различных рН. Т.к. высокий рН может влиять на целостность ЛНП, исследования сродства хлорина еб к ЛНП проводились только при рН 6.5 и 7.4, тогда как связывание с ЧСА было исследовано также и при рН 8.0. Было обнаружено, что сродство хлорина еб к ЧСА уменьшается при понижении рН от 8 до 6.5 (таблица 2). Этот эффект может быть обусловлен некоторой нейтрализацией карбоксильных групп, что уменьшает стабилизацию солевых мостиков. Кроме того, альбумин подвергается конформационным изменениям в этом рН диапазоне, что также может изменять сродство к хлорину.

Таблица 2. K_C хлорина еб [129], хлорина рб [104] и пурпурина 18 [104] с ЧСА и ЛНП; а) по Скетчарду, б) по кривым связывания

Белок	ФС	pH	K_C, M^{-1}
ЧСА	хлорин еб	8.0	3.2×10^8
		7.4	1.8×10^8
		6.5	0.8×10^8
ЛНП		7.4	а) 5.7×10^7
		7.4	б) 6.9×10^7
		6.5	б) 12.2×10^7
ЧСА	хлорин рб	7.4	7.6×10^4
		5.0	1.9×10^5
	пурпурин 18	7.4	3.4×10^5
ЛНП	хлорин рб	7.4	5.9×10^5
		5.0	8.2×10^5
	пурпурин 18	7.4	2.3×10^6

С ЛНП хлорин еб связывается с высоким сродством преимущественно в области компонента Аро-100 в пропорции примерно 10:1, и также наблюдается некоторое взаимодействие с липидной частью белка. Последний процесс представляет собой солюбилизацию в липидный отдел и может быть охарактеризован большим числом «сайтов» с относительной невысокой константой связывания. Таким образом, общая константа связывания хлорина еб с ЛНП (таблица 2) управляется главным образом фиксацией на протеиновом фрагменте, а солюбилизация в липидный отдел является второстепенным процессом. Фиксация на протеиновом фрагменте по всей вероятности происходит на границе между апопротеином В100 и липидной фазой ЛНП. При уменьшении pH от 7.4 до 6.5 наблюдалось примерно двукратное увеличение общей константы связывания, что обусловлено понижением суммарного заряда боковых цепей макроцикла.

Полученный результат ясно демонстрирует обратную зависимость сродства хлорина еб к ЧСА и ЛНП от pH, а широкий диапазон значений pH позволяет проиллюстрировать *in vitro* возможность pH-зависимого перераспределения хлорина еб в опухолевой строме. Хотя альбумин и

является основным переносчиком хлорина еб, некоторое падение стабильности комплекса Себ:ЧСА и сопутствующее усиление связывания с ЛНП (и мембранами) при небольшом уменьшении рН могут благоприятствовать предпочтительному захвату таких ФС опухолями.

Было исследовано связывание двух структурно родственных соединений – хлорина рб и пурпурина-18 – с ЧСА [143] и с ЧСА и ЛНП [104]. У хлорина рб имеются три карбоксильные группы, следствием чего является зависимость его гидрофобности от кислотности среды. Это проявляется в различной агрегации хлорина в кислотном диапазоне 7–3. При рН 5.0 на его спектрах поглощения наблюдается два максимума в области Q-полосы: 640 нм, отвечающий мономерной форме соединения, и 675 нм, что соответствует поглощению агрегированных структур хлорина рб.

Ангидридное кольцо пурпурина-18 на месте двух карбоксильных групп хлорина рб придает гидрофобные свойства молекуле пурпурина и позволяет предполагать отсутствие такой зависимости. На спектрах поглощения пурпурина в водном буферном растворе (рН 7.4) наблюдается уширение как полосы Core, так и Q-полосы, обусловленное его агрегацией.

Таким образом, хлорин рб исследовался при различных значениях рН: 7.4, физиологическом, и 5.0, характерном для опухоли, тогда как для пурпурина-18 было выбрано только одно значение рН 7.4. Изменение рН от 7.4 до 5.0 не должно влиять на ионизационное состояние пурпурина-18, а, следовательно, и на его гидрофобность.

Добавление ЧСА к водным буферным растворам хлорина рб приводило к трансформации его спектров поглощения (рисунок 8, а, б). При рН 7.4 увеличение концентрации ЧСА приводило к батохромному сдвигу полосы Core (от 398 к 406 нм) и Q-полосы (от 658 к 666 нм). Две изобестические точки (402 и 660 нм) указывали на образование устойчивых комплексов

между мономерной формой хлорина р6 и альбумином. При рН 5.0 добавление ЧСА вызывало двукратное увеличение полосы Core без ее смещения, а на месте максимума при 640 нм выступала новая полоса при 670 нм. Отсутствие изобестической точки свидетельствовало о более сложном характере равновесия с возможным вовлечением агрегированных структур.

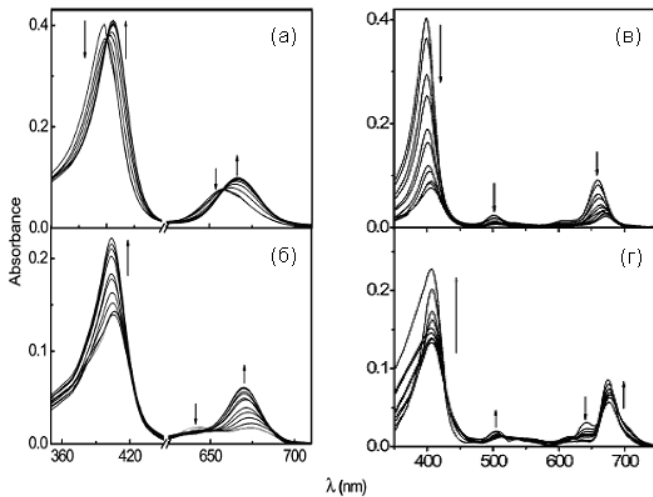


Рисунок 8. Спектры поглощения хлорина р6 (7 мкМ) при добавлении ЧСА (а, б) и ЛНП (в, г), рН 7.4 (а, в) и 5.0 (б, г). Стрелками показаны изменения спектров при увеличении концентрации белка [104].

Также под воздействием ЧСА наблюдались изменения и в спектрах флуоресценции хлорина р6. Однако при очень высоких концентрациях белка спектры флуоресценции при рН 5.0 оказывались идентичны спектрам при рН 7.4. Кислотно-основное равновесие хлорина р6 изменяется в присутствии ЧСА. Так, при связывании с ЧСА в условиях кислого рН хлорин р6 отдает протон и переходит в анионную форму в комплексе с белком. Это предположение подтверждают исследования времени жизни флуоресценции хлорина р6. Тогда как время жизни увеличивалось при обоих значениях рН, его зависимость от длины волны испускания наблюдалась только при рН 5.0 (таблица 3). Время жизни флуоресценции хлорина р6 в присутствии ЧСА (15 μM), рН 7.4, как при 640, так и при 680 нм составило 4 нс. Однако это значение составило 2.8 нс при 640 нм и 3.9 нс при 680 в условиях рН 5.0. Это объясняется тем фактом, что флуорофор, излучающий в красной области спектра, представляет собой главным образом анионную форму хлорина р6 связанную с ЧСА. Тогда как в синей области спектра присутствует несвязанная, протонированная форма хлорина р6.

Таблица 3. Время жизни флуоресценции хлорина рб

ЧСА, μM	τ , нс (при рН 7.4)		τ , нс (при рН 5.0)	
	$\lambda_{\text{исп}} = 640$ нм	$\lambda_{\text{исп}} = 680$ нм	$\lambda_{\text{исп}} = 640$ нм	$\lambda_{\text{исп}} = 680$ нм
0	3.4	3.4	2.1	2.9
2	3.3	3.5	2.5	3.3
5	3.6	3.8	2.7	3.7
15	4.0	4.0	2.8	3.9

Резонансное светорассеяние показало, что добавление ЧСА к хлорину рб практически не влияло на его агрегацию при рН 7.4. Однако при рН 5.0 наблюдалось усиление стабильности агрегатов хлорина вплоть до концентрации ЧСА, равной 3 μM . Дальнейшее увеличение концентрации белка сопровождалось дезагрегацией хромофора и при концентрации ЧСА > 6 μM спектры хлорина рб возвращались к своему исходному значению. Однако при еще более высоких концентрациях ЧСА полное разрушение агрегированных структур не наблюдалось.

Добавление ЧСА к пурпурину-18 приводило к постепенному разрушению его агрегированных структур, но даже при высоких концентрациях белка наблюдалось присутствие агрегированной и мономерной формы соединения.

Авторы работы полагают, что комплекс порфирина/хлорина с сывороточным альбумином стабилизирован электростатическими взаимодействиями между отрицательно заряженными заместителями на периферии молекулы ФС и положительно заряженными аммонийными остатками сывороточного альбумина.

С повышением концентрации ЛНП при рН 7.4 полоса Core хлорина рб претерпевала шестикратное уменьшение поглощения с постепенным смещением в длинноволновую область на 10 нм. Пятикратное уменьшение со смещение в длинноволновую область на 14 нм наблюдалось для Q-полосы,

что аналогично спектральным изменениям при низких концентрациях ЧСА. Однако высокие концентрации ЛНП не приводили к последующему увеличению поглощения хлорина р6 (рисунок 8, в). Спектры флуоресценции подвергались начальному уменьшению интенсивности (вплоть до концентрации ЛНП 0.04 мг/мл), сопровождаемому длинноволновым сдвигом на 12 нм. В ходе дальнейшего увеличения концентрации ЛНП интенсивность флуоресценции возрастала вплоть до насыщения при 0.18 мг/мл ЛНП. Схожая тенденция наблюдалась для изменения квантового выхода флуоресценции φ_f .

При рН 5.0 полоса Соре хлорина р6 уменьшалась до концентрации ЛНП 0.06 мг/мл. После этого она возрастала, но не достигала начального значения (рисунок 8, г). Это схоже с результатами, полученными для ЧСА. Пик при 640 нм исчезал, а пик при 674 нм возрастал при добавлении ЛНП. В спектрах флуоресценции наблюдалась схожая тенденция за исключением нового пика при концентрации ЛНП 0.02 мг/мл, который развивался при 681 нм и при дальнейшем увеличении концентрации ЛНП смещался на 4 нм в коротковолновую область. Квантовый выход флуоресценции изначально уменьшался до концентрации ЛНП 0.02 мг/мл и постепенно увеличивался почти в 1.5 раза от начального значения, что всё еще оставалось гораздо меньшим по сравнению с хлорином р6 в воде или мицелярном окружении. Изобестических или изоэмиссионных точек не наблюдалось при этих значениях рН, указывая на вовлечение более чем одного равновесия в систему. Это утверждение подкреплялось записями различных спектров возбуждения при длине волны испускания 650 и 680 нм: два спектра различны, указывая на сосуществование более одного типа в основном состоянии. Хлорин р6 связывается с ЛНП в протонированной форме.

Спектр поглощения пурпурина-18 в фосфатном буферном растворе при рН 7.4 обнаруживает интенсивную полосу агрегатов при 758 нм. При добавлении ЛНП эта полоса уступала место пику мономера при 705 нм,

указывая на разрушение агрегатов. Две изобестические точки (725 и 442 нм), аналогичные в случае ЧСА, указывали на равновесие между агрегатами и мономерными/связанными формами пурпурина-18. Дезагрегация, отмеченная началом флуоресценции, наступала при концентрации ЛНП 0.005 мг/мл. Интенсивность флуоресценции возрастала сигмоидально с увеличением концентрации ЛНП. Аналогично случаю с ЧСА полоса агрегатов на спектрах поглощения исчезала не полностью. Вместо этого она насыщалась при концентрации ЛНП 0.32 мг/мл. Появившаяся полоса мономера насыщалась при примерно такой же концентрации ЛНП. Таким образом, было обнаружено, что не все агрегаты пурпурина-18 разрушаются в присутствии ЛНП, а сам пурпурин-18 связывается с ЛНП как в мономерной, так и в агрегированной формах. В противоположность ЧСА, наблюдалось увеличение времени жизни флуоресценции от 1.7 до 2.6 нс с увеличением концентрации ЛНП, что может быть обусловлено значительно меньшей полярностью, испытываемой флуорофором в ЛНП.

Константы связывания хлорина р6 и пурпурина-18 с ЧСА и ЛНП приведены в таблице 2. Было обнаружено, что сродство обоих ФС – хлорина р6 и пурпурина-18 к ЛНП больше, чем к ЧСА. Кроме того, связывание хлорина р6 при рН 5.0 больше, чем при рН 7.4. Результаты хорошо соотносятся с гидрофобностью соединений, так, что сродство хлоринов возрастает с возрастанием их гидрофобности. Таким образом, несмотря на то, что связывание ФС с сывороточным альбумином может препятствовать его проникновению в опухолевую клетку за счет аккумуляции в строме, более эффективное связывание хлорина р6 и пурпурина-18 с ЛНП способно стабилизировать этот нежелательный фактор. К тому же опухолевые ткани содержат множественные липопротеиновые рецепторы, что может способствовать более эффективному захвату этих ФС опухолевыми клетками [104].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление растворов. Экспериментальные растворы готовили в 0.02 М фосфатном буфере, pH 7.0, 7.4 и 5.0. Концентрации: ФС [63, 144-146] $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ М, ЧСА (Serva, USA) $1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$ М, ЛНП из плазмы крови человека (Sigma-Aldrich, USA) $8 \times 10^{-10} - 8 \times 10^{-8}$ М (для (4)–(6)) и $2.5 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$ М (для ПФФ) в расчете на белково-липидный комплекс. Испытуемые соединения добавляли в буфер из их исходных растворов в ДМСО (конечная концентрация ДСМО во всех экспериментальных растворах – 1%).

Регистрация спектров. Спектры регистрировали при комнатной температуре в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Спектры поглощения и флуоресценции были получены на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PC и спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (длина волны возбуждения – 400 нм). Времена жизни флуоресценции были получены на флуорометре Fluor Time 200 (PicoQuant) при фотовозбуждении образцов лазером 440 и 653 нм; длительность импульса – 100 псек. Измерения времен жизни флуоресценции проводили в режиме однофотонного счета в области флуоресценции ПФФ при 680 нм. Спектрально-кинетические характеристики триплетного состояния соединения (2) в этаноле исследовались с помощью установки лазерного фотолиза LKS80 (applied Phtophysics, UK). Облучение проводили лазерным импульсом длиной волны 410 нм, 100 мДж, 4.3 нс. Кинетику гибели триплетного состояния регистрировали при 450 нм в отсутствие кислорода и при различных концентрациях кислорода (в присутствии кислорода воздуха и в насыщенном кислородом растворе). Данные обрабатывались в программе Pro-Data Viewer version 4.2.5.

Константы связывания. K_C определяли из кривых связывания в программе Origin 6.1 по уравнению [1]: $\theta = \frac{K_C \times [\text{Белок}]}{1 + K_C \times [\text{Белок}]}$, где [Белок] –

концентрация ЧСА или ЛНП, а θ – доля связанных с белком испытуемых соединений, равная $(A - A_0) / (A_\infty - A_0)$. A_0 , A_∞ и A – поглощение соответственно при нулевом, полном и промежуточном связывании соединения в комплексе с белком, измеренное в максимуме Q-полосы. Величину A_∞ (и A_0 в случае связывания (3) с ЧСА и ПФФ с ЛНП) находили экстраполяцией экспериментальных значений.

Компьютерное моделирование. Полноатомная модель трехмерной структуры белка в эксперименте по связыванию ЧСА с металлопурпурином-18 была подготовлена при помощи программы Build Model [147]. Для моделирования координации пурпурина-18 с альбумином использовался метод молекулярного докинга, реализованный в программе Lead Finder [148].

Грубые пространственные модели исследуемых в данной работе молекул (4)–(6) были построены с использованием программ Molsoft ICM версии 3.6 [149] и Avogadro (Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool, version 1.0.3. avogadro.openmolecules.net), на основании записей 10381282 (пирофосфорбид) и 21171238 (*орто*-карборана $C_2H_{12}B_{10}$) базы данных ChemSpider (chemspider.com). Были проведены следующие модификации: к пирофосфорбиду добавлена карбоксильная группа в положении 13(2); карбоксильная группа в положении 13(2) и пропионовая группа в положении 17(3) модифицированы метильной группой (4), карбораном (5) и цезиевой солью карборана (6). Далее была проведена оптимизация их структуры в программе Gamess US [150]. Мультиплетность электронного состояния молекул была выбрана равной единице, зарядовое состояние – нейтральным. Оптимизация структуры проводилась по стандартному протоколу методом квадратичной аппроксимации в MINI базе Хузинаги [151]. Волновые функции самосогласованного поля рассчитывались ограниченным методом Хартри-Фока (RHF – Restricted Hartree Fock) [152]. Критерий сходимости по матрице плотности для самосогласованного поля был принят равным 0.0001 Хартри/Бор.

Моделью сывороточного альбумина человека служила пространственная структура 1N5U [136] из банка данных PDB. В данной кристаллической структуре, полученной с разрешением 1.9Å, в сайте связывания FA1 располагается молекула гема (протопорфирина IX); другие сайты заняты пятью молекулами миристиновой кислоты. Структура ЧСА была подготовлена к расчетам согласно протоколу, включающему добавление атомов водорода, оптимизацию боковых цепей аминокислот His, Pro, Cys, Gln и Asn, а также стандартную процедуру регуляризации, исключаящую незначительные ван-дер-ваальсовы пересечения атомов. Зарядовые состояния аминокислот рассчитывались при pH 7.0.

