

На правах рукописи



**Головина Галина Владимировна**

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
С АЛЬБУМИНОМ И ЛИПОПРОТЕИНАМИ**

02.00.04 – физическая химия

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2014 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН)

**Научный руководитель:**

доктор химических наук, профессор  
**Кузьмин Владимир Александрович**

**Официальные оппоненты:**

доктор физико-математических наук, профессор  
**Олейников Владимир Александрович**, заведующий лабораторией молекулярной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

доктор химических наук, профессор  
**Горбунова Юлия Германовна**, заведующая сектором химии металлокомплексных супрамолекулярных систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

Защита диссертации состоится 19 ноября 2014 г. в 13:30 на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук и на сайте <http://ibcp.chph.ras.ru/2014/>.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
Д 002.039.01,  
кандидат химических наук



Мазалецкая Л.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Фотодинамическая терапия (ФДТ) и борнейтронозахватная терапия (БНЗТ) являются перспективными методами лечения онкологических заболеваний. Терапевтический эффект основан на индуцировании реакционноспособных частиц в ответ на действие света или тепловых нейтронов на очаг поражения, содержащий фото/радиосенсибилизатор (ФС/РС). Эти частицы вызывают гибель опухолевых клеток.

Важнейшим критерием эффективности ФС/РС является его взаимодействие с компонентами плазмы крови – альбумином (человеческий сывороточный альбумин, ЧСА) и липопротеинами низкой плотности (ЛНП) – переносчиками многих лекарственных препаратов. Связывание ФС/РС с ЧСА и ЛНП может определяться различными факторами, например, наличием заместителей в молекуле сенсибилизатора, природой металла, рН среды и др.

Особый интерес представляют ФС/РС, содержащие борные полиэдры. В случае БНЗТ тетрапиррольный фрагмент определяет преимущественное накопление препарата в опухоли, тогда как карборан обеспечивает необходимую концентрацию бора в клетке. Получены данные об улучшении противоопухолевых характеристик ФС, несущих борные полиэдры, по сравнению с их неборированными аналогами, и для ФДТ.

Объемные карборановые группы могут затруднять взаимодействие ФС/РС с ЧСА за счет возникающих стерических препятствий. Тем не менее, высокое сродство ФС/РС к ЛНП способно компенсировать такой 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.

В качестве перспективных ФС для ФДТ нашли свое применение металлокомплексы тетрапиррольных соединений. Так, исследовано связывание ЧСА и безметального пурпурина-18, однако введение металла в

его молекулу может оказывать влияние на величину константы связывания, что, в свою очередь, обуславливает тот или иной фотодинамический эффект.

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 ФС с ЧСА и ЛНП – актуальная проблема.

**Цель работы** – изучение влияния заместителей, природы металла и рН среды на комплексообразование потенциальных ФС/РС с ЧСА и ЛНП физико-химическими методами.

**Объектом** наших исследований являлись потенциальные ФС/РС: Zn-, Ni- и Pd-производные пурпурина-18; метилфеофорбид *a* и два его диборированных аналога; пирофеофорбид *a* (ПФФ, в качестве ФС широко применяются производные ПФФ).

**Предметом** исследований являлись количественные изменения параметров связывания испытуемых ФС/РС с белками ЧСА и ЛНП под влиянием заместителей в их молекулах, природы металла или рН среды.

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-кклозо-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).

**Публикации.** Материалы диссертационной работы опубликованы в 5 статьях и 5 тезисах докладов на международных научных конференциях и симпозиуме.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка используемых сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 160 источников. Диссертация иллюстрирована 8 таблицами, 31 рисунком и 2 схемами, объем – 100 страниц печатного текста.

**Личный вклад автора.** Диссертантом выполнен весь объем физико-химических исследований, полностью проанализирован весь массив полученных данных по физико-химическому анализу и компьютерному моделированию, сформулированы общие положения, выносимые на защиту, и выводы.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснованы актуальность темы работы, выбор объектов исследования; сформулирована основная цель и задачи; обозначены научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту.

**Глава I. Литературный обзор.** Первая глава посвящена обзору имеющихся литературных данных о фотодинамической и борнейтронозахватной терапии, основных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии, роли белков при распределении и накоплении фотосенсибилизаторов в тканях, процессах взаимодействия фотосенсибилизаторов с белками ЧСА и ЛНП.

