

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ  
ՄՈԼԵԿՎՈԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԶԱՔՈՅԱՆ ԱՆՆԱ ԱՐԹՈՒՐԻ

ԿԱՏԻՈՆԱՅԻՆ ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՀԵՏ ՅԵՐՈՒԼՈՂԱԶՄԻՆԻ ԵՎ ՏՐԱՆՍՖԵՐԻՆԻ  
ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ ՍՏԱՅՈՒՄԸ ՖՈՏՈԴԻՆԱՄԻԿ ԹԵՐԱՊԻԱՅԻ ՀԱՄԱՐ

Գ.00.04 - «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի  
հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2022

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ЗАКОЯН АННА АРТУРОВНА

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ КАТИОННЫХ ПОРФИРИНОВ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ И  
ТРАНСФЕРРИНОМ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.04 - «Биохимия»

ЕРЕВАН - 2022

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիայանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում:


Գիտական ղեկավար՝	Կ.գ.թ. Գրիգոր Վազգենի Գյուլխանդանյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝	Կ.գ.դ. Սոնա Սմբատի Մարդանյան Կ.գ.թ. Արթուր Ալբերտի Համբարձումյան
Առաջատար կազմակերպություն՝	Մ. Հերացու անվ. Երևանի պետական բժշկական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2022 թ. հուլիսի 22-ին, ժամը 14:00-ին, ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ 0014, ք. Երևան, Հասարայան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am/> կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2022 թ. հունիսի 9-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. թեկնածու



Զ.Ա. Խաչատրյան

---

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии имени Г. Бунятына НАН РА.

Научный руководитель: к.б.н. Гюльханданян Григор Вазгенович

Официальные оппоненты: д.б.н. Марданян Сона Смбатовна  
к.б.н. Амбарцумян Артур Альбертович

Ведущая организация: Ереванский государственный медицинский университет им. Мхитара Гераци

Защита диссертации состоится 22 июля 2022 г. на заседании специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>.

Автореферат разослан 9 июня 2022 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042  
кандидат биол. наук.



Хачатрян З.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Онкологические заболевания являются одной из наиболее быстро развивающихся патологий с которыми люди сталкиваются по всему миру, и занимают второе место по уровню смертности [<https://geo.iarc.fr/tomorrow>, GBD 2016 Causes of Death Collaborators, 2017]. Уровень распространения, рост заболеваемости и смертность от онкологических заболеваний во всем мире, а также трудности, с которыми сталкиваются традиционные методы лечения, предъявляют высокие требования к исследованиям и разработкам более эффективных лекарственных форм [Kessel, 1986, Zhang et al., 2021].

Фотодинамическая терапия (ФДТ) считается эффективным методом лечения онкологических заболеваний. ФДТ имеет много преимуществ по сравнению с другими видами лечения рака: быстрый вывод активного действующего соединения из организма и незначительная токсичность, минимальные побочные эффекты, применение в тех случаях, когда хирургическое вмешательство невозможно [Calixto et al., 2016; Wagner et al., 2014; Zhao et al., 2020]. ФДТ может применяться при раковых заболеваниях кожи, молочной железы и других онкологических заболеваниях [Kelly et al., 1976].

Действующими компонентами при ФДТ являются: фотосенсибилизатор (ФС), свет и кислород. После введения пациенту ФС, вещество пассивно или активно накапливается в опухолевой ткани. При облучении ФС переходит в возбужденное состояние и взаимодействует с эндогенным молекулярным кислородом, что приводит к генерации активных форм кислорода (АФК), в том числе синглетного кислорода, токсичного для опухолевых клеток. Эффективность ФДТ сильно зависит от выбора ФС, среди которых особое место занимают порфирины [Kruger et al., 2018]. Синтетические порфирины и металлопорфирины обладают определенными биологическими, фотофизическими и фотохимическими свойствами, которые существенно увеличивают их эффективность [Valicsek et al., 2011; 2012]. Порфирины являются наиболее широко изученными соединениями из-за их участия в жизненно важных биологических процессах. Они имеют фундаментальное значение для поддержания жизненно важных процессов, таких как хранение и транспорт кислорода, фотосинтез, образование различных ферментов и витаминов. Полость порфиринов, содержащих четыре пиррольных азота, хорошо подходит для связывания большинства ионов металлов с образованием металлопорфиринов. Порфирины и металлопорфирины обладают своеобразными фотохимическими и фотофизическими свойствами, которые могут изменяться путем структурных модификаций.

Решающим фактором повышения эффективности лечения онкологических заболеваний методом ФДТ является доставка ФС в область опухоли для дальнейшего селективного связывания с клетками-мишенями. В настоящее время исследования направлены на разработку эффективных систем и способов доставки ФС в опухолевые ткани и клетки [Naidoo et al., 2018; Chang et al., 2018]. Наиболее эффективной считается транспортировка ФС к мишени через кровь (например, внутривенное введение) с последующей локализацией и накоплением ФС в опухолевых клетках. Показано, что такой подход обеспечивает минимальное повреждение нормальных тканей и стимулирует максимальное генерирование АФК в субклеточных структурах мишени, что способствует повышению эффективности ФДТ [Naumenko et al., 2021; Abrahamse et al., 2016].