Для того чтобы определить возможные варианты связывания трех исследуемых молекул с альбумином и оценить возможность их встраивания в «глобиновый» карман белка, была проведена процедура «гибкого» докинга. Перед проведением процедуры докинга молекулы миристиновой кислоты, гема и воды были удалены из структуры белка, а каждому атому трех исследованных молекул-лигандов был присвоен заряд, рассчитанный *ab initio* по результатам оптимизации геометрии. Процедура «гибкого» докинга проводилась в пакете Molsoft ICM Pro 3.6 [149, 153, 154]. Докинг каждой из исследованных молекул запускался трижды из различных начальных положений и конформаций лигандов. Так как в процессе докинга для поиска возможных конформаций лиганда используются метод псевдо-броуновского перемещения лиганда совместно со смещено-вероятностным методом Монте-Карло [153], то трех запусков вполне достаточно для относительно полного исследования конформационного пространства лиганда в изучаемом сайте связывания. Полученный таким способом набор конформаций был объединен и отфильтрован так, чтобы в итоговом наборе не присутствовало двух одинаковых конформаций. Две конформации считались одинаковыми, если среднеквадратичное отклонение положений их атомов не превышало 1.0 Å. Выбранный таким образом ансамбль конформаций использовался для

вычисления средней свободной энергии связывания E_C по формуле Гиббса-Больцмана: $E_C = \sum_n E_n \frac{e^{-\frac{E_n}{kT}}}{Z}$, где Z – это статистическая сумма по свободным энергиям связывания E_n лигандов из ансамбля при температуре 300 К. При расчете свободной энергии связывания учитывались только вклады электростатической и гидрофобной составляющих, а также энтропийный вклад боковых цепей аминокислот белка. Это обусловлено тем, что энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий и энергии образования водородных связей достаточно близки по величине, как для отдельных молекул белка и лигандов, так и для комплекса белка с лигандом, рассматриваемых в водном окружении. Электростатическая составляющая рассчитывалась методом REBEL [155]. Константа диэлектрической проницаемости белка, лигандов и комплексов в соответствии с рекомендациями разработчиков программы была установлена равной 12.7; водной среды, представленной непрерывной моделью – 78.5. Оценка гидрофобной составляющей каждого атома белка проводилась на основе предположения о ее линейной пропорциональности поверхности атома, доступной растворителю. Коэффициент поверхностного натяжения был выбран равным 0.012 ккал/(моль \times Å²). Потеря конфигурационной энтропии боковых цепей аминокислот белка при связывании с исследуемыми молекулами проводилась на основе табулированных данных о ее максимально возможных величинах для каждого аминокислотного остатка [149].

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

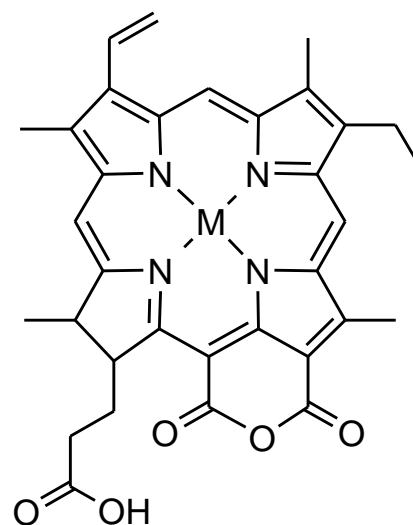
3.1 КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ Zn-, Ni- И Pd-ПРОИЗВОДНЫХ ПУРПУРИНА-18 С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

Взаимодействие Zn-, Ni- и Pd-пурпуринов-18 (соединения (1), (2) и (3), соответственно, рисунок 9) с ЧСА нами было исследовано методом абсорбционной спектроскопии. В водном буферном растворе, pH 7.0, соединения (1) и (2) склонны к агрегации, тогда как (3) присутствует преимущественно в мономерной форме. Об этом свидетельствовало изменение спектров поглощения соединений при переходе от водной фазы к диметилсульфоксиду [1, 156].

Так, в спектрах поглощения буферных растворов (1) и (2) наблюдали максимум в районе 740 нм (пик агрегатов), тогда как (3) поглощало только при 660 нм в области Q-полосы (мономерный пик). Различное поведение исследуемых соединений в водном растворе может быть вызвано влиянием металла в центральном положении. Для иона Pd^{2+} характерно плоско-квадратное строение его комплекса, которое и реализуется в тетрапирроле. Расщепление же d-подуровня Ni^{2+} и Zn^{2+} в поле лигандов не столь велико, что приводит к образованию октаэдра и квадратной пирамиды, соответственно [157]. Таким образом, в пурпурине эти два иона должны координировать дополнительные лиганды, что обуславливает сродство их молекул друг к другу, проявляющееся в агрегации.

Добавление ЧСА к буферным растворам (1)-(3) приводило к разрушению агрегированных структур (1) и (2) и к трансформации спектров

Рисунок 9. Структура соединений (1), (2) и (3).



поглощения всех испытуемых соединений (рисунок 10). По данным изменения спектров поглощения построены кривые связывания (рисунок 10, вставки) и рассчитаны константы связывания (таблица 4). Оказалось, что наличие Pd в молекуле пурпурина-18 приводит к видимому ослаблению (на один порядок) взаимодействия ФС-ЧСА по сравнению с Zn- и Ni-производными. В полости центра связывания гема, расположенного в субдомене IV альбумина, находится тирозин, способный координировать катион металла [137] (рисунок 11). Однако координационная насыщенность Pd²⁺ в составе комплекса с пурпурином-18 препятствует взаимодействию этого металла с кислородом тирозина, тогда как ионы Zn²⁺ и Ni²⁺ способны координироваться тирозином за счет образования дополнительных аксиальных связей. Последнее может обуславливать более высокое сродство соединений (1) и (2) к ЧСА относительно соединения (3).

Таким образом, при введении металла в молекулу пурпурина-18 достигается различное сродство металлокомплексов пурпурина к ЧСА. Это обстоятельство следует учитывать при разработке терапевтических ФС на основе металлокомплексов пурпурина-18 [158].

Таблица 4. Константы связывания (K_C) соединений (1)-(3) с ЧСА

Соединение	K_C, M^{-1}
(1)	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^5$
(2)	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^5$
(3)	$(3.7 \pm 0.2) \times 10^4$

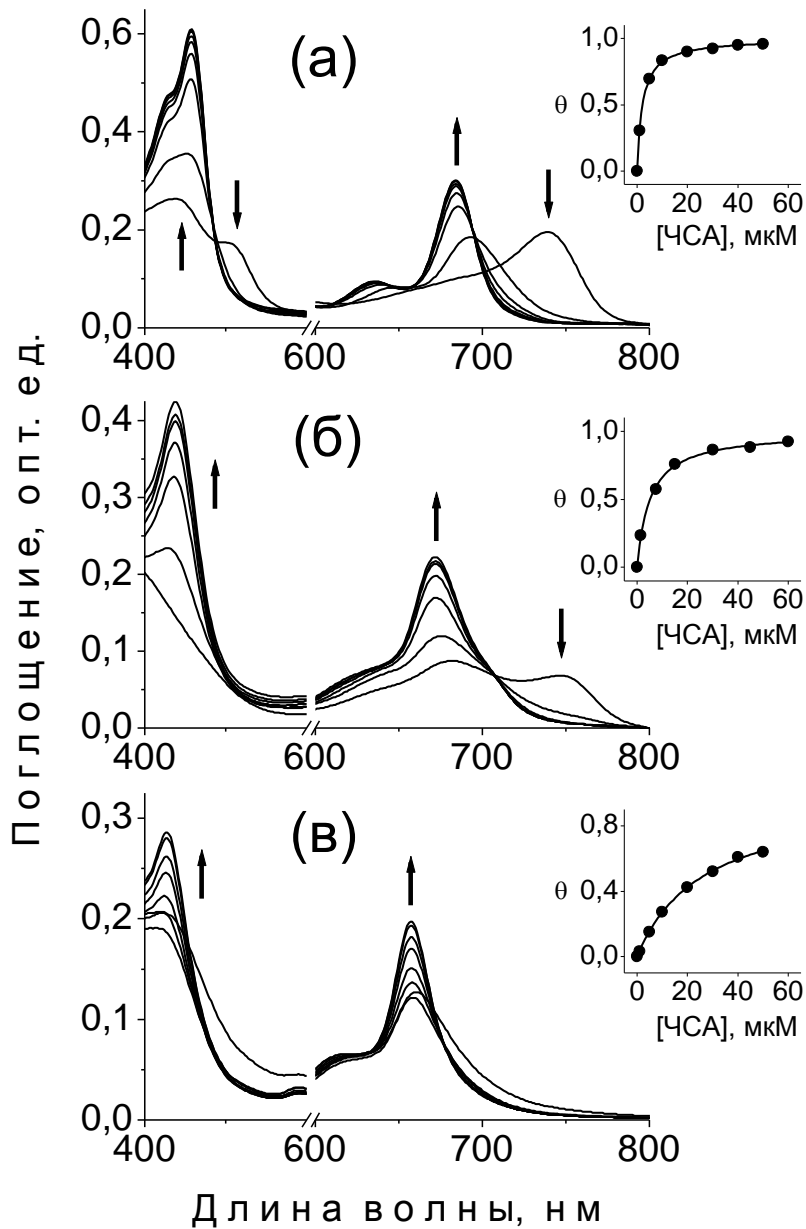


Рисунок 10. Спектры поглощения а: (1), б: (2), в: (3) (1×10^{-5} М) в отсутствие и в присутствии ЧСА ($0 - 6 \times 10^{-5}$). Стрелками показано изменение спектров поглощения при увеличении концентрации белка. Вставки: кривые связывания (1)–(3) с ЧСА [158].

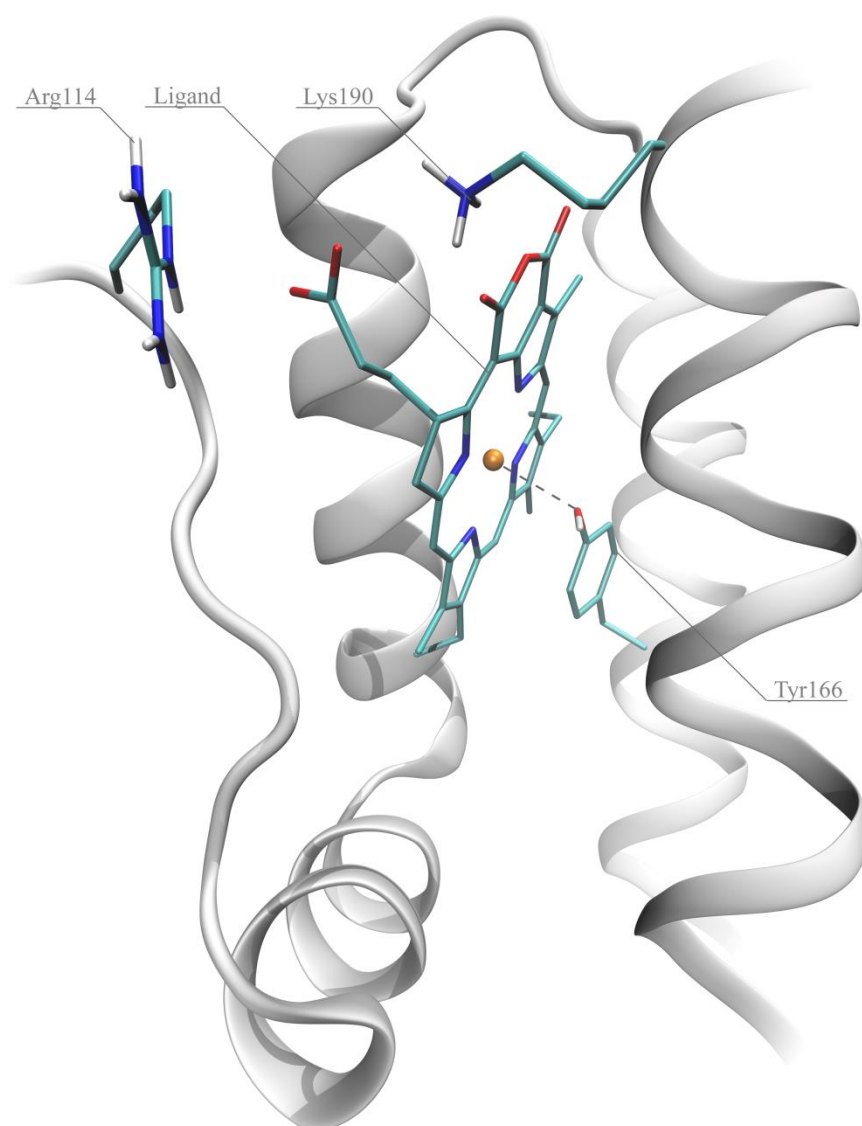


Рисунок 11. Структура металлокомплекса пурпурина-18 с альбумином, предсказанная методом молекулярного докинга [158].

Для исследования спектрально-кинетических характеристик триплетного состояния металл-пурпуринов нами было взято соединение (2). При фотовозбуждении лазерным импульсом тетрапиррола в этаноле происходит заселение триплетного состояния соединения. Спектр Т-Т поглощения представляет собой структурную полосу с поглощением в области 430-480 нм; в полосе Soret и Q-полосе наблюдается фотовыцветание. Добавление кислорода к образцу соединения (2) в этаноле оказывало воздействие на кинетику гибели триплетного состояния (2). На рисунке 12

представлены кинетические кривые для системы в отсутствие кислорода, насыщенной кислородом воздуха и чистым кислородом; в таблице 5 приведены константы скорости псевдопервого порядка гибели триплетного состояния k для этих систем. По данным таблицы построен график (рисунок 13). Константа скорости бимолекулярной реакции тушения кислородом k_q составила $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, что соответствует этой величине для бимолекулярной реакции диффузионно контролируемых реакций.

Таблица 5. k для систем с различной концентрацией O_2

$[\text{O}_2], \text{ mM}$	$k, \text{ c}^{-1}$
0	3.5×10^5
2	4.4×10^6
10	1.3×10^7

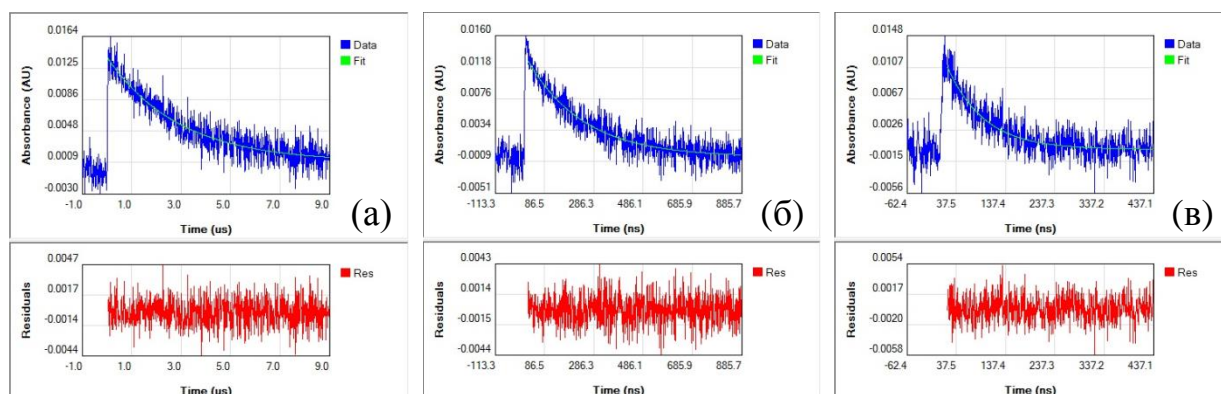


Рисунок 12. Кинетические кривые гибели триплетного состояния соединения (2) ($6 \times 10^{-6} \text{ M}$) в этаноле в отсутствие кислорода (а), в присутствии кислорода воздуха (б), и в присутствии чистого кислорода (в).

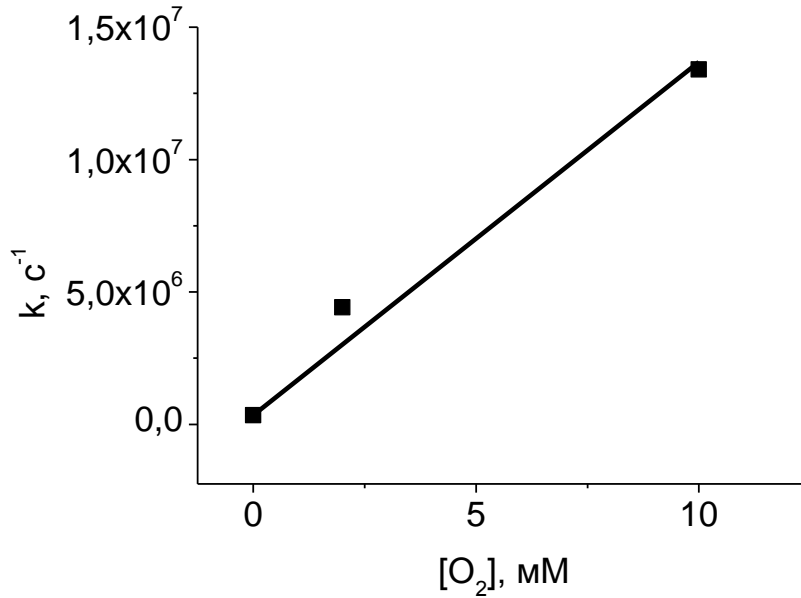


Рисунок 13. Зависимость константы скорости гибели триплетного состояния (2) от концентрации кислорода.