**Глава II. Материалы и методы исследования.** Вторая глава содержит описание экспериментальных методик и методы обсчета. Константы связывания  $K_C$  определяли из кривых связывания по уравнению:

$$\theta = \frac{K_C \times [\text{Белок}]}{1 + K_C \times [\text{Белок}]}$$
, где [Белок] – концентрация ЧСА или ЛНП, а  $\theta$  – доля связанных с белком испытуемых соединений, равная  $(A - A_0) / (A_\infty - A_0)$ .  $A_0$ ,  $A_\infty$  и  $A$  – поглощение соединения при нулевом, полном и промежуточном связывании с белком, соответственно, измеренное в максимуме Q-полосы.

Спектры поглощения были получены на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 PC, флуоресценции – на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC; времена жизни флуоресценции – на флуорометре Fluo Time 200 (PicoQuant). Спектрально-кинетические характеристики триплетного состояния исследовались с помощью установки лазерного фотолиза LKS80 (applied Phtophysics, UK); данные обрабатывались в программе Pro-Data Viewer version 4.2.5.

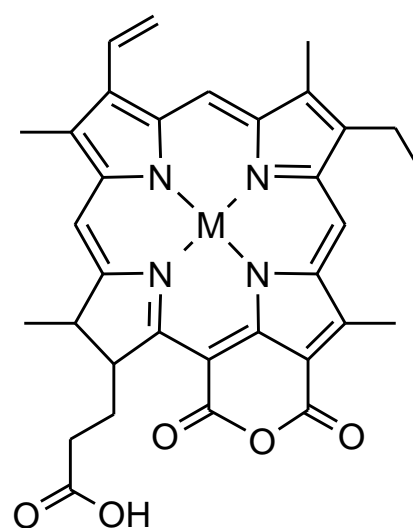
Для моделирования координации металлопурпурина-18 с ЧСА использовался метод молекулярного докинга, реализованный в программе Lead Finder. Полноатомная модель трехмерной структуры белка была подготовлена при помощи программы Build Model.

Для определения вариантов связывания (4)–(6) с ЧСА и оценки возможности их встраивания в «глобиновый» карман белка проводилась процедура «гибкого» докинга в пакете Molsoft ICM Pro 3.6. Грубые пространственные модели молекул (4)–(6) построены с использованием программ Molsoft ICM 3.6 и Avogadro 1.0.3, оптимизация их структуры проведена в программе Gamess US. Моделью ЧСА служила пространственная структура 1N5U из банка данных PDB.

При расчете свободной энергии связывания учитывались только вклады электростатической и гидрофобной составляющих, а также энтропийный вклад боковых цепей аминокислот белка. Электростатическую составляющую рассчитывали методом REBEL. Оценка гидрофобной составляющей каждого атома ЧСА проводилась на основе предположения о ее линейной пропорциональности поверхности атома, доступной растворителю. Потеря конфигурационной энтропии боковых цепей аминокислот белка при связывании с (4)–(6) проводилась на основе табулированных данных о ее максимально возможных величинах для каждого аминокислотного остатка.

### Глава III. Результаты исследования. Рисунок 1. Структура (1)–(3).

В третьей главе представлены результаты взаимодействия ФС с белками ЧСА и ЛНП. Взаимодействие Zn-, Ni- и Pd-пурпуринов-18 (соединения (1), (2) и (3), соответственно, рисунок 1) 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. 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  $\text{Pd}^{2+}$  характерно плоско-квадратное строение его комплекса, которое и реализуется в тетрапирроле. Расщепление же d-подуровня  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  в поле лигандов не столь велико, что приводит к образованию октаэдра и квадратной пирамиды, соответственно. Таким образом, в пурпурине эти два иона должны координировать дополнительные лиганды, что обуславливает сродство их молекул друг к другу, проявляющееся в агрегации.