Порфирины, используемые в ФДТ, имеют различные заряды (катионные, анионные и нейтральные порфирины). Известно, что мембраны тканей, клеток и субклеточных структур в основном заряжены отрицательно, и поскольку катионные порфирины и металлопорфирины занимают особое место по заряду (положительный), это способствует более высокой селективности их накопления в малигнизированной ткани [Hudson et al., 2004;

Gyulkhandanyan\_et al., 2005; 2006; 2012]. Основными переносчиками ФС (в том числе катионных порфиринов и металлопорфиринов) являются белки крови: липопротеины, сывороточный альбумин и гемоглобин [Cohen and Margalit, 1990; Kessel, 1986; Sil et al., 2004]. Для повышения эффективности метода ФДТ актуальной задачей является изучение связывания порфиринов и металлопорфиринов с другими белками крови и целесообразности их использования для доставки этих ФС в малигнизированную ткань. В связи с этим для исследований были выбраны такие необходимые белки для ангиогенеза как, трансферрин (переносчик железа) и церулоплазмин (переносчик меди), представляющие особый интерес для транспорта и распределения ФС.

**Целью диссертационной работы** является получение и исследование образования комплексов катионных порфиринов и металлопорфиринов с двумя белками крови – трансферрином и церулоплазмином, а также оценка эффективности этих комплексов для ФДТ.

**Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:**

- Исследовать противоопухолевую (цито- и фототоксическую) активность катионного порфирина  $\text{TOEt}_4\text{PyP}$  *in vitro* и *in vivo*.
- Исследовать антибактериальную (цито- и фототоксическую) активность катионных порфиринов *in vitro*.
- Получить и очистить церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) из плазмы крови человека.
- Получить нековалентные комплексы катионных порфиринов с ЦП и ТФ: [ФС + ЦП/ТФ].
- Исследовать полученные комплексы [ФС+ЦП/ТФ] методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии.
- Исследовать влияние pH и концентрации NaCl на оптические свойства комплексов [ЦП + ФС].
- Исследовать влияние света на катионные порфирины и комплексы [ЦП + ФС].
- Исследовать оксидазную активность ЦП в комплексах с катионными Zn-порфиринами.
- Исследовать противоопухолевую (цито- и фототоксическую) активность полученных комплексов [ФС+ЦП] *in vitro*.

**Научная новизна:**

- Получены нековалентные комплексы катионных порфиринов и металло-порфиринов с ТФ.
- Получены нековалентные комплексы катионных порфиринов и металлопорфиринов, Хлорина е6 и Al-фталоцианина с ЦП.
- Исследовано влияние кислого диапазона pH (от 6,9 до 6,2) и концентрации NaCl (от 0 до 0,9 %) на образование комплексов [ЦП + ФС].
- Проведена оценка оксидазной активности ЦП в результате образования комплексов [ЦП + ФС].
- Исследована противоопухолевая активность комплексов [ЦП+Zn-порфирины] в режимах цитотоксического и фототоксического действия *in vitro*.

**Практическая значимость работы.** Комплексы ЦП с катионными порфиринами, а также анионным порфирином Хлорин е6 можно рекомендовать для дальнейших экспериментов *in vivo* с целью применения в ФДТ.

**Связь работы с научными тематиками.** Работа была выполнена в рамках Армяно-Белорусского гранта №13РБ-055 "Новые наноконпозиты на основе наночастиц и порфиринов: изучение фотофизических и биоактивных свойств" (2014-2016 гг.), Армяно-Белорусского гранта №АБ-16-36 "Молекулярные комплексы на основе трансферрина и катионных порфиринов для направленного воздействия на раковые клетки" (2017-2019 гг.).

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на международной конференции "Микробы: биология и применение" (11 октября 2019, Ереван, Армения), на Европейском онлайн форуме "Photonics Europe 2020" (2 апреля 2020), на международной конференции

"Лазерная физика 2021" (21-24 Сентябрь 2021), Аштарак, Армения, на международной научно-практической конференции "Биотехнология: наука и практика, инновации и бизнес" (20-22 октября 2021), Ереван, Армения, на семинаре Института биомедицины и фармации Российско-Армянского Университета (23 ноября 2021), а также на семинарах и заседаниях Ученого совета Института биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА (2014-2021).

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из списка использованных сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, экспериментальной части, включая результаты исследований и их обсуждение, заключения, выводов, списка литературы, включающего 192 источника. Работа оформлена на русском языке, изложена на 126 страницах, иллюстрирована 42 рисунками и 8 таблицами.