3.2 КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ДИБОРИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МЕТИЛФЕОФОРБИДА А С АЛЬБУМИНОМ И ЛИПОПРОТЕИНАМИ

Исследование комплексообразования метилфеофорбида *a* (4) и его диборированных аналогов – 13(2),17(3)-[ди(*o*-карборан-1-ил)метоксикарбонил]феофорбид *a* (5) и 13(2),17(3)-[ди(1-карба-клозо-додекаборан-1-ил)метоксикарбонил]феофорбид *a* (6) (рисунок 14) [144] – с ЧСА проводилось спектрометрическими методами и компьютерным моделированием при помощи «гибкого» докинга. Взаимодействие (4)–(6) с ЛНП было исследовано спектрометрическими методами.

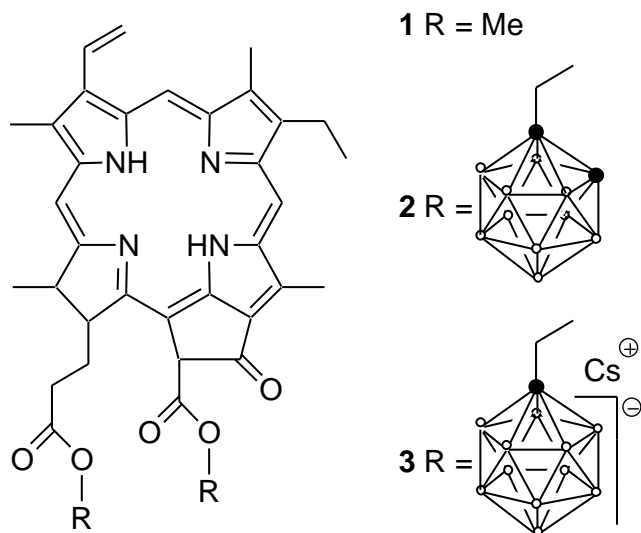


Рисунок 14. Структура соединений 1: (4), 2: (5) и 3: (6).

Добавление ЧСА к водному буферному раствору, pH 7.0, соединения (4) приводило к трансформации спектров поглощения (4) (рисунок 15, а). Наблюдалось увеличение оптической плотности полосы Soret и уменьшение поглощения Q-полосы при 689 нм (пик агрегатов (4)) с образованием нового максимума в области 677 нм (пик мономерной формы (4) в комплексе с белком); на 680 нм наблюдалась изобестическая точка. Присутствие преимущественно агрегированной формы (4) в водном буфере подтверждалось спектрами поглощения (4) в неполярных растворителях [1, 156]. Константа связывания K_C для комплекса (4) с ЧСА составила $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Для соединений (5), (6) добавление ЧСА не приводило к видимым изменениям их спектров поглощения.

Однако все три исследуемых соединения проявляли практически одинаковое сродство к ЛНП с $K_C \sim 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Взаимодействие с ЛНП приводило к изменениям спектров поглощения (4), сходным с изменениями при его связывании с ЧСА (рисунок 15, б). При добавлении ЛНП, в спектрах поглощения (4) наблюдали падение полосы поглощения в области 689 нм с возрастанием нового максимума на 673 нм. Для соединений (5), (6) добавление ЛНП приводило к возрастанию основных полос поглощения (рисунок 15, в, г).

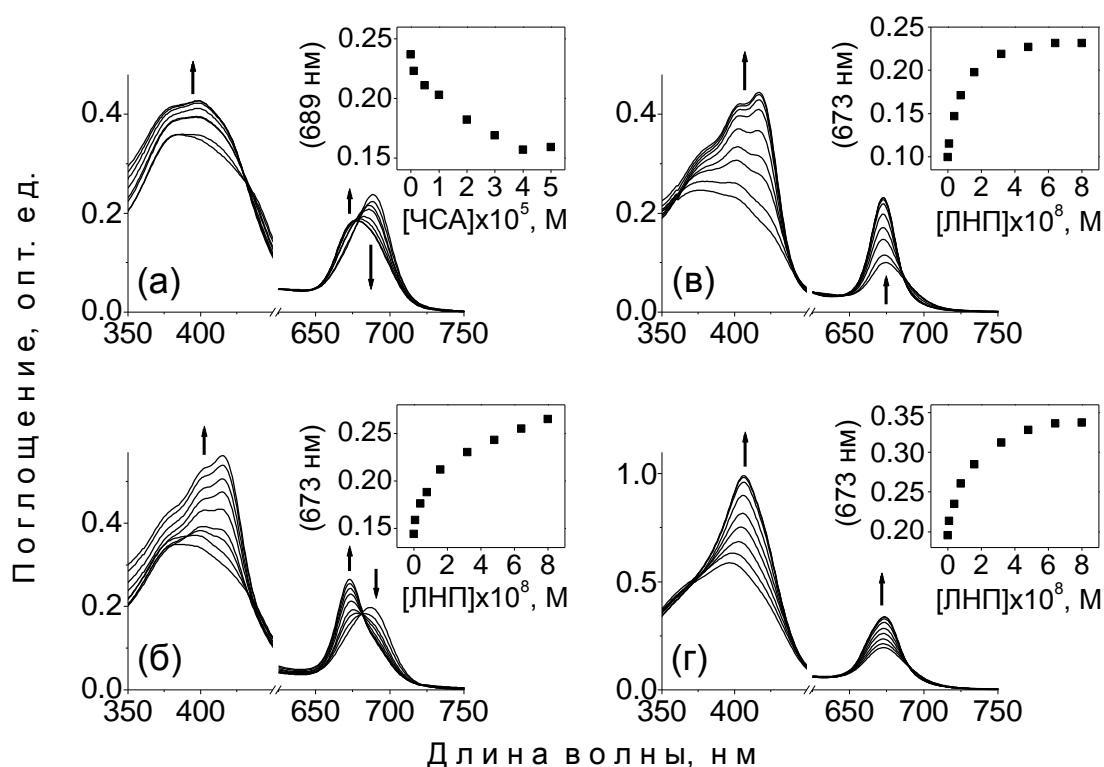


Рисунок 15. Спектры поглощения (4) (1×10^{-5} М) в присутствии ЧСА (0 – 5×10^{-5} М, а) и (4), (5) и (6) (1×10^{-5} М) в присутствии ЛНП (0 – 8×10^{-8} М, б, в, г, соответственно). Вставки: изменение поглощения при добавлении белков, измеренное на определенной длине волны [159].

Природа комплексообразования с липопротеинами отличается от связывания с альбумином. Если в последнем случае тетрапиррольный фрагмент связывается со специфическим сайтом, обладающим сродством к гемоподобным структурам, то при взаимодействии с ЛНП таких определенных мест связывания до сих пор не выявлено, и комплексообразование осуществляется за счет липофильных свойств ФС/РС [105]. Другими словами, имеет место разделение ФС/РС между водной и протеиновой фазами.

В ЧСА сайт связывания для гемоподобных структур FA1 представляет собой узкую и достаточно глубокую впадину на поверхности субдомена IB, которая сформирована в основном гидрофобными остатками аминокислот [137, 160]. Большинство позиций (4), найденных по результатам докинга, находятся внутри сайта связывания FA1, в положениях, сходных с положением протопорфирина IX в кристаллической структуре с кодом белковой базы данных 1N5U (рисунок 16). Именно такие позиции (4) обладают наиболее низкой свободной энергией связывания E_c и являются наиболее вероятными. Макроцикл (4) эффективно прячет поверхность своих гидрофобных атомов внутри впадины. Гидроксильная группа Tyr161 располагается вблизи от центра макроцикла (4), однако, в сравнении с протопорфирином IX она сдвинута в сторону входа в сайт связывания примерно на 1Å. Полипептидная цепь ЧСА, соединяющая домены IB и IA, организована таким образом, что образует небольшую арку над поверхностью домена IB. Размеры этой арки позволяют эффективно расположиться под ней 17-метоксикарбонилпропильной или 13(2)-метоксикарбонильной группам (4) (рисунок 16, С). Полярная метоксикарбонилпропильная группа располагается между положительно заряженными боковыми цепями Arg117 и Arg186, а атом кислорода метоксикарбонильной группы сближается с NH-группой основной цепи остатка Val116.

В отличие от (4), соединения (5) и (6) располагаются у входа в сайт FA1 (рисунок 17, 18). Две массивные боковые группы, представленные карбораном в нейтральной/заряженной форме, не способны одновременно разместиться и под аркой, описанной выше, и вблизи входа в сайт. Соединение (5) связывается с ЧСА таким образом, что центр макроцикла располагается между положительно заряженными боковыми цепями Lys190 и Arg114. 17-карборанилметоксикарбонилпропильная группа оказывается внутри сайта связывания, а 13(2)-

карборанилметоксикарбонильная группа прячет часть своей поверхности в углублении, образованном семью остатками Asp108-Arg114, и располагающемся справа от входа в сайт.

Соединение (6) размещается примерно в том же положении, что и (5), но так, что центральная часть макроцикла оказывается расположенной прямо напротив остатка Lys190. Положения же карборановых групп (6) и (5) существенно различаются. Отрицательно заряженная 13(2)-карборанилметоксикарбонильная группа находится вблизи положительно заряженной боковой цепи остатка Arg197 и полярной боковой цепи остатка Ser193, однако остаток Arg197 уже связан ионными взаимодействиями и водородной связью с остатком Asp108. 17-карборанилметоксикарбонилпропильная группа (6) лежит вблизи боковых цепей полярного остатка Asn109 и заряженного остатка Arg114; при этом карборан ориентирован в сторону растворителя.

Таким образом, из всех исследованных соединений наиболее эффективно с ЧСА связывается соединение (4). Относительные величины E_C , а также величины отдельных энергетических составляющих наиболее вероятных конформаций (4)–(6) представлены в таблице 6. Очевидно, что основной стабилизирующий вклад в суммарную энергию связывания вносится гидрофобной составляющей. Анализируя данные по гидрофобной составляющей энергии связывания трех соединений, представленные в таблице 6, следует отметить, что поверхность, доступная растворителю, у (5) и (6) примерно на 150 \AA^2 больше, чем у (4). Таким образом, соединение (4) наилучшим образом избегает контакта с растворителем за счет полного встраивания макроцикла в сайт, одновременно перекрывая доступ в него молекулам воды. Электростатическая же составляющая несколько дестабилизирует связывание (4)–(6) с ЧСА.

Боковые цепи аминокислотных остатков ЧСА, принимающих участие в связывании, частично теряют свою подвижность, а значит, уменьшается и их энтропия. Причем гидрофобные остатки в сайте уже выстроены определенным образом, и их энтропия лишь незначительно уменьшается при связывании лиганда, тогда как большинство остатков, окружающих вход в сайт, являются полярными или заряженными. Они напрямую контактируют с растворителем, поэтому их подвижность выше. Следовательно, связывание лиганда с такими остатками в большей степени уменьшает их энтропию. Таким образом, хотя гидрофобная составляющая и вносит основной вклад в суммарную E_C , потеря энтропии боковых цепей аминокислотных остатков при связывании (4)–(6) делает значимую корректировку ее величины.

Таблица 6. Результаты молекулярного докинга: E_C соединений (4), (5) и (6)

Соединение	Средняя E_C , ккал/моль	E_C наиболее вероятной конформации, ккал/моль			
		ГФ	Эл.	Эн.	Суммарная
(4)	-11.2	-15.6	1.2	2.6	-11.8
(5)	-9.2	-17.5	2.2	5.4	-9.9
(6)	-8.1	-14.5	1.1	4.7	-8.7

Составляющие E_C : ГФ – гидрофобная, Эл. – электростатическая, Эн. – потеря энтропии боковых цепей аминокислот ЧСА при связывании.

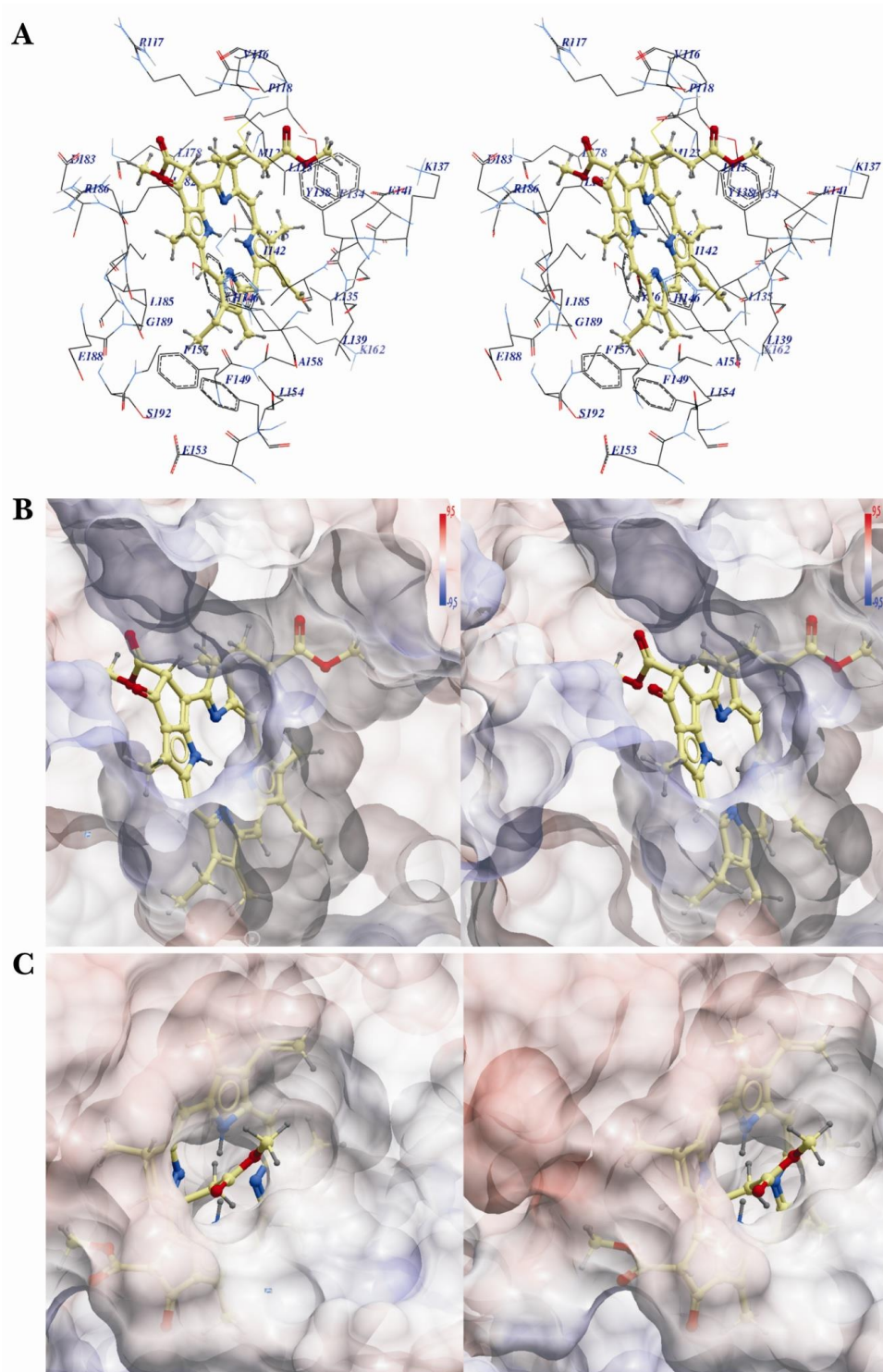


Рисунок 16. Конформация (4) с наименьшей относительной свободной энергией связывания, найденная методом гибкого докинга. (4) хорошо встраивается в сайт связывания FA1 ЧСА. (А) – каркасная модель, (В) – в виде молекулярной поверхности указаны границы сайта связывания, (С) – метил-пропионат (4) располагается под аркой, образованной основной цепью линкерной последовательности, соединяющей домены IA и IB ЧСА [159].