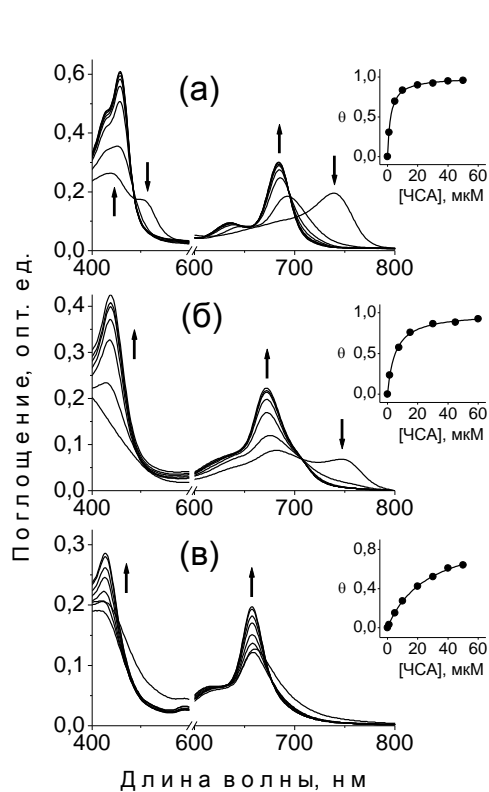
Добавление ЧСА к буферным растворам (1)–(3) приводило к разрушению агрегированных структур (1) и (2) и к трансформации спектров поглощения всех испытуемых соединений (рисунок 2). По данным изменения спектров поглощения построены кривые связывания (рисунок 2) и рассчитаны константы связывания (таблица 1). 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 (рисунок 3). Однако координационная насыщенность  $\text{Pd}^{2+}$  в составе комплекса с пурпурином-18 препятствует взаимодействию этого металла с кислородом тирозина, тогда как ионы  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  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.

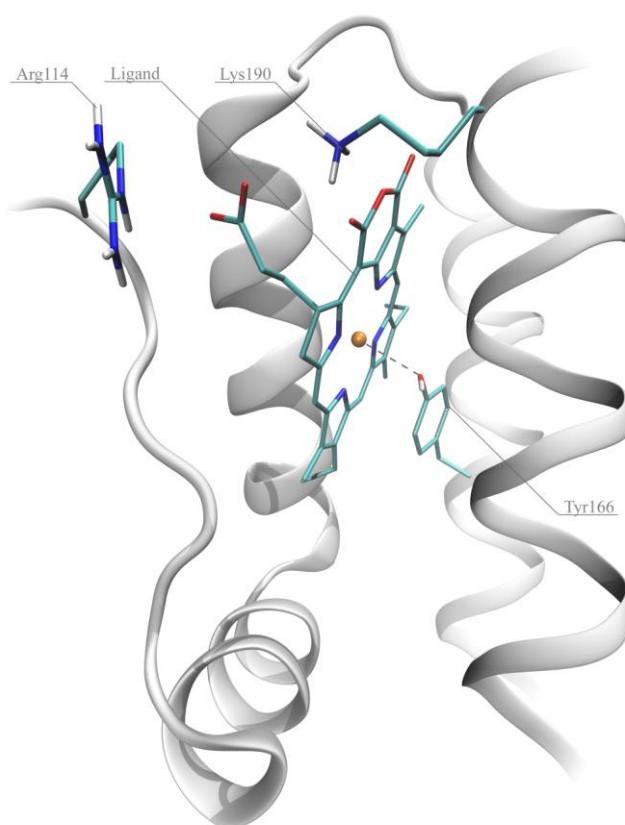
Для исследования спектрально-кинетических характеристик триплетного состояния металл-пурпуринов нами было взято соединение (2). При фотовозбуждении лазерным импульсом тетрапиррола в этаноле

происходит заселение триплетного состояния соединения. Спектр Т-Т поглощения представляет собой структурную полосу с поглощением в области 430-480 нм; в полосе Core и Q-полосе наблюдается фотовыцветание.

Добавление кислорода к образцу соединения (2) в этаноле оказывало воздействие на кинетику гибели триплетного состояния (2). В таблице 2 приведены константы скорости псевдопервого порядка гибели триплетного состояния  $k$  для системы в отсутствие кислорода, насыщенной кислородом воздуха и чистым кислородом. По данным таблицы построен график (рисунок 4). 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.



**Рисунок 2.** Спектры поглощения *a*: (1), *б*: (2), *в*: (3) ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) 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.



