

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ АНАЛИЗА КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

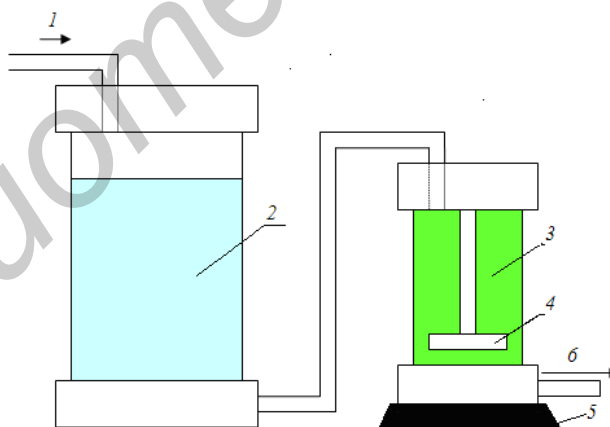
*И.И. Хлудеев, В.П. Зорин*

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Беларусь  
E-mail: ivan2khl@mail.ru*

**Abstract.** A modified technique of ultrafiltration for the study of the binding processes between photosensitizers with different physical and chemical properties and albumin was developed. Experimental data are in good agreement with a model in which the HSA macromolecule has one strong binding site for the derivatives of chlorine  $e_6$ . The contribution both hydrophobic and electrostatic interactions to the formation of complexes between the molecules of photosensitizer and protein is discussed.

Сывороточный альбумин является основным транспортным белком плазмы крови. Благодаря своей уникальной структуре сывороточный альбумин человека (САЧ) способен обратимо связывать и переносить в потоке крови различные лекарственные соединения, в том числе и тетрапиррольные фотосенсибилизаторы (ФС). Показано, что свойства молекул ФС и белка-носителя могут существенно влиять на характеристики накопления ФС в различных органах и тканях, в том числе – в злокачественных новообразованиях. Вследствие этого изучение параметров комплексообразования с САЧ имеет важное значение для прогнозирования фармакокинетического поведения ФС в организме.

В данной работе приведены результаты исследования параметров связывания с САЧ хлорина  $e_6$  (Хл  $e_6$ ) и ряда его этерифицированных производных – монометилового (ММЭ), диметилового (ДМЭ) и триметилового (ТМЭ) эфиров. Метод ультрафильтрации был модифицирован, что обеспечивало проведение эксперимента при неизменном объеме исследуемого образца, содержащего окрашенный ФС раствор САЧ (рис. 1).



1 - подача инертного газа под давлением 100 кПа, 2 – дополнительная емкость с фосфатным буфером, 3 – ультрафильтрационный модуль, заполненный раствором окрашенного сывороточного альбумина, с магнитным ротором (4), 5 – магнитная мешалка, 6 – фильтрат.

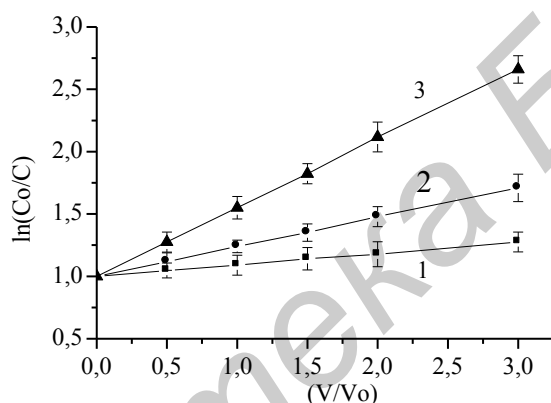
**Рисунок 1** – Схема модифицированной ультрафильтрационной установки

Использование полупроницаемой мембраны АЦ-50 (МИФИЛ, Беларусь) позволяет обеспечить поток элюента через измерительный модуль, при прохождении которого молекулы САЧ и связанные с ними молекулы ФС остаются внутри модуля, а молекулы несвязанного (свободного) ФС вымываются в составе фильтрата. Изменение концентрации ФС в образце внутри модуля при прохождении определенного объема элюента описывается уравнением

$$\ln(C_0/C) = V / (V_0 \times (1 + K \times \alpha)), \quad (1)$$

где  $C_0$  – начальная концентрация ФС в образце;  $C$  – концентрация ФС в образце после прохождения объема  $V$  элюента;  $V_0$  – объем образца (модуля);  $K \times \alpha$  – интегральный показатель связывания (ИПС), равный произведению  $K$  (коэффициента распределения ФС между фазами) и  $\alpha$  (относительного объема белковой фазы). Распределение ФС в образце между водной и белковой фазами происходит по механизму равновесного связывания и при достаточно низких относительных концентрациях ФС ( $C_B \gg C_{FC}$ ), поэтому в уравнении 1 параметру  $K$  соответствует константа связывания ( $K_C$ ), а параметру  $\alpha$  – концентрация мест связывания  $[N]$ . Построив зависимость  $\ln(C_0/C)$  от  $V/V_0$ , можно по тангенсу угла наклона кривой определить величину  $(1+K_C \cdot N)$  и вычислить значение ИПС.

Приведенные на рис.1 результаты экспериментов показывают, что кинетика изменения содержания производных Хл  $e_6$  в образцах в процессе ультрафильтрации хорошо описывается уравнением первого порядка, о чем свидетельствует линейность зависимости  $\ln(C_0/C)$  от удельного объема фильтрата, которая выполняется в широком диапазоне соотношений концентраций ФС и САЧ. Дополнительные исследования показали, что скорость вымывания не меняется при вариации концентрации ФС в образце, но линейно зависит от концентрации белка.