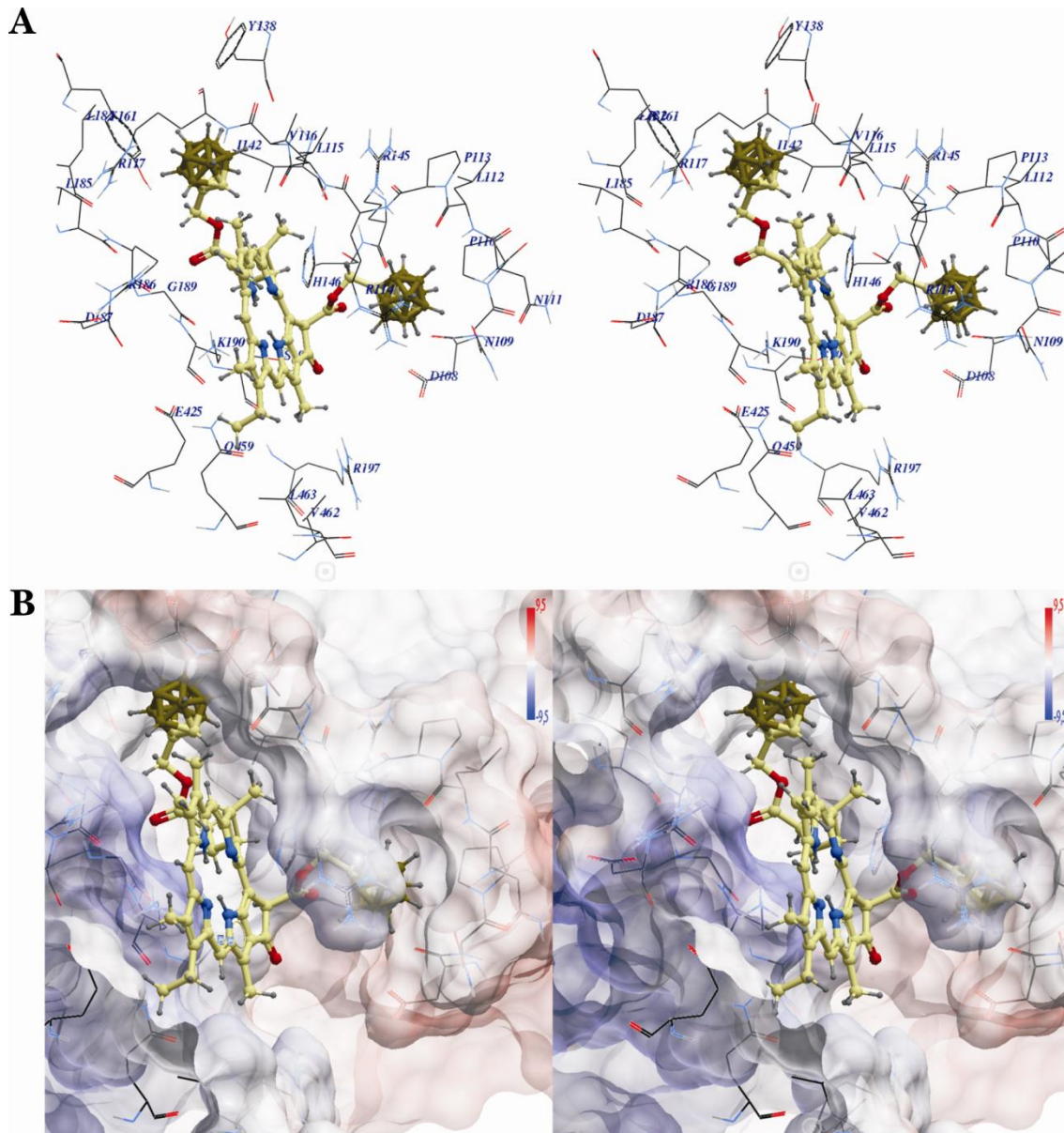


Рисунок 17. Наиболее выгодное расположение соединения (**5**) на входе в сайт связывания FA1. 17-карборанилметоксикарбонилпропильная группа находится внутри сайта связывания, а 13(2)-карборанилметоксикарбонильная группа располагается справа от входа в сайт связывания [159].

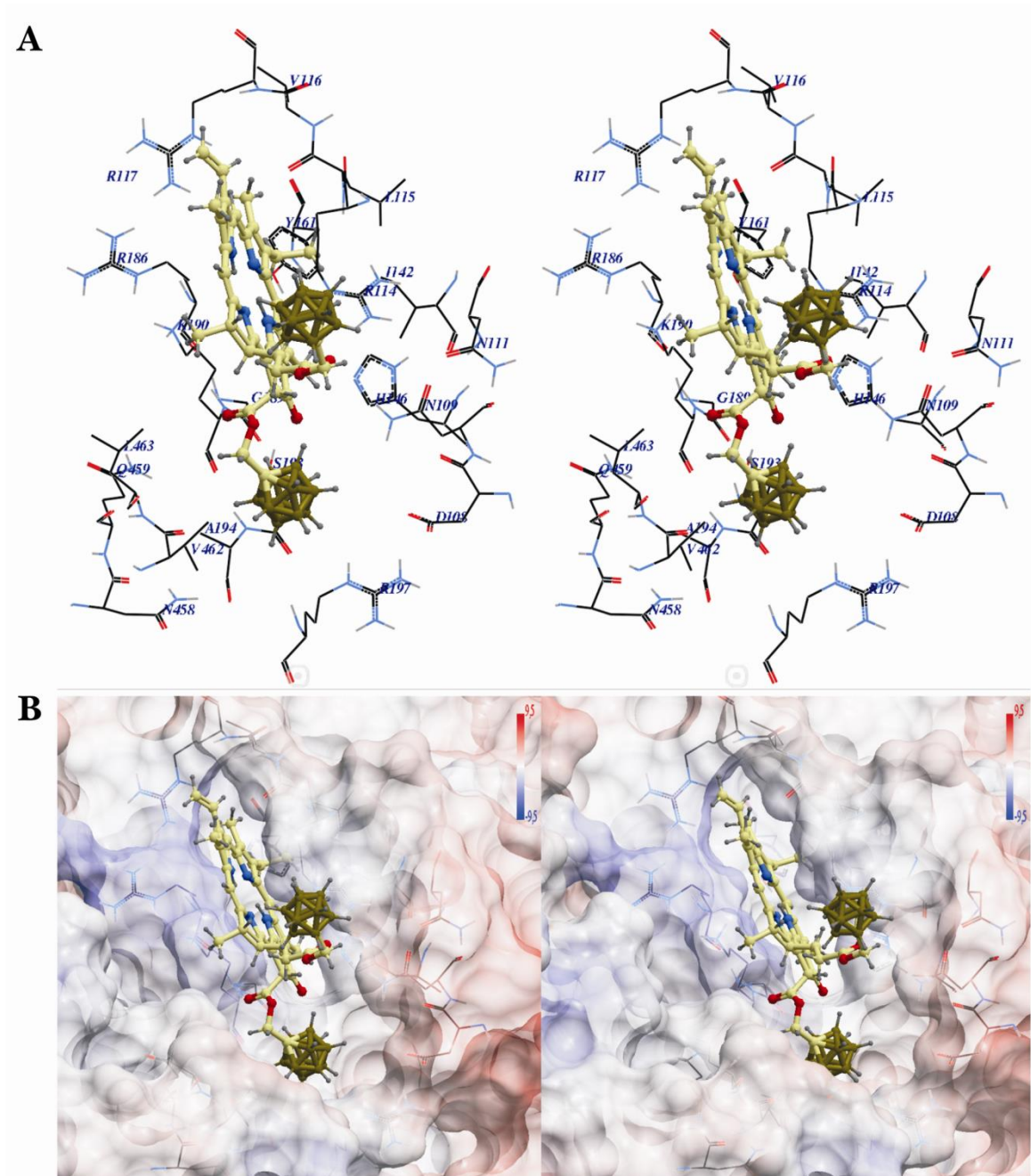


Рисунок 18. Наиболее выгодное расположение соединения (6) вблизи сайта связывания FA1. Достаточно большая площадь гидрофобной поверхности макроцикла оказывается доступна растворителю. 17-карборанилметоксикарбонилпропильная группа и 13(2)-карборанилметоксикарбонильная группа взаимодействуют с аминокислотными остатками Ser419 и Arg197, Asn109, соответственно [159].

Однако следует отметить, что борирование не всегда отрицательно сказывается на взаимодействии ЧСА-ФС. Так, например, было показано, что введение одного карборана в молекулу метилфеофорбида *a* – 13(2)-[(1-карба-клизододекаборан-1-ил)метоксикарбонил]феофорбид *a* метиловый эфир, соединение (7) (рисунок 19) – не только не препятствует такому взаимодействию, а, напротив, способно усиливать его. Низкоэнергетические конформации соединения (7) во многом сходны с (4), и встречаются конформации, где макроциклы обоих соединений занимают почти идентичные позиции в сайте связывания FA1. Однако позиции этих двух соединений в конформациях с наименьшей свободной энергией связывания несколько отличаются. Макроциклы (4) и (7) повернуты друг относительно друга примерно на 20° относительно оси, проходящей через атом углерода в положении 15 макроцикла перпендикулярно плоскости кольца. За счет этого поворота (7) несколько больше выступает из сайта связывания. Поворот боковой цепи Tyr138 приводит к расширению арки, упомянутой выше и изображенной на рисунке 16, С, что дает возможность 17-метоксикарбонилпропильной группе в (7) располагаться под ней более свободно. Также изменяются и конформации положительно заряженных боковых цепей Arg117 и Arg186, обеспечивая наиболее плотный контакт с отрицательно заряженным карбораном в составе (7). Связываясь с ЧСА соединение (7) также эффективно, как и (4), уменьшает поверхность доступную растворителю своего макроцикла. При этом находящийся у входа в сайт отрицательно заряженный метил-карборан имеет возможность контактировать с полярными молекулами воды. Также, взаимодействуя с положительно заряженными остатками Arg117 и Arg186, он существенно стабилизирует связывание с ЧСА (электростатическая составляющая свободной энергии связывания отрицательна, и равна -0,7 ккал/моль) [159].

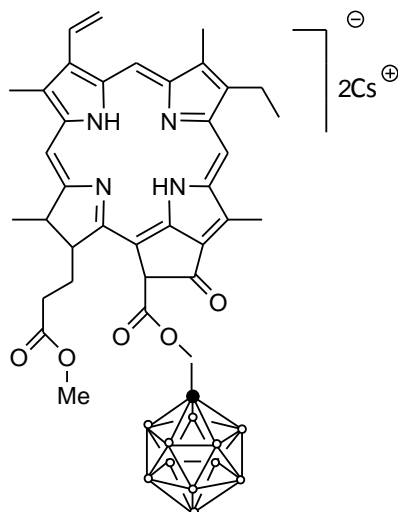


Рисунок 19. Структура соединения (7).

В другой нашей работе [63] было показано усиление связывания производного хлорина еб (хлорин еб 13(1)-N-(2-аминоэтиламид-15(2),17(3)-диметиловый эфир, (8)) с ЧСА в 4 раза при введении одного карборана в его макроцикл (хлорин еб 13(1)-N-(2-(N-(1-о-карборанил)метил)аминоэтил)амид-15(2),17(3)-диметиловый эфир, (9)) (рисунок 20). Константы комплексообразования составили $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ и $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ для (8) и (9), соответственно. Константы считали по изменению спектров флуоресценции испытуемых соединений (концентрация соединений – 10^{-5} M) при добавлении ЧСА ($0 - 5 \times 10^{-5} \text{ M}$); интенсивность флуоресценции возрастала с увеличением концентрации ЧСА (рисунок 21, 22).

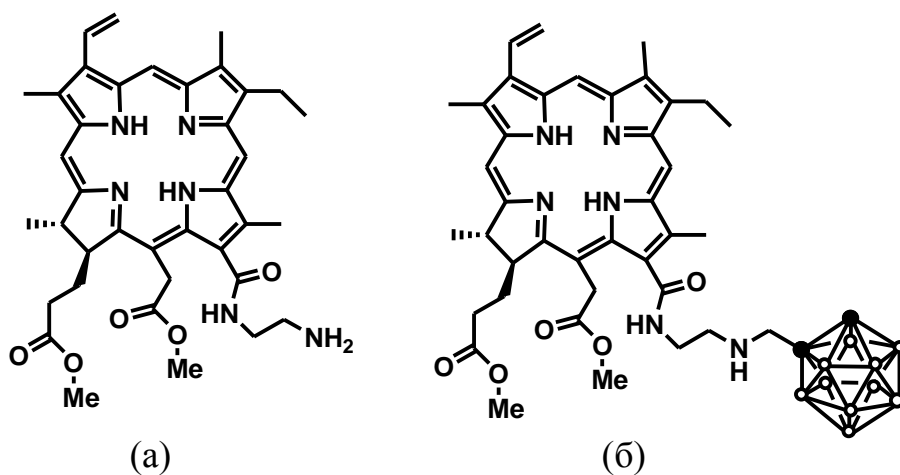


Рисунок 20. Структура соединений а: (8) и б: (9).

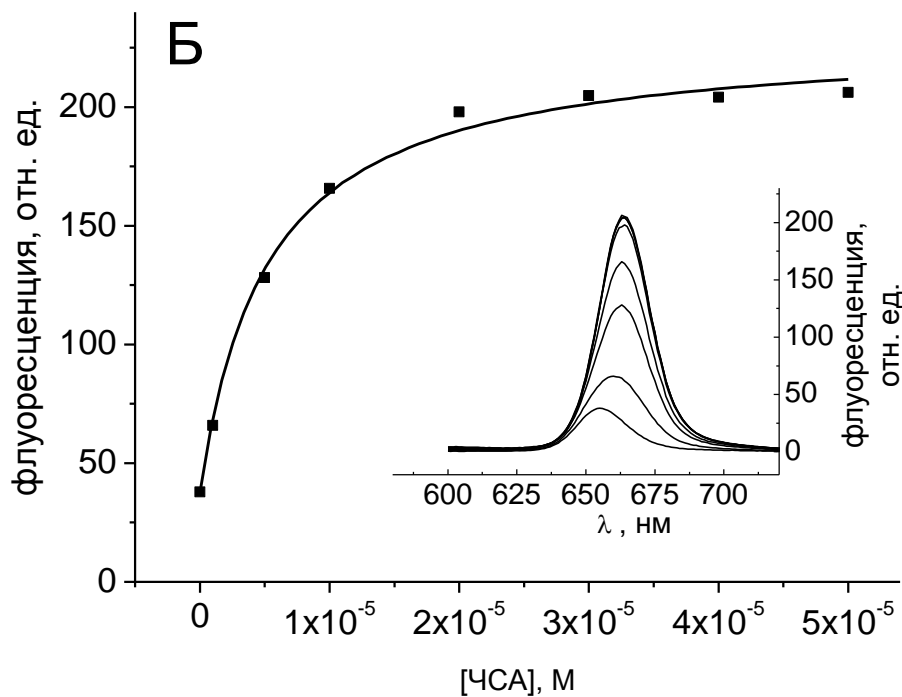
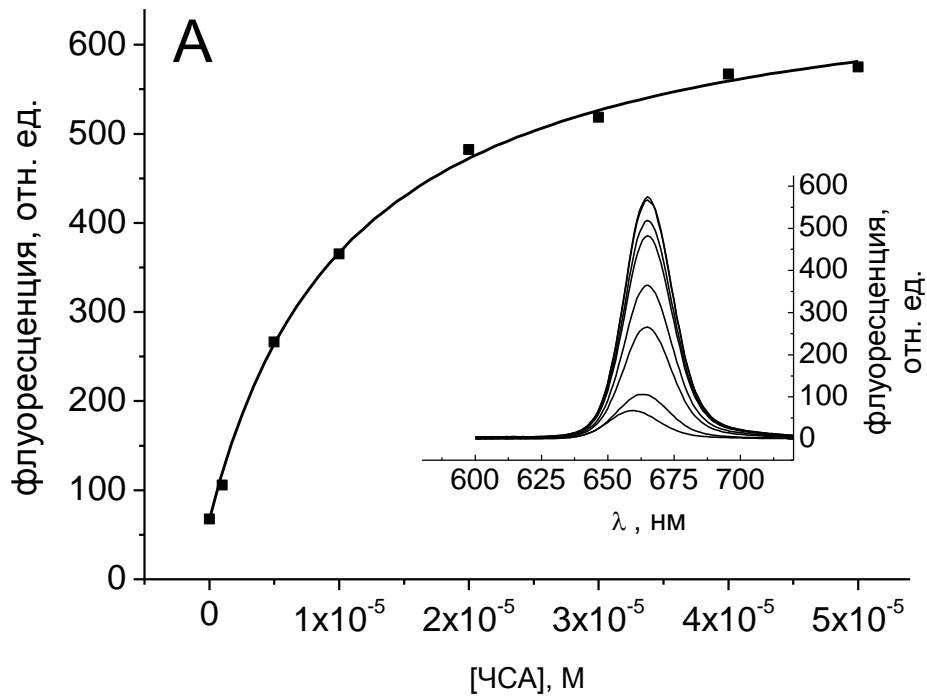


Рисунок 21. Возрастание флуоресценции соединений А: (8) и Б: (9) (1×10^{-5} М) при добавлении ЧСА ($0 - 5 \times 10^{-5}$ М), измеренное в районе 660 нм. Длина волны возбуждения – 400 нм. Вставки: спектры флуоресценции (8), (9) [63].

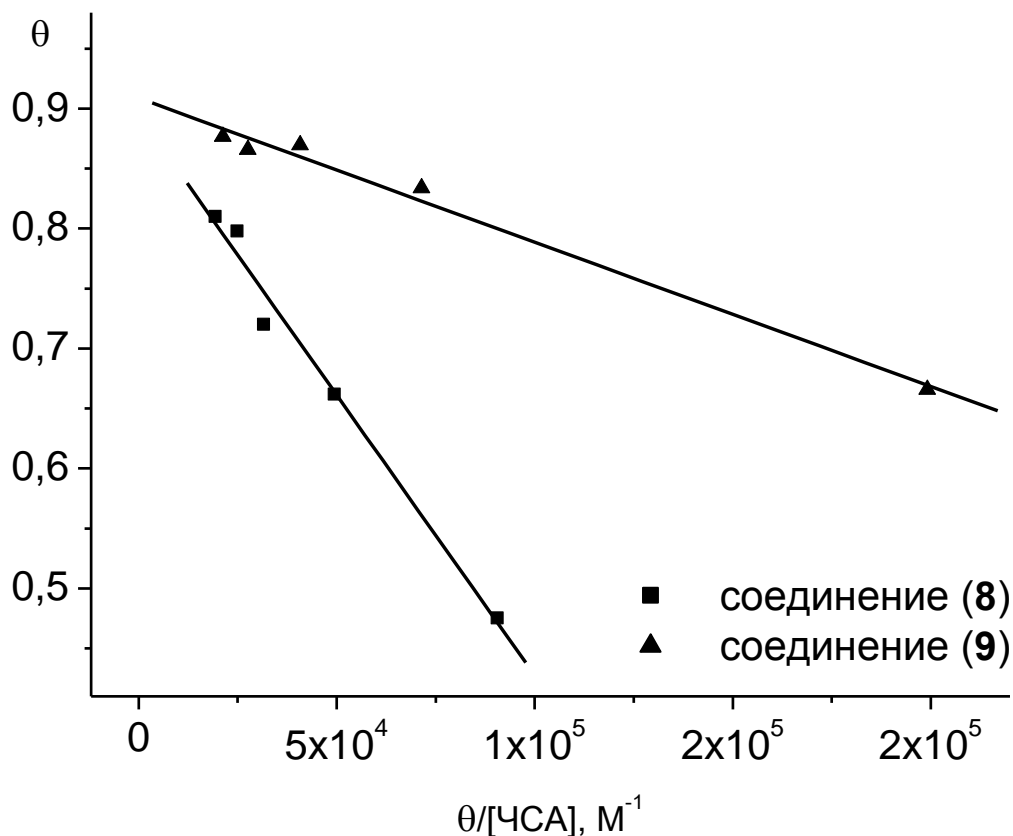


Рисунок 22. График Скотчарда для комплексов (8) и (9) с ЧСА, где θ – доля связанного соединения, $[ЧСА]$ – равновесная концентрация ЧСА [63].