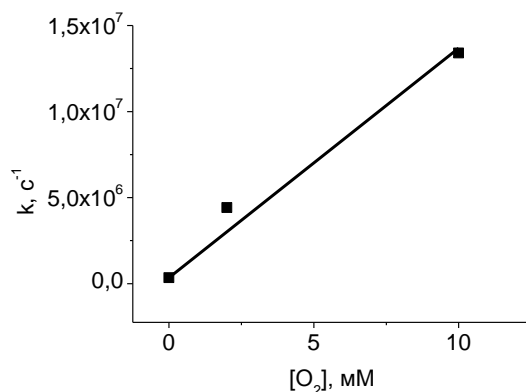
**Рисунок 3.** Структура металлокомплекса пурпурина-18 с альбумином, предсказанная методом молекулярного докинга.

**Таблица 1.**  $K_C$  (1)–(3) с ЧСА

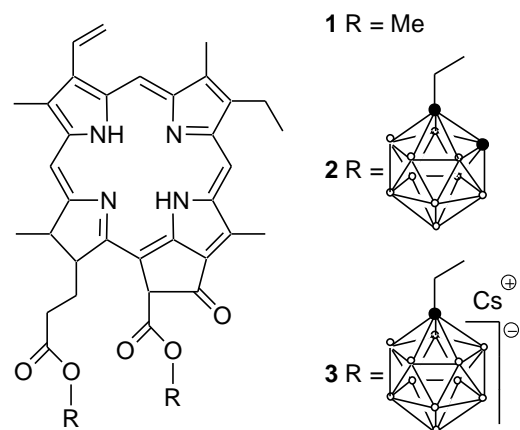
Соединение	$K_C, M^{-1}$
(1)	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^5$
(2)	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^5$
(3)	$(3.7 \pm 0.2) \times 10^4$

**Таблица 2.**  $k$  для систем с различной  $[O_2]$ 

$[O_2], mM$	$k, c^{-1}$
0	$3.5 \times 10^5$
2	$4.4 \times 10^6$
10	$1.3 \times 10^7$

**Рисунок 4.** Зависимость  $k$  (2) от концентрации кислорода.

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-клезо-додекаборан-1-ил) метоксикарбонил]феофорбид **a** (6) (рисунок 5) – с ЧСА проводилось спектрометрическими методами и компьютерным моделированием при помощи «гибкого» докинга. Взаимодействие (4)–(6) с ЛНП было исследовано спектрометрическими методами.

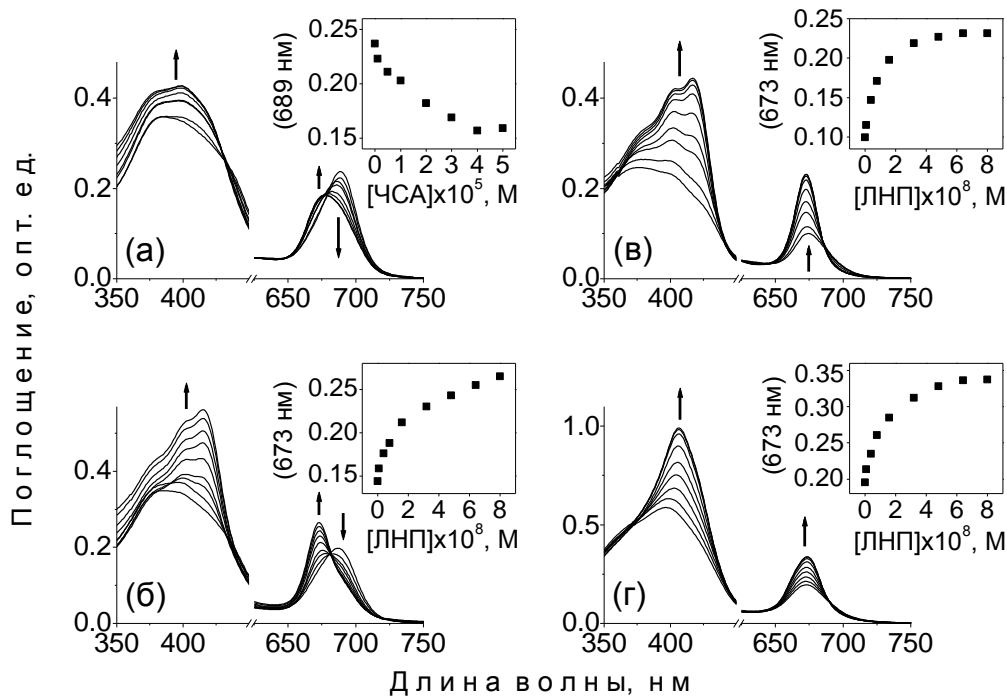
**Рисунок 5.** Структура 1: (4), 2: (5) и 3: (6).