Концентрация САЧ в образце – 0,4 мг/мл, начальная концентрация ФС равна  $8 \times 10^{-7}$  моль/л.  
1 – Хл  $e_6$ , 2 – ДМЭ, 3 – ТМЭ.

**Рисунок 2** – Зависимости изменения содержания производных Хл  $e_6$  в растворе САЧ от удельного объема фильтрата в процессе ультрафильтрации

На основании полученных результатов можно рассчитать величину ИПС согласно уравнению 1. Для того, чтобы рассчитать значение константы связывания, необходимо дополнительно определить значение концентрации мест связывания на молекулах белка. Ранее для Хл  $e_6$  и ряда порфириновых соединений было показано, что в молекуле САЧ для них имеется только один центр связывания с высоким сродством [1]. Принимая в расчет структурное подобие Хл  $e_6$  и его производных можно предположить, что сказанное выше верно для всех хлоринов при используемых условиях эксперимента. При таком допущении концентрация мест связывания численно будет равна концентрации САЧ в образце, поэтому на основании результатов экспериментов по ультрафильтрации можно определить константы связывания хлоринов с альбумином.

Полученные результаты, представленные в таблице, свидетельствуют о сильных различиях в сродстве производных Хл  $e_6$  к альбумину. При этом для ММЭ и Хл  $e_6$  различие в величинах  $K_C$  незначительно (~7%), тогда как для ДМЭ этот показатель почти в 3 раза меньше, а для ТМЭ – на порядок меньше в сравнении с Хл  $e_6$ . Наблюдаемые различия в сродстве не связаны с влиянием на процесс измерений агрегации ФС, поскольку они сохраняются неизменными при вариации концентраций ФС в довольно широком диапазоне

и, таким образом, отражают различия в параметрах связывания с САЧ исследуемых хлоринов в мономерной форме.

Таблица – Константы связывания ( $K_C$ ) с САЧ, рассчитанные на основании данных по ультрафильтрации производных хлорина  $e_6$ , различающихся по заряду молекулы и величине коэффициента распределения октанол-вода ( $K_{ОВ}$ ) [2]

ФС	Количество анионных карбоксильных групп	$K_{ОВ}$	$K_C, 10^6 \text{ (моль/л)}^{-1}$
Хл $e_6$	3	1,0	$1,21 \pm 0,09$
ММЭ	2	3,5	$1,13 \pm 0,08$
ДМЭ	1	19	$0,43 \pm 0,04$
ТМЭ	0	54	$0,11 \pm 0,02$

Считается, что основную роль в образовании устойчивых комплексов играют гидрофобные взаимодействия. Например, для ряда порфириновых ФС показано, что константа связывания с САЧ увеличивается с ростом гидрофобности соединения [3], то есть ФС с меньшим значением  $K_{ОВ}$  характеризуются меньшей величиной  $K_C$ . Однако для производных Хл  $e_6$  наблюдается обратная зависимость, обусловленная тем, что у производных Хл  $e_6$  помимо полярности различается еще и заряд молекулы. Снижение величины  $K_C$  (таблица 1) с уменьшением числа отрицательно заряженных боковых групп на молекуле ФС может свидетельствовать о существенном вкладе в процессы комплексообразования электростатических взаимодействий. Участок связывания с высоким сродством для тетрапирролов на молекуле САЧ предположительно идентичен центру связывания гема в субдомене VI, представляющему собой гидрофобный «карман». При встраивании в него гем взаимодействует своими пропионатными группами с триадой остатков аминокислот (лизин, аргинин и гистидин) на входе в «карман» [4]. Молекула Хл  $e_6$ , вероятно, размещается таким же способом, обеспечивая при помощи трех карбоксильных групп хорошую стабилизацию через солевые мостики с остатками аминокислот. Такая модель взаимодействия производных Хл  $e_6$  в заряженной анионной форме с САЧ в наибольшей степени соответствует полученным нами результатам. Следует отметить, что уменьшение числа заряженных боковых групп с трех (Хл  $e_6$ ) до двух (ММЭ) слабо сказывается на величине  $K_C$  (таблица 1). Однако этерификация двух боковых заместителей в молекуле ДМЭ, вызывающая снижение заряда молекулы до  $-1$ , приводит к уменьшению величины  $K_C$  в 3 раза. Можно предположить, что для стабилизации комплекса ФС-САЧ необходимо взаимодействие карбоксильных групп хлоринов как минимум с двумя положительно заряженными группами белка на входе в «карман».

Разработанный нами модифицированный метод ультрафильтрации позволяет исследовать процессы образования комплексов с альбумином для ФС с различными физико-химическими свойствами. Данные экспериментов хорошо согласуются с моделью, согласно которой макромолекула САЧ имеет одно сильное место связывания для производных Хл  $e_6$ . При этом вклад в образование комплексов вносят как гидрофобные, так и электростатические взаимодействия между молекулами ФС и белка.

#### Литература

1. **The effect** of porphyrin structure on binding to human serum albumin by fluorescence spectroscopy / O Rinco [et al.] // J. Photochem. Photobiol. A. – 2009. – Vol. 208, Is.2-3. – P. 91–96.
2. **Зорин В.П.**, Хлудеев И.И., Зорина Т.Е. Распределение порфириновых сенсibilizаторов между белковыми и клеточными элементами крови//Биофизика. – 2000. –Т. 45, вып.2. – С. 313-319.
3. **Ding Y.**, Lin B., Huie C.W. Binding studies of porphyrins to human serum albumin using affinity capillary electrophoresis. // Electrophoresis. 2001. – Vol. 22(11). – P. 2210-2216.
4. **Crystal** structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid / P. A. Zunszain [et al.] // BMC Structural Biology. 2003. Vol. 3, article 6.