В работе [145] введение карборанового фрагмента в молекулу (1) – соединение (10) (рисунок 23) – оказывало стерические препятствия и затрудняло образование агрегатов в водных растворах, однако практически не влияло на сродство к ЧСА. Константы, вычисленные на основании изменения спектров поглощения (рисунки 10 (а) и 24), имеют близкие значения и составляют $4,5 \times 10^5$ и $4 \times 10^5 M^{-1}$ для (1) и (10), соответственно.

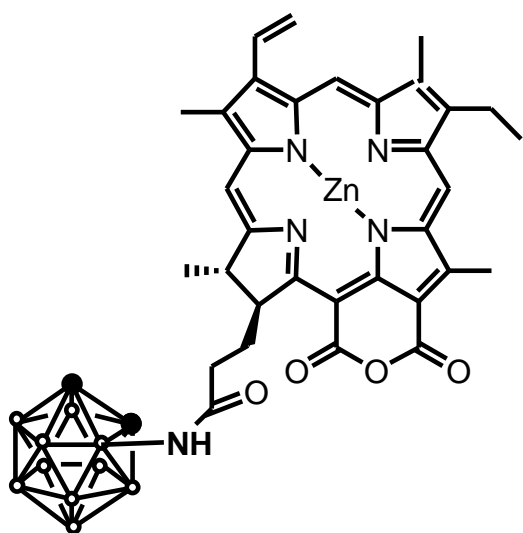


Рисунок 23. Структура соединения (10).

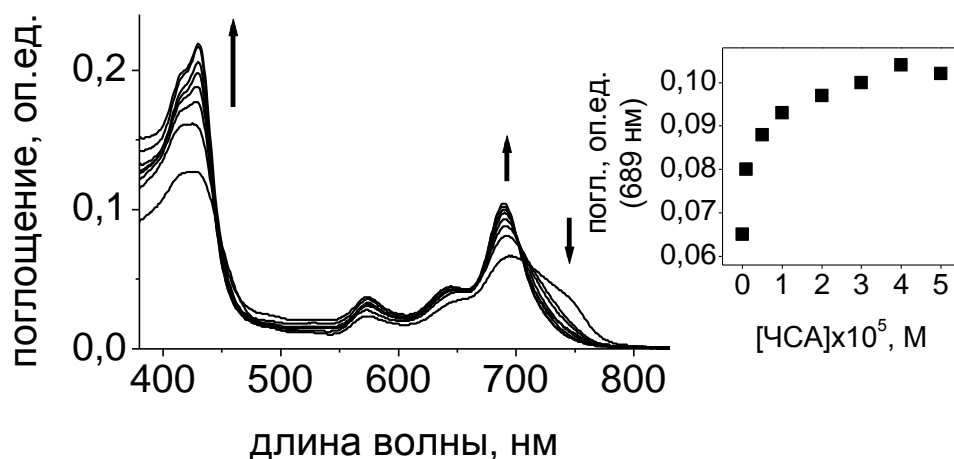


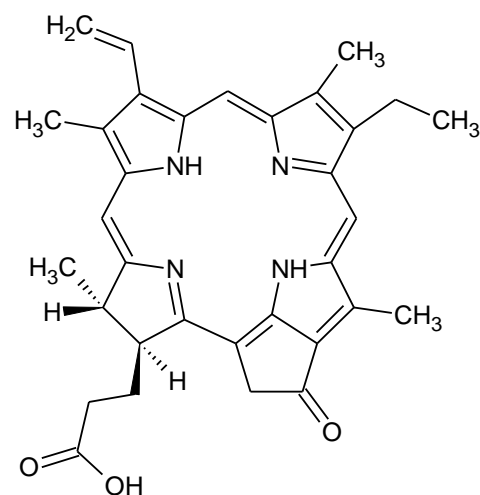
Рисунок 24. Спектры поглощения (10) (1×10^{-5} М) в фосфатном буферном растворе, рН=7, в присутствии ЧСА ($0 - 5 \times 10^{-5}$ М). Вставки: возрастание поглощения (10) при добавлении белка, измеренное на 689 нм [145].

Итак, установлено, что введение в молекулу (4) двух объемных заместителей карборанов приводит к стерическим препятствиям при взаимодействии с сайтом связывания ЧСА, но не влияет существенным образом на сродство к ЛНП. Таким образом, распределение и доставка дикарборан-содержащих ФС/РС (5), (6) может осуществляться липопротеин-опосредованным транспортом [159].

3.3 РОЛЬ КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ В КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ ПИРОФЕОФОРБИДА А С АЛЬБУМИНОМ И ЛИПОПРОТЕИНАМИ

Взаимодействие пиррофеофорбида *a* (ПФФ, соединение (11), рисунок 25) с ЧСА и ЛНП в водном буферном растворе при pH 7.4 и 5.0 нами исследовано методом абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. В водном буферном растворе ПФФ присутствует преимущественно в виде агрегатов (максимум поглощения 710 нм). Это подтверждали спектры поглощения ПФФ в этаноле и в смесях этанола с водным буфером (рисунок 26); добавление этанола к водным растворам агрегированных соединений вызывает их дезагрегацию, проявляющуюся в исчезновении полосы агрегатов и появлении максимума поглощения мономерной формы [1]. При pH 5.0 полоса агрегатов ПФФ была вдвое интенсивнее, чем при pH 7.4, а поглощение мономеров (674 нм) практически не наблюдалось. Устойчивость агрегатов тетрапиррольных соединений определяется гидрофобными взаимодействиями между макроциклами и электростатическим отталкиванием одноименно заряженных заместителей соседних молекул. Таким образом, уменьшение pH и смещение кислотно-основного равновесия в сторону недиссоциированных COOH-групп ПФФ приводит к возрастанию стабильности его агрегатов.

Рисунок 25. ПФФ.



Добавление ЧСА и ЛНП к раствору ПФФ сопровождалось дезагрегацией и образованием мономеров ПФФ в комплексе с белком. В спектрах поглощения наблюдалось падение абсорбционного максимума ПФФ в области 710 нм и возрастание поглощения при 674 нм (рисунок 27).

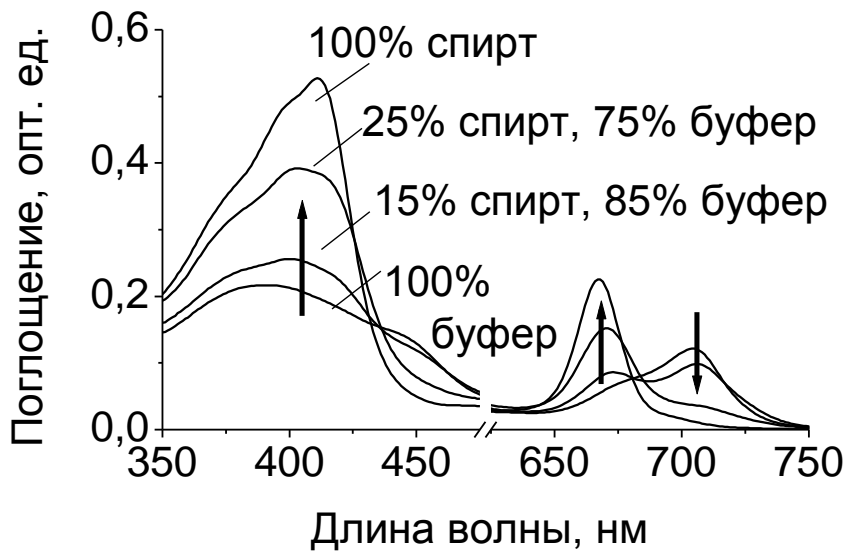


Рисунок 26. Спектры поглощения ПФФ (5×10^{-6} М) в фосфатном буферном растворе (рН 7.0), этиловом спирте и их смесях.

Напротив, малые количества ЛНП ($\leq 5 \times 10^{-9}$ М) приводили к возрастанию полосы агрегатов ПФФ. ЛНП способны связывать ФС как в мономерной, так и в агрегированной формах [104]. В случае малых концентраций ЛНП большее число молекул ПФФ связывается с одной макромолекулой, что может вызывать агрегацию ПФФ. При комплексообразовании ПФФ с ЧСА такой эффект не наблюдался, т.к. альбумин связывает тетрапиррольный ФС в мольном соотношении 1:1 [129]. При насыщении связывания ПФФ с ЛНП пики агрегатов при обоих значениях рН исчезали, тогда как при взаимодействии ПФФ с ЧСА практически полная дезагрегация ПФФ наблюдалась только при рН 7.4. Кислая среда – рН 5.0 – препятствовала образованию мономеров ПФФ в комплексе с белком в исследуемом диапазоне концентраций.

Связывание с ЧСА ослабевает, а с ЛНП возрастает с увеличением гидрофобности ФС [104, 129]. Снижение рН от 7.4 до 5.0, несмотря на

смещение равновесия в сторону недиссоциированных молекул ПФФ, не должно изменять его гидрофобность. Такое предположение, высказанное для пурпурина-18 [104], должно быть справедливо и для ПФФ, т.к. структуры обоих соединений схожи: у ПФФ имеется циклопентенон вместо ангидридного цикла в пурпурине-18. Действительно, уменьшение рН не отразилось на взаимодействии ПФФ с ЛНП, обусловленном экстракцией ПФФ из водной фазы в фазу ЛНП [105], однако, привело к ослаблению связывания ПФФ с ЧСА в 1.5 раза (рисунок 28, таблица 7). Последнее может быть вызвано как конформационными изменениями ЧСА в исследуемом диапазоне рН, так и смещением равновесия ПФФ в сторону недиссоциированных карбоксильных групп и уменьшением стабилизации комплекса [129].

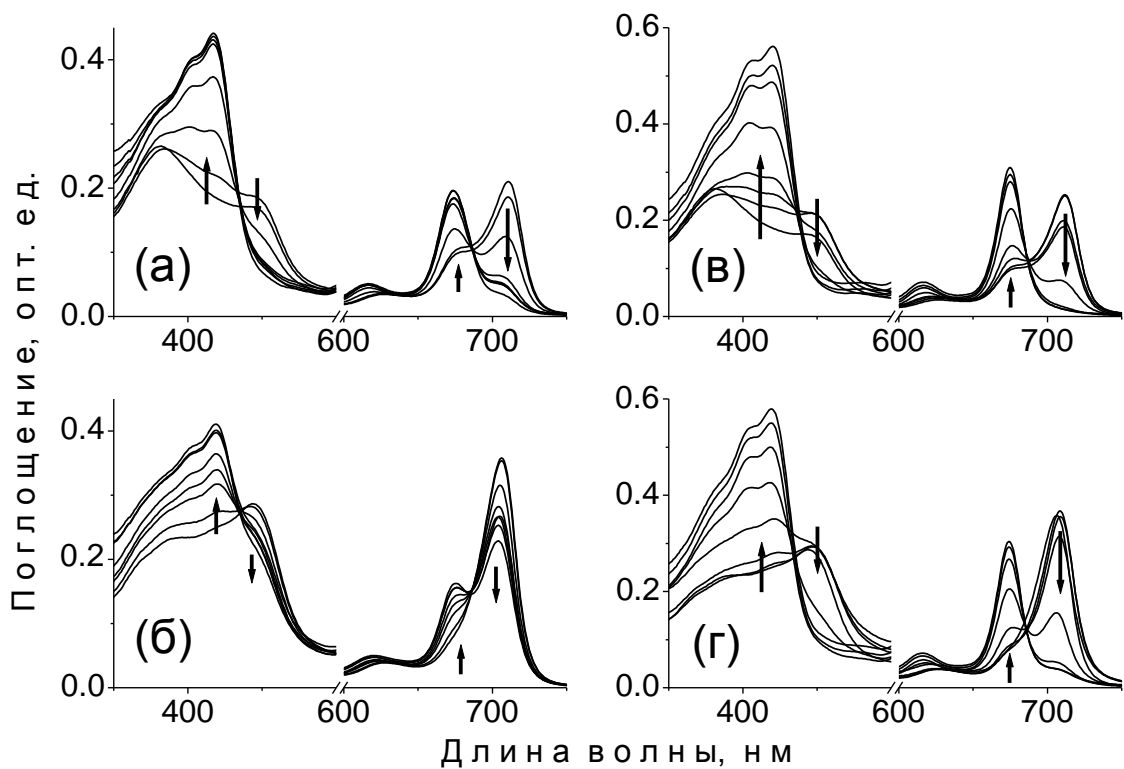


Рисунок 27. Спектры поглощения ПФФ (1×10^{-5} М) в отсутствие и в присутствии ЧСА ($1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$ М, а, б) и ЛНП ($2.5 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$ М, в, г) при рН 7.4 (а, в) и 5.0 (б, г). Стрелками показаны направления изменения спектров ПФФ при увеличении концентрации белка [156].

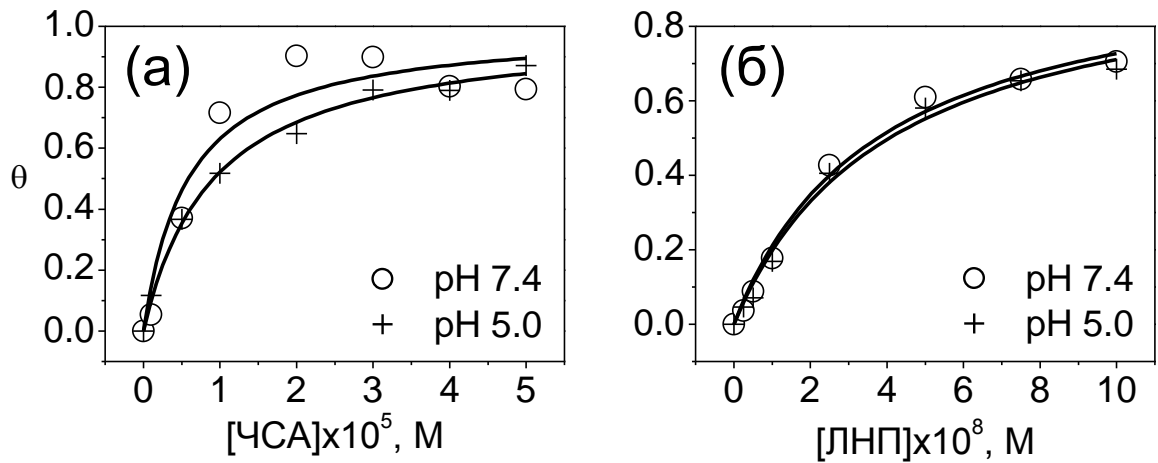


Рисунок 28. Кривые связывания ПФФ с ЧСА (а) и с ЛНП (б) при рН среды 7.4 (1) и 5.0 (2) [156].

Таблица 7. Константы связывания (K_C) ПФФ с белками

Белок	рН	K_C, M^{-1}
ЧСА	7.4	1.7×10^5
	5.0	1.1×10^5
ЛНП	7.4	2.7×10^7
	5.0	2.5×10^7

Таким образом, реакция комплексообразования ПФФ с ЧСА более чувствительна к рН, чем взаимодействие ПФФ с ЛНП. Эту особенность следует учитывать при разработке терапевтических ФС на основе ПФФ [156].

Склонность к образованию агрегированных структур в водном растворе обуславливала низкий квантовый выход флуоресценции ПФФ. Добавление ЧСА приводило к увеличению интенсивности флуоресценции благодаря образованию стабильного комплекса мономерной формы ПФФ с белком, а также усилению жесткости макроцикла в белковом окружении [104] (рисунок 29). На вставках к рисунку показано постепенное увеличение флуоресценции ПФФ (676 нм) при добавлении ЧСА, завершающееся

выходом на плато, что указывает на насыщение связывания ПФФ с белком. На основании изменений интенсивности флуоресценции построены кривые связывания. Константы связывания составили 1.4×10^5 и $8.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ для рН 7.4 и 5.0, соответственно. Наибольшее значение параметров связывания ПФФ с ЧСА достигалось при рН 7.4 по сравнению с рН 5.0.

Добавление $\leq 5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ЛНП к ПФФ не вызывало существенных изменений в спектрах флуоресценции последнего. Дальнейшее повышение концентрации ЛНП приводило к значительному возрастанию интенсивности флуоресценции ПФФ (рисунок 30). Это может объясняться тем, что интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству неагрегированных молекул ФС [104], и служить дополнительным подтверждением способности ЛНП связывать как мономерную, так и агрегированную формы ПФФ.