Добавление ЧСА к водному буферному раствору, pH 7.0, соединения (4) приводило к трансформации спектров поглощения (4) (рисунок 6, а). Наблюдалось увеличение оптической плотности полосы Sore 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. Константа связывания  $K_C$  для комплекса (4) с ЧСА составила  $5 \times 10^4 M^{-1}$ . 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 6, 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 6, в, г).

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



**Рисунок 6.** Спектры поглощения (4) в присутствии ЧСА ( $0 - 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , а) и (4), (5) и (6) в присутствии ЛНП ( $0 - 8 \times 10^{-8} \text{ M}$ , б, в, г, соответственно). Вставки: изменение поглощения при добавлении белков, измеренное на определенной длине волны.

комплексообразование осуществляется за счет липофильных свойств ФС/РС. Другими словами, имеет место разделение ФС/РС между водной и протеиновой фазами.

В ЧСА сайт связывания для гемоподобных структур представляет собой узкую и достаточно глубокую впадину на поверхности субдомена IV, которая сформирована в основном гидрофобными остатками аминокислот. Большинство позиций (4), найденных по результатам докинга, находятся внутри сайта связывания (рисунок 7А). Именно такие позиции (4) обладают наиболее низкой свободной энергией связывания  $E_C$  и являются наиболее вероятными. В отличие от (4), соединения (5) и (6) располагаются у входа в сайт (рисунок 7Б; (6) не показано). Две массивные боковые группы, представленные карбораном в нейтральной/заряженной форме, не способны одновременно разместиться на его входе. Таким образом, из всех исследованных соединений наиболее эффективно с ЧСА связывается (4).

Относительные величины  $E_C$  и ее составляющих наиболее вероятной конформации (4)–(6) с ЧСА представлены в таблице 3. Основной стабилизирующий вклад в суммарную энергию связывания вносится гидрофобной составляющей. Электростатическая же составляющая несколько дестабилизирует связывание. 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.

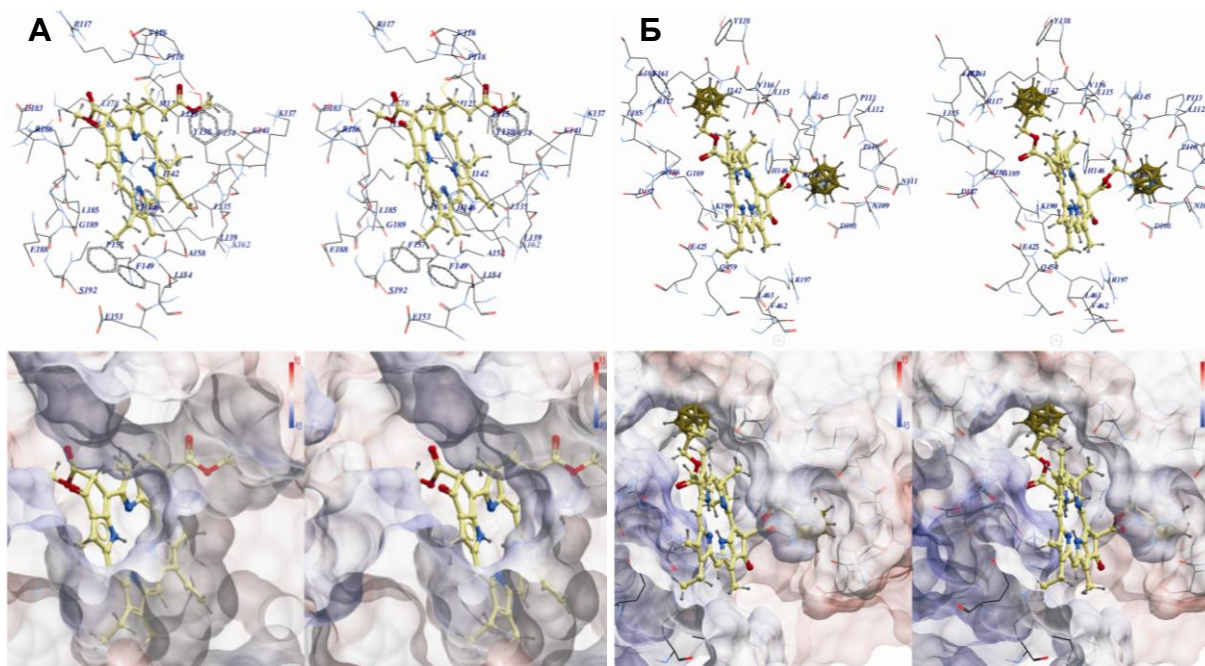


Рисунок 7. Конформации А, (4) и В, (5) с наименьшей свободной энергией связывания.

Таблица 3.  $E_C$  наиболее вероятной конформации (4)–(6) с ЧСА

Соединение	$E_C$ , ккал/моль			
	Гидрофобная	Электростатическая	Потеря энтропии	Суммарная
(4)	-15.6	1.2	2.6	-11.8
(5)	-17.5	2.2	5.4	-9.9
(6)	-14.5	1.1	4.7	-8.7

Следует отметить, что борирование не всегда отрицательно сказывается на взаимодействии ФС-ЧСА. Показано, что введение одного карборана в молекулу метилфеофорбида *a* – 13(2)-[(1-карба-клозо-додекаборан-1-ил)метоксикарбонил]феофорбид *a* метиловый эфир, соединение (7) – не только не препятствует такому взаимодействию, а, напротив, способно усиливать его.

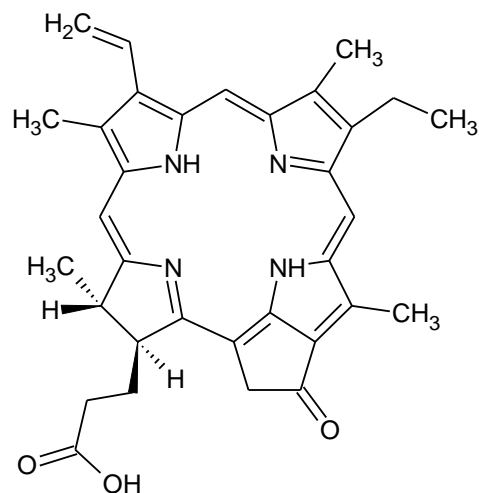
В другой нашей работе было показано усиление связывания производного хлорина еб (хлорин еб 13(1)-N-(2-аминоэтиламид-15(2),17(3)-диметиловый эфир, (8)) с ЧСА в 4 раза при введении одного карборана в его макроцикл (хлорин еб 13(1)-N-(2-(N-(1-о-карборанил)метил)аминоэтил)амид-15(2),17(3)-диметиловый эфир, (9)). 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 образца –  $10^{-5}$  М) при добавлении ЧСА ( $0 - 5 \times 10^{-5}$  М); интенсивность флуоресценции возрастала с увеличением концентрации ЧСА.