По кинетическим кривым флуоресценции, полученным методом однофотонного счета, были измерены времена жизни флуоресценции ПФФ ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) в этиловом спирте и фосфатном буфере, рН 7.0, в отсутствие и в присутствии ЧСА ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) (рисунок 31). Затухание флуоресценции может быть описано моно-экспоненциальной кривой, что свидетельствует о наличии одного типа комплекса. Время жизни флуоресценции ПФФ в ЧСА оказалось близким по значению со временем жизни в этиловом спирте (таблица 8). Время жизни флуоресценции обусловлено природой микроокружения. Так, в мицеллярном окружении время жизни определяется доступностью соединения для контакта с водной фазой [1]. Таким образом, было обнаружено, что в комплексе с ЧСА контакт ПФФ с водной фазой ограничен.

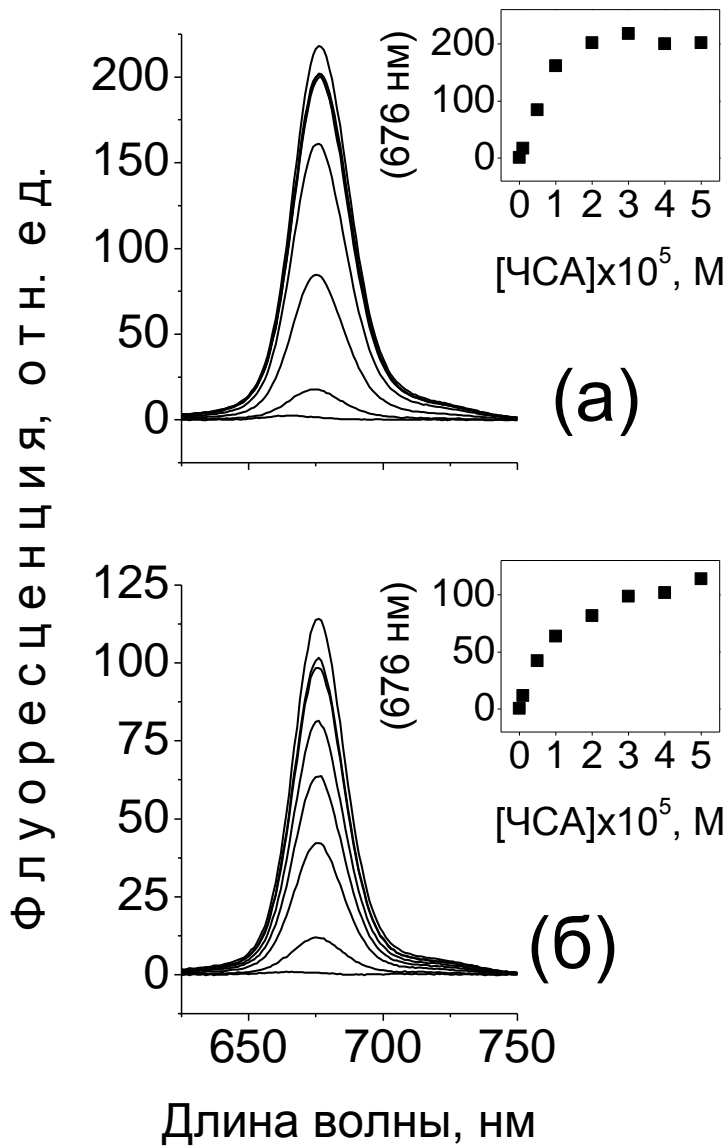


Рисунок 29. Спектры флуоресценции ПФФ (1×10^{-5} М) в отсутствие и в присутствии ЧСА ($1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$ М, *a*, *б*) при рН 7.4 (*a*) и 5.0 (*б*). Вставки: возрастание флуоресценции при добавлении белка, измеренное на 676 нм. Длина волны возбуждения – 400 нм.

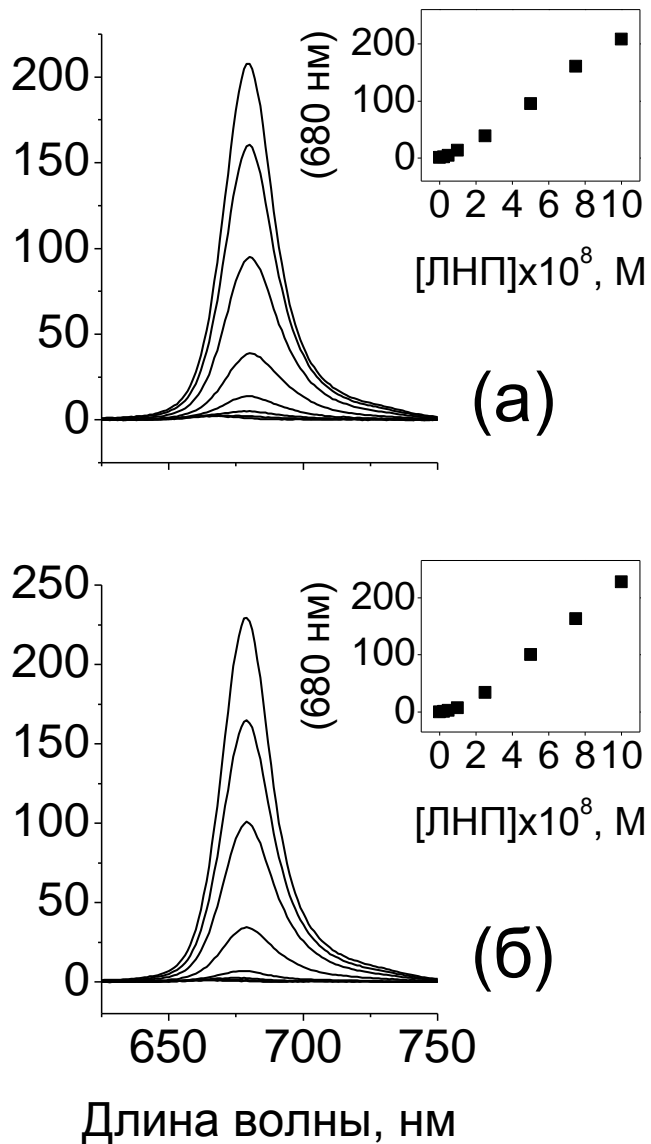


Рисунок 30. Спектры флуоресценции ПФФ (1×10^{-5} М) в отсутствие и в присутствии ЛНП (2.5×10^{-9} – 1×10^{-7} М, *a*, *б*) при рН 7.4 (*a*) и 5.0 (*б*). Вставки: возрастание флуоресценции при добавлении белка, измеренное на 680 нм. Длина волны возбуждения – 400 нм.

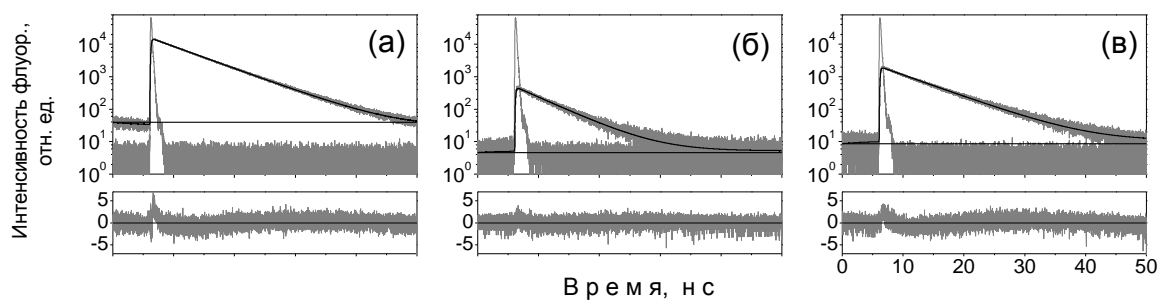


Рисунок 31. Затухание флуоресценции ПФФ (1×10^{-6} М) в этаноле (а) и фосфатном буфере, рН 7.0, в отсутствие (б) и в присутствии ЧСА (5×10^{-5} М) (в). Длина волны возбуждения – 653 нм, испускания – 680 нм.

Таблица 8. Время жизни флуоресценции ПФФ (1×10^{-6} М) в этиловом спирте и фосфатном буфере, рН 7.0 в отсутствие и в присутствии ЧСА (5×10^{-5} М)

Система	λ_{ex} , нм	τ , нс
Этиловый спирт	653	6.4
Буфер	653	5.1
Буфер	400	5.0
ЧСА	653	6.5
ЧСА	400	6.7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовалось связывание семи важнейших потенциальных ФС с основными белками крови ЧСА и ЛНП. Было обнаружено, что на связывание с ЧСА существенным образом влияют такие факторы, как наличие заместителей, природа металла и рН среды.

Однако при связывании данных соединений с ЛНП такие эффекты не наблюдались. Т.е. ни заместители (карбораны), ни рН не оказывали существенного влияния на комплексообразование ФС с данным белком.

Наши исследования позволили предложить механизм распределения пиррофоефорбида *a* и диборированных производных метилфоефорбида *a*. Было установлено, что наличие объемных заместителей и понижение кислотности среды (для ФС, несущего карбоксильную группу) ослабляет сродство таких молекул к ЧСА. Таким образом, распределение и доставка могут осуществляться ЛНП-опосредованным транспортом.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что природа металла обуславливает различное поведение металлокомплексов пурпурина-18 в водном буферном растворе (смещение равновесия мономер→агрегат) и различное сродство к ЧСА. Присутствие Zn и Ni приводит к агрегации в водном буфере и усилению взаимодействия ФС–ЧСА по сравнению с Pd-комплексом благодаря способности Zn и Ni образовывать дополнительные аксиальные связи; координационная насыщенность Pd препятствует такому взаимодействию.
2. Показано, что распределение и доставка дикарборан-содержащих сенсibilизаторов может осуществляться липопротеиновым транспортом. Введение в молекулу МФФ двух карборанов (нейтральных или отрицательно заряженных) приводит к стерическим препятствиям при взаимодействии с сайтом связывания ЧСА, но практически не влияет на сродство к ЛНП.
3. Показано, что стабильность агрегатов ПФФ в водном буферном растворе возрастает с понижением pH (от 7.4 до 5.0). Это объясняется смещением кислотно-основного равновесия в сторону недиссоциированных COOH-групп в кислой среде.
4. Обнаружена способность ЛНП связывать ПФФ как в мономерной, так и в агрегированной форме. Комплексообразование ПФФ с ЧСА или ЛНП в целом сопровождается его дезагрегацией и образованием мономеров в комплексе с белком; малые количества ЛНП, напротив, стимулируют дополнительную агрегацию ПФФ в комплексе с макромолекулой.
5. Установлено, что реакция комплексообразования ПФФ с ЧСА более чувствительна к pH, чем взаимодействие ПФФ с ЛНП. Уменьшение pH (от 7.4 до 5.0) не влияет на взаимодействие ПФФ с ЛНП, т.к. при этом не

изменяется гидрофобность ПФФ. В исследуемом диапазоне рН константа связывания ПФФ с ЧСА уменьшается в 1.5 раза, что обусловлено конформационными изменениями ЧСА и смещением равновесия в сторону образования недиссоциированных карбоксильных групп ПФФ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЛК	5-аминолевулиновая кислота
АФК	активная форма кислорода
БНЗТ	борнейтронозахватная терапия
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВК	внутренняя конверсия
ГП	гематопорфирин
ГПП	гематопорфириновое производное
ДЖК	длинноцепочечные жирные кислоты
ЖК	жирные кислоты
ИК	интеркомбинационная конверсия
КФ	карбоксифлуоресцеин
ЛВП	липопротеины высокой плотности
ЛНП	липопротеины низкой плотности
ЛОНП	липопротеины очень низкой плотности
МФФ	метилфеофорбид <i>a</i>
ПФФ	пирофеофорбид <i>a</i>
РС	радиосенсибилизатор
ТГФП	5,10,15,20-тетракис(о-, м- или п-гидроксифенил)порфирина
ТГФХ	5,10,15,20-тетракис(м-гидроксифенил)хлорин
ТСФП	тетрасульфифенилпорфирин
ФДТ	фотодинамическая терапия
ФС	фотосенсибилизатор
ЧСА	человеческий сывороточный альбумин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Phillips, D. Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines / D. Phillips // *Prog. React. Kinetics.* – 1997. – V. 22. – No. 3/4. – P. 175–300.
2. Soloway, A. H. The chemistry of neutron capture therapy / A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, F.-G. Rong, R. F. Barth, I. M. Codogni, J. G. Wilson // *Chem. Rev.* – 1998. – V. 98. – P. 1515–1562.
3. Barr, H. Photodynamic therapy in the normal rat colon with phthalocyanine sensitisation / H. Barr, C. J. Tralau, A. J. MacRobert, N. Krasner, P. B. Boulos, C. G. Clark, S. G. Bown // *Br. J. Cancer.* – 1987. – V. 56. – No. 2. – P. 111–118.
4. Barr, H. The contrasting mechanisms of colonic collagen damage between photodynamic therapy and thermal injury / H. Barr, C. J. Tralau, P. B. Boulos, A. J. MacRobert, R. Tilly, S. G. Bown // *Photochem. Photobiol.* – 1987. – V. 46. – No. 5. – P. 795–800.
5. Ambroz, M. Time-resolved fluorescence spectroscopy and intracellular imaging of disulphonated aluminium phthalocyanine / M. Ambroz, A. J. MacRobert, J. Morgan, G. Rumbles, M. S. Foley, D. Phillips // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1994. – V. 22. – No. 2. – P. 105–117.
6. Rück, A. Fluorescence formation during photodynamic therapy in the nucleus of cells incubated with cationic and anionic water-soluble photosensitizers / A. Rück, T. Köllner, A. Dietrich, W. Strauss, H. Schneckenburger // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1992. – V. 12. – No. 4. – P. 403–412.
7. Weyergang, A. Photodynamic targeting of EGFR does not predict the treatment outcome in combination with the EGFR tyrosine kinase inhibitor Tyrphostin AG1478 / A. Weyergang, O. Kaalhus, K. Berg // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2008. – V. 7. – P. 1032–1040.

8. Korbelik, M. Potentiation of photodynamic therapy of cancer by complement: the effect of γ -inulin / M. Korbelik, P. D. Cooper // *British J. of Cancer*. – 2007. – V. 96. – P. 67–72.
9. Kralova, J. Porphyrin-cyclodextrin conjugates as a nanosystem for versatile drug delivery and multimodal cancer therapy / J. Kralova, Z. Kejik, T. Briza, P. Pouckova, A. Kral, P. Martasek, V. Kral // *J. Med. Chem.* – 2010. – V. 53. – No. 1. – P. 128–138.
10. Klein, A. Photodynamic therapy in dermatology – an update 2008 / A. Klein, P. Babilas, S. Karrer, M. Landthaler, R.-M. Szeimies // *J. D. D. G.* – 2008. – V. 6. – P. 839–845.
11. Bown, S. G. Photodynamic therapy to scientists and clinicians – one world or two? / S. G. Bown // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1990. – V. 6. – No. 1–2. – P. 1–12.
12. Rywkin, S. Importance of type I and type II mechanisms in the photodynamic inactivation of viruses in blood with aluminum phthalocyanine derivatives / S. Rywkin, L. Lenny, J. Goldstein, N. E. Geacintov, H. Margolis-Nunno, B. Horowitz // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – V. 56. – No. 4. – P. 463–469.
13. Shulyakovskaya, T. In vivo experimental studies on the role of free radicals in photodynamic therapy. I. Measurement of the steady state concentration of free radicals in tumor tissues of mice / T. Shulyakovskaya, L. Sumegi, D. Gal // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – V. 195. – No. 2. – P. 581–587.
14. Ben-Hur, E. Photosensitized inactivation of Chinese hamster cells by phthalocyanines / E. Ben-Hur, I. Rosenthal // *Photochem. Photobiol.* – 1985. – V. 42. – No. 2. – P. 129–133.
15. Inoue, K. Mechanism of dye-sensitized photooxidation of tryptophan, tryptamine, and their derivatives. Singlet oxygen process in competition with type I process / K. Inoue, T. Matsuura, I. Saito // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1982. – V. 55. – No. 9. – P. 2959–2964.

- 16.Chan, W.-S. Photosensitising activity of phthalocyanine dyes screened against tissue culture cells / W.-S. Chan, J. F. Marshall, R. Svensen, D. Phillips, I. R. Hart // *Photochem. Photobiol.* – 1987. – V. 45. – No. 6. – P. 757–761.
- 17.Mathai, S. Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy / S. Mathai, T. A. Smith, K. P. Ghiggino // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – V. 6. – P. 995–1002.
- 18.Brown, S. B. New light on cancer-therapy / S. B. Brown, T. G. Truscott // *Chem. in Brit.* – 1993. – V. 29. – No. 11. – P. 955–958.
- 19.Chen, Y. Synthesis of bacteriochlorins and their potential utility in photodynamic therapy (PDT) / Y. Chen, G. Li, R. K. Pandey // *Current Organic Chemistry.* – 2004. – V. 8. – No. 12. – P. 1105–1134.
- 20.Kuimova, M. K. Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants / M. K. Kuimova, G. Yahioglu, P. R. Ogilby // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – No. 1. – P. 332–340.
- 21.Freyer, W. Towards PDT sensitizers with internal source of singlet oxygen / W. Freyer, D. Leupold // *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* – 1995. – V. 30. – No. 1. – P. 77–78.
- 22.Locher, G. L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons / G. L. Locher // *Am. J. Roentgenol. Radium Ther.* – 1936. – V. 36. – P. 1–13.
- 23.Davis, M. A. Relative biological effectiveness of the $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$ reaction in HeLa cells / M. A. Davis, J. B. Little, K. M. Ayyangar, A. R. Reddy // *Radiat. Res.* – 1970. – V. 43. – No. 3. – P. 534–553.
- 24.Граймс, Р. Карбораны / Р. Граймс // Пер с англ. М.: Мир. – 1974.
- 25.Захаркин, Л. И. Синтез бис(диалкиламинометил)-о- и м-карборанов и исследование их в качестве возможных препаратов для борнейтронозахватной терапии / Л. И. Захаркин, В. А. Ольшевская, Р. А. Спрышкова, Е. Ю. Григорьева, В. И. Рябкова, Г.И. Борисов // *Химико-фармацевтический журнал.* – 2000. – № 6. – С. 21–23.

26. Phillips, T. L. Boron neutron capture therapy: Finally come of age? / T. L. Phillips // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1994. – V. 28. – No. 5. – P. 1215–1216.
27. Mehta, S. C. Targeted drug delivery for boron neutron capture therapy / S. C. Mehta, D. R. Lu // *Pharm. Res.* – 1996. – V.13. – No. 3. – P. 344–351.
28. Altieri, S. Carborane derivatives loaded into liposomes as efficient delivery systems for boron neutron capture therapy / S. Altieri, M. Balzi, S. Bortolussi, P. Bruschi, L. Ciani, A. M. Clerici, P. Faraoni, C. Ferrari, M. A. Gadan, L. Panza, D. Pietrangeli, G. Ricciardi, S. Ristori // *J. Med. Chem.* – 2009. – V. 52. – No. 23. – P. 7829–7835.
29. Bregadze, V. I. Polyhedral boron derivatives of porphyrins and phthalocyanines / V. I. Bregadze, I. B. Sivaev, D. Gabel, D. Wöhrle // *J. Porphyrins and Phthalocyanines.* – 2001. – V. 5. – No. 11. – P. 767–781.
30. Ol'shevskaya, V. A. Boronated monocarbon carborane substituted derivatives of 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin: Synthesis and molecular mechanisms of antitumor action / V. A. Ol'shevskaya, A. V. Zaitsev, Zh. G. Brechko, V. N. Luzgina, T. T. Kondratieva, E. G. Kononova, A. F. Mironov, V. N. Kalinin, A. A. Shtil // *In Modern Trends in Organoelement and Polymer Chemistry, Moscow.* – 2004. – Book of Abstracts. – P. 9.
31. Malik, Z. 5-Aminolevulinic acid stimulation of porphyrin and hemoglobin synthesis by uninduced Friend erythroleukemic cells / Z. Malik, M. Djaldetti // *Cell Differ.* – 1979. – V. 8. – No. 3. – P. 223–233.
32. Kennedy, J. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience / J. C. Kennedy, R. H. Pottier, D. C. Pross // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1990. – V. 6. – No. 1–2. – P. 143–148.
33. Szeimies, R.-M. Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer / R.-M. Szeimies, C. A. Morton, A. Sidoroff, L. R. Braathen // *Acta Derm. Venereol.* – 2005. – V. 85. – P. 483–490.

34. Berenbaum, M. C. Meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrins, a new class of potent tumour photosensitisers with favourable selectivity / M. C. Berenbaum, S. L. Akande, R. Bonnett, H. Kaur, S. Ioannou, R. D. White, U. J. Winfield // *Br. J. Cancer.* – 1986. – V. 54. – No. 5. – P. 717–725.
35. Kessel, D. Lipoprotein-mediated distribution of N-aspartyl chlorin-E6 in the mouse / D. Kessel, K. L. Whitcomb, V. Schulz // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – V. 56. – P. 51–56.
36. Conway, C. L. In vivo and in vitro characterisation of a protoporphyrin IX–cyclic RGD peptide conjugate for use in photodynamic therapy / C. L. Conway, I. Walker, A. Bell, D. J. H. Roberts, S. B. Brown, D. I. Vernon // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2008. – V. 7. – P. 290–298.
37. Mroz, P. Imidazole metalloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: Role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production / P. Mroz, J. Bhaumik, D. K. Dogutan, Z. Aly, Z. Kamal, L. Khalid, H. L. Kee, D. F. Bocian, D. Holten, J. S. Lindsey, M. R. Hamblin // *Cancer Letters.* – 2009. – V. 282. – P. 63–76.
38. Balaz, M. Synthesis of hydrophilic conjugated porphyrin dimers for one-photon and two-photon photodynamic therapy at NIR wavelengths / M. Balaz, H. A. Collins, E. Dahlstedt, H. L. Anderson // *Org. Biomol. Chem.* – 2009. – V. 7. – P. 874–888.
39. Kuimova, M. K. Photophysical properties and intracellular imaging of water-soluble porphyrindimers for two-photon excited photodynamic therapy / M. K. Kuimova, H. A. Collins, M. Balaz, E. Dahlstedt, J. A. Levitt, N. Sergent, K. Suhling, M. Drobizhev, N. S. Makarov, A. Rebane, H. L. Anderson, D. Phillips // *Org. Biomol. Chem.* – 2009. – V. 7. – P. 889–896.
40. Karunakaran, S. C. In vitro demonstration of apoptosis mediated photodynamic activity and NIR nucleus imaging through a novel porphyrin / S. C. Karunakaran, P. S. S. Babu, B. Madhuri, B. Marydasan, A. K. Paul, A. S. Nair, K. S. Rao, A. Srinivasan, T. K. Chandrashekar, Ch. M. Rao, R. Pillai, D. Ramaiah // *ACS Chem. Biol.* – 2013. – V. 8. – P. 127–132.

41. Ali, H. Metal Complexes as Photo- and Radiosensitizers / H. Ali, J. E. van Lier // *Chem. Rev.* – 1999. – V. 99. – P. 2379–2450.
42. Bonnett, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy / R. Bonnett // *Chem. Soc. Rev.* – 1995. – V. 24. – P. 19–33.
43. Kiesslich, T. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan®- and Foslip®-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines / T. Kiesslich, J. Berlanda, K. Plaetzer, B. Krammer, F. Berr // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – V. 6. – P. 619–627.
44. Dougherty, T. J. Photodynamic therapy / T. J. Dougherty // *Photochem. Photobiol.* – 1993. – V. 58. – No. 6. – P. 895–900.
45. Huang, Y.-Y. In vitro photodynamic therapy and quantitative structure–activity relationship studies with stable synthetic near-infrared-absorbing bacteriochlorin photosensitizers / Y.-Y. Huang, P. Mroz, T. Zhiyentayev, S. K. Sharma, T. Balasubramanian, C. Ruzie, M. Krayner, D. Fan, K. E. Borbas, E. Yang, H. L. Kee, C. Kirmaier, J. R. Diers, D. F. Bocian, D. Holten, J. S. Lindsey, M. R. Hamblin // *J. Med. Chem.* – 2010. – V. 53. – No. 10. – P. 4018–4027.
46. Ruzie, C. Tailoring a bacteriochlorin building block with cationic, amphipathic, or lipophilic substituents / C. Ruzie, M. Krayner, T. Balasubramanian, J. S. Lindsey // *J. Org. Chem.* – 2008. – V. 73. – P. 5806–5820.
47. Oertel, M. Novel bacteriochlorine for high tissue-penetration: Photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in a mouse tumour model / M. Oertel, S. I. Schastak, A. Tannapfel, R. Hermann, U. Sack, J. Mössner, F. Berr // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2003. – V. 71. – P. 1–10.
48. Morgan, A. R. New sensitizers for photodynamic therapy: Controlled synthesis of purpurins and their effect on normal tissue / A. R. Morgan, A. Rampersaud, G. M. Garbo, R. W. Keck, S. H. Selman // *J. Med. Chem.* – 1989. – V. 32. – P. 904–908.

49. Gryshuk, A. Structure-activity relationship among purpurinimides and bacteriopurpurinimides: trifluoromethyl substituent enhanced the photosensitizing efficacy / A. Gryshuk, Y. Chen, L. N. Goswami, S. Pandey, J. R. Missert, T. Ohulchansky, W. Potter, P. N. Prasad, A. Oseroff, R. K. Pandey // *J. Med. Chem.* – 2007. – V. 50. – No. 8. – P. 1754–1767.
50. Gryshuk, A. L. In vivo stability and photodynamic efficacy of fluorinated bacteriopurpurinimides derived from bacteriochlorophyll-a / A. L. Gryshuk, Y. Chen, W. Potter, T. Ohulchansky, A. Oseroff, R. K. Pandey // *J. Med. Chem.* – 2006. – V. 49. – P. 1874–1881.
51. Pandey, R. K. Nature: A rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy / R. K. Pandey, L. N. Goswami, Y. Chen, A. Gryshuk, J. R. Missert, A. Oseroff, T. J. Dougherty // *Lasers in Surgery and Medicine.* – 2006. – V. 38. – P. 445–467.
52. Bui-Xuan, N.-H. Photo-activated pheophorbide-a, an active component of *Scutellaria barbata*, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231 / N.-H. Bui-Xuan, P. M.-K. Tang, C.-K. Wong, K.-P. Fung // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2010. – V. 131. – P. 95–103.
53. Spornyak, J. A. Hexylether derivative of pyropheophorbide-a (HPPH) on conjugating with ³gadolinium(III) aminobenzyl diethylenetriaminepentaacetic acid shows potential for in vivo tumor imaging (MR, fluorescence) and photodynamic therapy / J. A. Spornyak, W. H. White III, M. Ethirajan, N. J. Patel, L. Goswami, Y. Chen, S. Turowski, J. R. Missert, C. Batt, R. Mazurchuk, R. K. Pandey // *Bioconjugate Chem.* – 2010. – V. 21. – P. 828–835.
54. Gacio, A. F. Photodynamic cell-kill analysis of breast tumor cells with a tamoxifen-pyropheophorbide conjugate / A. F. Gacio, C. Fernandez-Marcos, N. Swamy, D. Dunn, R. Ray // *Journal of Cellular Biochemistry.* – 2006. – V. 99. – P. 665–670.
55. Chen, Y. Methyl pyropheophorbide-a analogues: Potential fluorescent probes for the peripheral-type benzodiazepine receptor. Effect of central metal in

- photosensitizing efficacy / Y. Chen, X. Zheng, M. P. Dobhal, A. Gryshuk, J. Morgan, T. J. Dougherty, A. Oseroff, R. K. Pandey // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48. – P. 3692–3695.
56. Zheng, G. Low-density lipoprotein reconstituted by pyropheophorbide cholesteryl oleate as target-specific photosensitizer / G. Zheng, H. Li, M. Zhang, S. Lund-Katz, B. Chance, J. D. Glickson // *Bioconjugate Chem.* – 2002. – V. 13. – P. 392–396.
57. Мальшакова, М. В. Конъюгаты производных хлорофилла а с бетулином / М. В. Мальшакова, Д. В. Белых, И. Н. Алексеев, О. В. Витязева, А. В. Кучин // *Макрогетероциклы.* – 2013. – Т. 6. – № 1. – С. 62–66.
58. Trachtenberg, J. Vascular-targeted photodynamic therapy (padoporfin, WST09) for recurrent prostate cancer after failure of external beam radiotherapy: a study of escalating light doses / J. Trachtenberg, R. A. Weersink, S. R. H. Davidson, M. A. Haider, A. Bogaards, M. R. Gertner, A. Evans, A. Scherz, J. Savard, J. L. Chin, B. C. Wilson, M. Elhilali // *BJU Int.* – 2008. – V. 102. – No. 2. – P. 556–562.
59. Ashur, I. Photocatalytic generation of oxygen radicals by the water-soluble bacteriochlorophyll derivative WST11, noncovalently bound to serum albumin / I. Ashur, R. Goldschmidt, I. Pinkas, Y. Salomon, G. Szewczyk, T. Sarna, A. Scherz // *J. Phys. Chem. A.* – 2009. – V. 113. – No. 28. – P. 8027–8037.
60. Phillips, D. The photochemistry of sensitizers for photodynamic therapy / D. Phillips // *Pure Appl. Chem.* – 1995. – V. 67. – No. 1. – P. 117–126.
61. Kunz, L. Photodynamic modification of disulfonated aluminium phthalocyanine fluorescence in a macrophage cell line / L. Kunz, J. P. Connelly, J. H. Woodhams, A. J. MacRobert // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – V. 6. – P. 940–948.
62. Oleinick, N. L. New phthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy / N. L. Oleinick, A. R. Antunez, M. E. Clay, B. D. Rihter, M. E. Kenney // *Photochem. Photobiol.* – 1993. – V. 57. – No. 2. – P. 242–247.

63. Ol'shevskaya, V. A. Novel boronated chlorin e6-based photosensitizers: Synthesis, binding to albumin and antitumour efficacy / V. A. Ol'shevskaya, R. G. Nikitina, A. N. Savchenko, M. V. Malshakova, A. M. Vinogradov, G. V. Golovina, D. V. Belykh, A. V. Kutchin, M. A. Kaplan, V. N. Kalinin, V. A. Kuzmin, A. A. Shtil // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – V. 17. – P. 1297–1306.
64. Ol'shevskaya, V. A. Boronated porphyrins and chlorins as potential anticancer drugs / V. A. Ol'shevskaya, A. V. Zaitsev, A. N. Savchenko, A. A. Shtil, S. C. Chan, V. N. Kalinin // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2007. – V. 28. – No. 11. – P. 1910–1916.
65. Ol'shevskaya, V. A. Boronated protohaemins: synthesis and in vivo antitumour efficacy / V. A. Ol'shevskaya, R. G. Nikitina, A. V. Zaitsev, V. N. Luzgina, E. G. Kononova, T. G. Morozova, V. V. Drozhzhina, O. G. Ivanov, M. A. Kaplan, V. N. Kalinin, A. A. Shtil // *Org. Biomol. Chem.* – 2006. – V. 4. – P. 3815–3821.
66. Lovell, J. F. Activatable photosensitizers for imaging and therapy / J. F. Lovell, T. W. B. Liu, J. Chen, G. Zheng // *Chem. Rev.* – 2010. – V. 110. – No. 5. – P. 2839–2857.
67. Джафаров, Э. С. Структура и конформационные особенности сывороточного альбумина / Э. С. Джафаров // Баку: ЭЛМ. – 1990. – 240 С.
68. Peters, T. Jr.: Serum albumin / T. Peters // In *The Plasma Proteins*, 2nd ed., ed. by Putnam F. W. Academic Press, New York. – 1975. – V. 1. – P. 133–181.
69. Kragh-Hansen, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin / U. Kragh-Hansen // *Pharmacol. Rev.* – 1981. – V. 33. – No. 1. – P. 17–53.
70. Behrens, P. Q. Structure of human serum albumin (Abstract) / P. Q. Behrens, A. M. Spiekerman, J. R. Brown // *Fed. Proc.* – 1975. – V. 34. – P. 591.
71. Meloun, B. Complete amino acid sequence of human serum albumin / B. Meloun, L. Moravek, V. Kostka // *F.E.B.S. (Fed Eur. Biochem. Soc.)* – 1975. – Lett. 58. – P. 134–137.
72. Foster, J. F. Plasma albumin / J. F. Foster // In *The Plasma Proteins*, 1st ed., ed. by Putnam F. W. Academic Press, New York. – 1960. – V. 1. – P. 179–239.

73. Brown, J. R. Serum albumin: Amino acid sequence / J. R. Brown // In *Albumin Structure, Function and Uses*, ed. by Rosenoer V. M., Oratz M., Rothschild M. A. Pergamon Press, Oxford. – 1977. – P. 27–51.
74. Winter, W. P. Amino acid substitution in two identical inherited human serum albumin variants: Albumin Oliphant and albumin Ann Arbor / W. P. Winter, L. R. Weitkamp, D. L. Rucknagel // *Biochemistry*. – 1972. – V. 11. – P. 889–896.
75. Franklin, S. G. Localization of the amino acid substitution site in a new variant of human serum albumin, albumin Mexico-2 / S. G. Franklin, S. I. Wolf, A. Zweidler, B. S. Blumberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1980. – V. 77. – P. 2505–2509.
76. Hvidt, A. Hydrogen exchange in proteins / A. Hvidt, S. O. Nielsen // *Adv. Protein Chem.* – 1966. – V. 21. – P. 287–386.
77. Willumsen, L. Hydrogen isotope exchange in the study of protein conformation. A quantitative test of an exchange mechanism / L. Willumsen // *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*. – 1971. – V. 38. – P. 223–295.
78. Benson, E. S. Deuterium-hydrogen exchange analysis of pH-dependent transitions in bovine plasma albumin / E. S. Benson, B. E. Hallaway, R. W. Lumry // *J. Biol. Chem.* – 1964. – V. 239. – P. 122–129.
79. Benson, E. S. On the mechanisms of pH-dependent hydrogen exchange of bovine plasma albumin in the range of pH 5 to 8.5 / E. S. Benson, B. E. Hallaway // *J. Biol. Chem.* – 1970. – V. 245. – P. 4144–4149.
80. Hvidt, A. A. Conformational changes in human serum albumin as revealed by hydrogen-deuterium exchange studies / A. A. Hvidt, K. Wallevik // *J. Biol. Chem.* – 1972. – V. 247. – P. 1530–1535.
81. Lakovicz, J. R. Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale / J. R. Lakovicz, G. Weber // *Biochemistry*. – 1973. – V. 12. – P. 4171–4179.
82. Weber, G. Ligand interactions in globular proteins / G. Weber // In *Protein-Ligand Interactions*, ed. by Sund H., Blauer G., Berlin. – 1975. – P. 15–25.