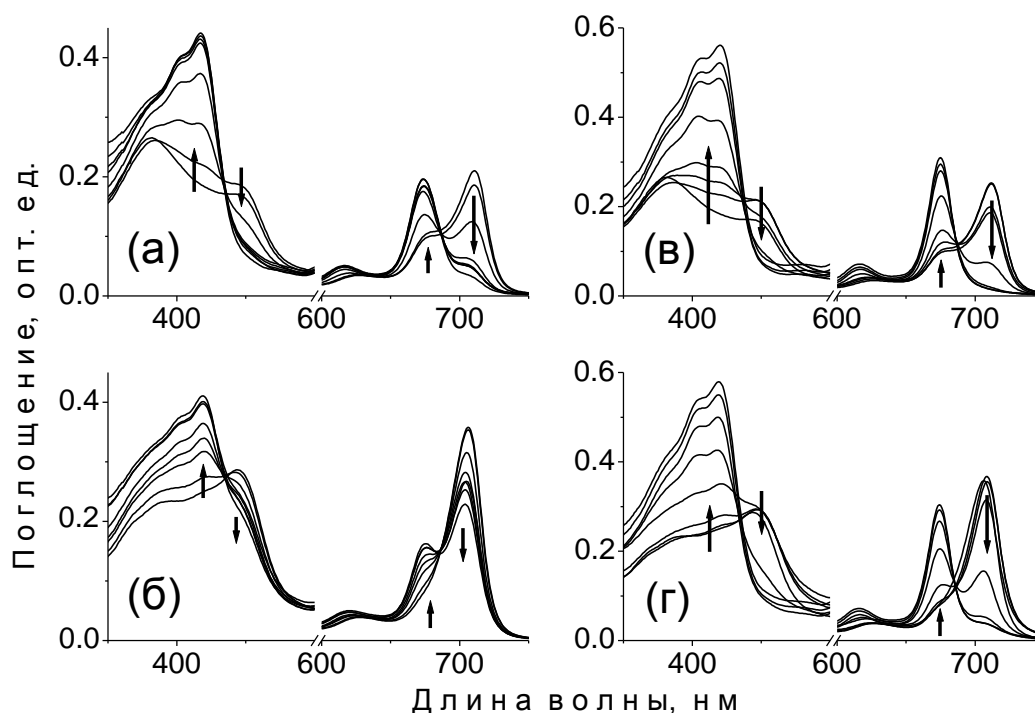
Итак, установлено, что введение в молекулу (4) двух объемных заместителей карборанов приводит к стерическим препятствиям при взаимодействии с сайтом связывания ЧСА, но не влияет существенным образом на сродство к ЛНП. Таким образом, распределение и доставка дикарборан-содержащих ФС/РС (5), (6) может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

Взаимодействие пиррофеофорбида *a* (ПФФ, соединение (10), рисунок 8) 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; добавление этанола к водным растворам агрегированных соединений вызывает их дезагрегацию, проявляющуюся в исчезновении полосы агрегатов и появлении максимума поглощения мономерной формы. 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 8.** Пиррофеофорбид *a*.

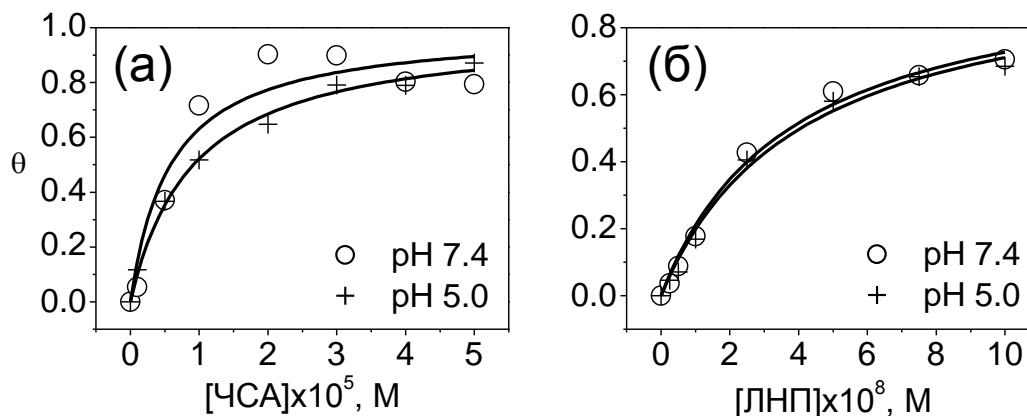


Добавление ЧСА и ЛНП к раствору ПФФ сопровождалось дезагрегацией и образованием мономеров ПФФ в комплексе с белком. В спектрах поглощения наблюдалось падение абсорбционного максимума ПФФ в области 710 нм и возрастание поглощения при 674 нм (рисунок 9). Напротив, малые количества ЛНП ( $\leq 5 \times 10^{-9}$  М) приводили к возрастанию полосы агрегатов ПФФ. ЛНП способны связывать ФС как в мономерной, так и в агрегированной формах. 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. 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.