83. Munro, I. Subnanosecond motions of tryptophan residues in proteins / I. Munro, I. Pecht, L. Stryer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1979. – V. 76. – P. 56–60.
84. Ueda, Y. Theory of large-amplitude conformational fluctuations in native globular proteins / Y. Ueda, N. Go // *Int. J. Pep. Protein Res.* – 1976. – V. 8. – P. 551–558.
85. Boyer, P. D. The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin. II. Stabilization against urea and guanidine denaturation / P. D. Boyer, G. A. Ballou, J. M. Luck // *J. Biol. Chem.* – 1946. – V. 162. – P. 199–208.
86. Brandt, J. Heat denaturation of human serum albumin. Migration of bound fatty acids / J. Brandt, L.-O. Andersson // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1976. – V. 8. – P. 33–37.
87. Gumpen, S. Thermal stability of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry / S. Gumpen, P. O. Hegg, H. Martens // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – V. 574. – P. 189–196.
88. Therriault, D. G. Dimerization of serum albumin on extraction with an organic solvent / D. G. Therriault, J. F. Taylor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1960. – V. 3. – P. 560–565.
89. Lovrien, R. Interaction of dodecyl sulfate anions of low concentration with alkaline bovine serum albumin / R. Lovrien // *J. Am. Chem. Soc.* – 1963. – V. 85. – P. 3677–3682.
90. Markus, G. Mechanism of protection by anionic detergents against denaturation of serum albumin / G. Markus, R. L. Love, F. C. Wissler // *J. Biol. Chem.* – 1964. – V. 239. – P. 3687–3693.
91. Reynolds, J. A. The binding of diverse detergent anions to bovine serum albumin / J. A. Reynolds, S. Herbert, H. Polet, J. Steinhardt // *Biochemistry.* – 1967. – V. 6. – P. 937–947.
92. Ryan, M. T. Influence of steroid binding on the tryptic hydrolysis of serum albumin / M. T. Ryan // *Biochemistry.* – 1973. – V. 12. – P. 2221–2230.
93. Markus, G. Protein substrate conformation and proteolysis / G. Markus // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1965. – V. 54. – P. 253–258.

94. Markus, G. Ligand-stabilized conformations in serum albumin / G. Markus, D. K. McClintock, B. A. Castellani // *J. Biol. Chem.* – 1967. – V. 242. – P. 4402–4408.
95. Weinbach, E. C. Structural changes in mitochondria induced by uncoupling reagents / E. C. Weinbach, J. Garbus // *Biochem. J.* – 1968. – V. 106. – P. 711–717.
96. King, T. P. Limited pepsin digestion of bovine plasma albumin / T. P. King // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1973. – V. 156. – P. 509–520.
97. Katz, S. Protein-ionic detergent interaction. Volume and electrophoretic changes produced by sodium dodecyl sulfate reaction with bovine serum albumin / S. Katz, M. E. Shaw, S. Chillag, J. E. Miller // *J. Biol. Chem.* – 1972. – V. 247. – P. 5228–5233.
98. Katz, S. Protein-metal ion interaction: Volume effects produced by the interaction of proteins with metal ions / S. Katz, L. C. Roberson // *Bioinorg. Chem.* – 1976. – V. 6. – P. 143–154.
99. Katz, S. Structure-volume relationships: Singular volume effects produced by cupric ion-globular protein interaction / S. Katz, R. G. Shinaberry, E. L. Heck, W. Squire // *Biochemistry.* – 1980. – V. 19. – P. 3805–3813.
100. Reynolds, F. H. A calorimetric investigation of the copper-bovine plasma albumin interaction / F. H. Reynolds, R. K. Burkhard, D. D. Mueller // *Biochemistry.* – 1973. – V. 12. – P. 359–364.
101. Karush F. Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin / F. Karush // *J. Am. Chem. Soc.* – 1950. – V. 72. – P. 2705–2713.
102. Linderstrom-Lang, K. U. Protein structure and enzyme activity / K. U. Linderstrom-Lang, J. A. Schellman // *In The Enzymes*, 2nd ed., ed. by Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K. Academic Press, New York. – 1959. – V. 1. – P. 443–510.
103. Adams, P. A. Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin / P. A. Adams, M. C. Berman // *Biochem. J.* – 1980. – V. 191. – P. 95–102.

104. Mishra, P. P. Effect of increased hydrophobicity on the binding of two model amphiphilic chlorin drugs for photodynamic therapy with blood plasma and its components / P. P. Mishra, S. Patel, A. Datta // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110. – P. 21238–21244.
105. Wasan, K. M. Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: Implications for drug discovery / K. M. Wasan, D. R. Brocks, S. D. Lee, K. Sachs-Barrable, S. J. Thornton // *Nature Rev. Drug Discov.* – 2008. – V. 7. – P. 84–99.
106. De-Smidt, P. C. Properties of incorporation, redistribution, and integrity of porphyrin-low-density lipoprotein complexes / P. C. De-Smidt, A. J. Versluis, T. J. Van-Berkel // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – No. 11. – P. 2916–2922.
107. Beltramini, M. Steady-state and time-resolved spectroscopic studies on the hematoporphyrin-lipoprotein complex / M. Beltramini, P. A. Firey, F. Ricchelli, M. A. J. Rodgers, G. Jori // *Biochemistry.* – 1987. – V. 26. – No. 21. – P. 6852–6858.
108. Cohen, S. Binding of porphyrin to human serum albumin. Structure-activity relationships / S. Cohen, R. Margalit // *Biochem. J.* – 1990. – V. 270. – No. 2. – P. 325–330.
109. Ricchelli, F. Photosensitization of mitochondria by liposome-bound porphyrins / F. Ricchelli, S. Gobbo, G. Jori, G. Moreno, F. Vinzens, C. Salet // *Photochem. Photobiol.* – 1993. – V. 58. – No. 1. – P. 53–58.
110. Ricchelli, F. Distribution of porphyrins in the various compartments of unilamellar liposomes of dipalmitoyl-phosphatidylcholine as probed by fluorescence spectroscopy / F. Ricchelli, G. Jori // *Photochem. Photobiol.* – 1986. – V. 44. – No. 2. – P. 151–157.
111. Kongshaug, M. The distribution of porphyrins with different tumour localising ability among human plasma proteins / M. Kongshaug, J. Moan, S. B. Brown // *Br. J. Cancer.* – 1989. – V. 59. – P. 184–188.

112. Kongshaug, M. Distribution of tetrapyrrole photosensitizers among human plasma proteins / M. Kongshaug // *Int. J. Biochem.* – 1992. – V. 24. – P. 1239–1265.
113. Cunderlikova, B. Increased binding of chlorin e(6) to lipoproteins at low pH values / B. Cunderlikova, M. Kongshaug, L. Gangeskar, J. Moan // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2000. – V. 32. – P. 759–768.
114. Huang, J.-D. Halogenated silicon(IV) phthalocyanines with axial poly(ethylene glycol) chains. Synthesis, spectroscopic properties, complexation with bovine serum albumin and in vitro photodynamic activities / J.-D. Huang, S. Wang, P.-C. Lo, W.-P. Fong, W.-H. Kod, D. K. P. Ng // *New J. Chem.* – 2004. – V. 28. – P. 348–354.
115. Bardos-Nagy, I. Effect of trehalose in low concentration on the binding and transport of porphyrins in liposome-human serum albumin system / I. Bardos-Nagy, R. Galantai, J. Fidy // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – V. 1512. – P. 125–134.
116. Gal, D. Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. III. Low-density lipoprotein metabolism / D. Gal, P. C. MacDonald, J. C. Porter, E. R. Simpson // *Int. J. Cancer.* – 1981. – V. 28. – No. 3. – P. 315–319.
117. Kongshaug, M. Hematoporphyrin diethers-V. Plasma protein binding and photosensitizing efficiency / M. Kongshaug, C. Rimington, J. F. Evensen, Q. Peng, J. Moan // *Int. J. Biochem.* – 1990. – V. 22. – No. 10. – P. 1127–1131.
118. Nakajima, S. Tumor-localizing activity of porphyrin and its affinity to LDL, transferrin / S. Nakajima, T. Takemura, I. Sakata // *Cancer Lett.* – 1995. – V. 92. – No. 1. – P. 113–118.
119. Gullino, P. M. Modifications of the acid-base status of the internal milieu of tumors / P. M. Gullino, F. H. Grantham, S. H. Smith, A. C. Haggerty // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1965. – V. 34. – P. 857–869.
120. Wike-Hooley, J. L. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease / J. L. Wike-Hooley, J. Haveman, H. S. Reinhold // *Radiother. Oncol.* – 1984. – V. 2. – P. 343–366.

121. Thistlethwaite, A. J. pH distribution in human tumors / A. J. Thistlethwaite, D. B. Leeper, D. J. Moylan III, R. E. Nerlinger // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1985. – V. 11. – P. 1647–1652.
122. Tannock, I. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation / I. F. Tannock, D. Rotin // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49. – P. 4373–4384.
123. Moan, J. Photodynamic effects on human cells exposed to light in the presence of hematoporphyrin. pH effects / J. Moan, L. Smedshammer, T. Christensen // *Cancer Lett.* – 1980. – V. 9. – P. 327–332.
124. Cunderlikova, B. Acid-base properties of chlorine e6: relation to cellular uptake / B. Cunderlikova, L. Gangeskar, J. Moan // *J. Photochem. Photobiol., B Biol.* – 1999. – V. 53. – P. 81–90.
125. Thomas, J. P. Glucose administration augments in vivo uptake and phototoxicity of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative / J. P. Thomas, A. W. Girotti // *Photochem. Photobiol.* – 1989. – V. 49. – P. 241–247.
126. Kuzelova, K. Interactions of dicarboxylic porphyrins with unilamellar lipidic vesicles: drastic effects of pH and cholesterol on kinetics / K. Kuzelova, D. Brault // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 11245–11255.
127. Ho, Y. K. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells / Y. K. Ho, R. G. Smith, M. S. Brown, J. L. Goldstein // *Blood.* – 1978. – V. 52. – P. 1099–1114.
128. Gal, D. Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms / D. Gal, M. Ohashi, P. C. MacDonald, H. J. Buchsbaum, E. R. Simpson // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1981. – V. 139. – P. 877–885.
129. Mojziso,va, H. The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: A physico-chemical approach / H. Mojziso,va, S. Bonneau, C. Vever-Bizet, D. Brault // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – V. 1768. – P. 366–374.

130. Martins, J. Photoactivation of phthalocyanine-loaded low density lipoproteins induces a local oxidative stress that propagates to human erythrocytes: Protection by caffeic acid / J. Martins, V. Madeira, L. Almeida, J. Laranjinha // *Free Radic. Res.* – 2002. – V. 36. – P. 319–328.
131. Bohmer, R. M. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature, and cell size / R. M. Bohmer, G. Morstyn // *Cancer Res.* – 1985. – V. 45. – P. 5328–5334.
132. Yuan, F. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size / F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin, R. K. Jain // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – P. 3752–3756.
133. Beaven, G. H. A spectroscopic study of the haemin-human-serum-albumin system / G. H. Beaven, S.-H. Chen, A. D'Albis, W. D. Gratzer // *Eur. J. Biochem.* – 1974. – V. 41. – P. 539–546.
134. Jacobsen, C. Trinitrophenylation of the bilirubin binding site of human serum albumin / C. Jacobsen // *Int. J. Pept. Protein. Res.* – 1975. – V. 7. – P. 159–163.
135. Hrkal, Z. Haeme binding to human serum albumin and to the three large cyanogen bromide albumin fragments / Z. Hrkal, M. Kodicek, Z. Vodrazka, B. Meloun, L. Moravek // *Int. J. Biochem.* – 1978. – V. 9. – P. 349–355.
136. Wardell, M. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å / M. Wardell, Z. Wang, J. X. Ho, J. Robert, F. Ruker, J. Ruble, D. C. Carter // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V. 291. – No. 4. – P. 813–819.
137. Zunszain, P. A. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid / P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry // *BMC Structural Biology.* – 2003. – V. 3:6.
138. Reddi, E. Interaction of human serum albumin with hematoporphyrin and its Zn(2)+- and Fe(3)+-derivatives / E. Reddi, F. Ricchelli, G. Jori // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1981. – V. 18. – P. 402–408.

139. Dockal, M. The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties / M. Dockal, D. C. Carter, F. Ruker // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 29303–29310.
140. Curry, S. Fatty acid binding to human serum albumin: New insights from crystallographic studies / S. Curry, P. Brick, N. P. Franks // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1441. – P. 131–140.
141. Bhattacharya, A. A. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin / A. A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 303. – P. 721–732.
142. Curry, S. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites / S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks // *Nature Structural Biology.* – 1998. – V. 5. – P. 827–835.
143. Patel, S. Steady state and time-resolved fluorescence investigation of the specific binding of two chlorin derivatives with human serum albumin / S. Patel, A. Datta // *J. Phys. Chem. B.* – 2007. – V. 111. – P. 10557–10562.
144. Ольшевская, В. А. Синтез борированных производных феофорбида а / В. А. Ольшевская, А. В. Зайцев, А. Н. Савченко, Е. Г. Кононова, П. В. Петровский, В. Н. Калинин // *Доклады академии наук.* – 2008. – Т. 423. – № 3. – С. 345–349.
145. Ольшевская, В. А. Новые борированные производные пурпурина-18: Синтез и взаимодействие с сывороточным альбумином / В. А. Ольшевская, А. Н. Савченко, Г. В. Головина, В. В. Лазарев, Е. Г. Кононова, П. В. Петровский, В. Н. Калинин, А. А. Штиль, В. А. Кузьмин // *Доклады РАН.* – 2010. – Т. 435. – № 5. – С. 633–639.
146. Brandis, A. S. Synthesis and study of chlorin and porphyrin dimmers with ether linkage / A. S. Brandis, A. N. Kozyrev, A. F. Mironov // *Tetrahedron.* – 1992. – V. 48. – No. 31. – P. 6485–6494.

147. Stroganov, O. V. TSAR, a new graph–theoretical approach to computational modeling of protein side-chain flexibility: Modeling of ionization properties of proteins / O. V. Stroganov, F. N. Novikov, A. A. Zeifman, V. S. Stroylov, G. G. Chilov // *Proteins*. – 2011. – V. 79. – No. 9. – P. 2693–2710.
148. Stroganov, O. V. Lead finder: An approach to improve accuracy of protein–ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening / O. V. Stroganov, F. N. Novikov, V. S. Stroylov, V. Kulkov, G. G. Chilov // *J. Chem. Inf. Model.* – 2008. – V. 48. – No. 12. – P. 2371–2385.
149. Abagyan, R. ICM, a new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation / R. Abagyan, M. Totrov, D. Kuznetsov // *J. Comput. Chem.* – 1994. – V. 15. – P. 488–506.
150. Schmidt, M. W. General atomic and molecular electronic structure system / M. W. Schmidt, K. K. Baldridge, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. Su, T. L. Windus, M. Dupuis, J. A. Montgomery // *J. Comp. Chem.* – 1993. – V. 14. – No. 11. – P. 1347–1363.
151. Huzinaga, S. Gaussian basis sets for molecular calculations / S. Huzinaga, J. Andzelm, M. Klobukowski, E. Radzio-Andzelm, Y. Sakai, H. Tatewaki // Elsevier, Amsterdam. – 1984.
152. Roothaan, C. C. J. New developments in molecular orbital theory / C. C. J. Roothaan // *Rev. Modern Phys.* – 1951. – V. 23. – No. 2. – P. 69.
153. Totrov, M. Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates / M. Totrov, R. Abagyan // *Proteins*. – 1997. – V. Suppl 1. – P. 215–220.
154. Abagyan, R. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins / R. Abagyan, M. Totrov // *J. Mol. Biol.* – 1994. – V. 235. – No. 3. – P. 983–1002.

155. Totrov, M. Rapid boundary element solvation electrostatics calculations in folding simulations: Successful folding of a 23-residue peptide / M. Totrov, R. Abagyan // *Peptide Sci.* – 2001. – V. 60. – No. 2. – P. 124–133.
156. Головина, Г. В. Роль кислотности среды в комплексообразовании пиррофеофорбида а с альбумином и липопротеинами / Г. В. Головина, В. А. Ольшевская, В. Н. Калинин, А. А. Штиль, В. А. Кузьмин // *Биоорганическая химия.* – 2011. – Т. 37. – № 5. – С. 718–720.
157. Гринвуд, Н. Химия элементов / Н. Гринвуд, А. Эрншо // Пер. с англ. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний. – 2008. – С. 480–536.
158. Головина, Г.В. Константы комплексообразования Zn-, Ni- и Pd-производных пурпурина-18 с сывороточным альбумином / Г. В. Головина, Ф. Н. Новиков, В. А. Ольшевская, В. Н. Калинин, А. А. Штиль, В. А. Кузьмин // *Журнал физической химии.* – 2012. – Т. 86. – № 11. – С. 1887–1889.
159. Golovina, G.V. Differential binding preference of methylpheophorbide a and its diboronated derivatives to albumin and low density lipoproteins / G. V. Golovina, G. N. Rychkov, V. A. Ol'shevskaya, A. V. Zaitsev, V. N. Kalinin, V. A. Kuzmin, A. A. Shtil // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* – 2013. – V. 13. – No. 4. – P. 639–646.
160. Ascenzi, P. Serum heme-albumin: An allosteric protein / P. Ascenzi, M. Fasano // *IUBMB Life.* – 2009. – V. 61. – No. 12. – P. 1118–1122.