**Рисунок 9.** Спектры поглощения ПФФ 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.





**Рисунок 10.** Кривые связывания ПФФ с ЧСА (а) и с ЛНП (б), рН среды 7.4 (1) и 5.0 (2).

Связывание с ЧСА ослабевает, а с ЛНП возрастает с увеличением гидрофобности ФС. 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, 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, однако, привело к ослаблению связывания ПФФ с ЧСА в 1.5 раза (рисунок 10, таблица 4). 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.

Таким образом, реакция комплексообразования ПФФ с ЧСА более чувствительна к рН, чем взаимодействие ПФФ с ЛНП.

**Таблица 4.** Константы связывания ( $K_C$ ) ПФФ с белками

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

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. На основании изменений интенсивности флуоресценции (676 нм) построены кривые связывания. Константы связывания составили  $1.4 \times 10^5$  и  $8.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  при 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. Это может объясняться тем, что интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству неагрегированных молекул ФС, 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 ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). 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 5). Время жизни флуоресценции обусловлено природой микроокружения. Так, в мицеллярном окружении время жизни определяется доступностью соединения для контакта с водной фазой. Таким образом, было обнаружено, что в комплексе с ЧСА контакт ПФФ с водной фазой ограничен.

**Таблица 5.** Время жизни флуоресценции  $\tau$  ПФФ,  $\lambda_{ex}$  653 нм

Система	$\tau$ , нс
Этиловый спирт	6.4
Буфер	5.1
ЧСА	6.5

Наши исследования показали, что на связывание с ЧСА существенным образом влияют такие факторы, как наличие заместителей (как в координационной сфере молекулы тетрапиррола, так и на периферии) и pH среды. Однако при связывании данных соединений с ЛНП такие эффекты не наблюдались. Т.е. ни заместители (карбораны), ни pH не оказывали существенного влияния на комплексообразование ФС с данным белком. Наши исследования позволили предложить механизм распределения пиррофофорбида *a* и диборированных производных метилфофорбида *a*.

Изложение работы заканчивается **заключением и выводами.**

## **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 СООН-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 рН, чем взаимодействие ПФФ с ЛНП. Уменьшение рН (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.

#### **Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

1. 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. – No. 17. – P. 1297–1306.
2. 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 академии наук. – 2010. – Т. 435. – № 5. – С. 633–639.
3. Головина, Г. В. Роль кислотности среды в комплексообразовании пиррофеофорбида *a* 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.

4. 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.
5. 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.
6. Головина, Г. В. Изучение взаимодействия пирофеофорбида и его борированного производного с альбумином для оптимизации фотосенсибилизаторов / Г. В. Головина, В. А. Ольшевская, А. М. Виноградов, М. И. Коноваленко, В. Н. Лузгина, В. А. Кузьмин, А. А. Штиль // Сборник тезисов X Международной конференции по физической и координационной химии порфиринов и их аналогов. Иваново. – 2009. – С. 102.
7. Головина, Г. В. Спектральные исследования комплексообразования пирофеофорбида и его карборансодержащего производного с человеческим сывороточным альбумином и липопротеинами низкой плотности / Г. В. Головина, В. А. Кузьмин, В. А. Ольшевская // Сборник тезисов XXI Симпозиума «Современная химическая физика». Туапсе. – 2009.
8. Головина, Г. В. Взаимодействие новых фотосенсибилизаторов на основе борированных производных метилфеофорбида *a* с компонентами плазмы крови: человеческим сывороточным альбумином и липопротеинами низкой плотности / Г. В. Головина, А. Н. Савченко, В. А. Ольшевская, В. Н. Калинин, В. А. Кузьмин, А. А. Штиль // Сборник тезисов IX Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва. – 2009. – С. 64–67.
9. Головина, Г. В. Влияние металла в пурпурине-18 на процессы комплексообразования с человеческим сывороточным альбумином / Г. В.

Головина, В. А. Кузьмин, В. А. Ольшевская, А. Н. Савченко, В. Н. Калинин, А. А. Штиль // Сборник тезисов X Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва. – 2010. – С. 49–50.

10. Головина Г. В. Комплексообразование пирофосфорбида *a* с альбумином и липопротеинами в условиях различных рН / Г. В. Головина, В. А. Ольшевская, В. Н. Калинин, А. А. Штиль, В. А. Кузьмин // Сборник тезисов XI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва. – 2011. – С. 77–78.