**Публикации.** Основные результаты диссертации изложены в 13 научных работах, включая 6 научных статей, опубликованных в республиканских и международных научных изданиях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основная часть работы выполнена в Институте биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА. Исследования по выявлению противоопухолевой активности катионных порфиринов и их комплексов с ЦП на культуре клеток HeLa *in vitro* (карцинома шейки матки, ATCC коллекция, США) проводили в Институте молекулярной биологии НАН РА; на *in vivo* модели солидной опухоли саркомы S-180 (Croker sarcoma), в Институте тонкой органической химии им. А.Л. Мнджояна Научно-технологического центра органической и фармацевтической химии НАН РА. Исследования (*in vitro*) антибактериальной активности катионных порфиринов на бактериальных штаммах *E. coli* K-12 (коллекция НИПЦ "Армбиотехнология", НАН РА) и *S. aureus* 209 P (коллекция Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича), проводили в НИПЦ "Армбиотехнология", НАН РА.

Биологические эксперименты проводились в полном соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, одобренных комитетом по биомедицинской этике при Институте биохимии им. Г.Х. Бунятына. Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета, а также совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, Страсбург, № 123, 18.03.1986.

**Катионные порфирины и металлопорфирины.** В исследованиях были использованы водорастворимые мезо-замещенные катионные 3- и 4- пиридилпорфирины и их Zn-производные металлопорфирины с различными периферическими функциональными группами синтезированные в Армении (Arm) и Великобритании (UK) в соответствии с методиками работ [Tovmasyan et al., 2008; Tovmasyan et al., 2007]. Структура этих соединений была подтверждена методом ЯМР на приборе Varian Mercury 300VX.

В работе также были использованы применяемые в настоящее время в ФДТ опухолей анионный порфирин Хлорин е6 ("Предприятие по производству диагностических и лекарственных препаратов", Минск, Белоруссия) и нейтральный ФС Al-phthalocyanine ("Фотосенс", производство Научно-исследовательского института полупродуктов и красителей (НИОПИК), Москва, Россия), а также полученные нами комплексы этих ФС с белками ТФ и ЦП.

Исходные растворы порфиринов и металлопорфиринов и других ФС в дистиллированной воде с концентрациями  $10^{-3}$  М были приготовлены за час до эксперимента. Все ФС-

содержащие растворы хранились при комнатной температуре или при 6-8 °С (не более 72 ч) в темноте во избежание фотохимических модификаций и фотообесцвечивания.

**Белки.** Были использованы ТФ и ЦП, выделенные нами из плазмы донорской крови (Гематологический центр им. проф. Р. Еоляна), лиофилизированный трансферрин (Sigma; T4132, голо-ТФ human  $\geq 98\%$ ) и полученный из T4132 методом гель-фильтрации апо-ТФ. Все растворы, содержащие белок, хранили в при 6-8 °С не более 72 ч.

**Спектральные исследования.** Анализ спектров исследуемых образцов проводили независимыми методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Спектры поглощения ФС и их комплексов с белками регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-2100 (Japan) в кварцевых кюветках (0,1 или 1 см). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре MPF 44 (Perkin-Elmer, USA) в кварцевых кюветках (1 см). Возбуждение катионных порфиринов и металлопорфиринов осуществлялось при длинах волн вблизи максимума полосы Core. Все измерения проводили при комнатной температуре.

**Оценка цитотоксической и фототоксической активности катионных порфиринов и металлопорфиринов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.** Оценка цитотоксической (темновой) и фототоксической (световой) активности катионных порфиринов и металлопорфиринов была проведена по отношению к грамположительному (Грамм (+)) и грамотрицательному (Грамм (-)) микроорганизмам: *Staphylococcus aureus* 209 P и *E. coli* K-12 соответственно. Пробы для исследования содержали 0,1 мл раствора ФС соответствующей концентрации и 0,9 мл суспензии микроорганизмов в ФБ (титр клеток составлял  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл). Пробы инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в термостате (цитотоксическая активность). Для оценки фототоксической активности непосредственно после добавления ФС пробы инкубировали в течение 10 мин, далее облучали светодиодом (LED) с пиковой эмиссией 405 нм и плотностью мощности излучения 70 мВт/см<sup>2</sup> в течение 5-30 мин.

Выживаемость бактерий определяли методом последовательных разведений [Миллер, 1976]. Выживание клеток определяли как процент относительно контрольного образца без добавления ФС.

**Оценка цитотоксической и фототоксической активности порфиринов и металлопорфиринов и их комплексов с церулоплазмином *in vitro*.** Определение активности порфиринов и металлопорфиринов и их комплексов с ЦП проводили в микропланшетах с 96 лунками объемом 0,2 мл (Greiner, Германия). Для определения цитотоксичности образцов в лунки добавляли по 12,5 мкл раствора ФС или его комплекса [ЦП + ФС] и инкубировали с 125 мкл клеток (титр клеток  $2 \times 10^5$  кл/мл) при 37 °С и 0,5 % CO<sub>2</sub> в окружающей среде, в темноте. Для определения фототоксичности образцов через 1 час после добавления растворов порфиринов или комплексов [ЦП + ФС] микропланшет освещали вольфрамовой лампой мощностью 50 Вт (30 мВт/см<sup>2</sup>) в течение 30 мин. После дальнейшей инкубации в течение 24 ч жизнеспособность клеток оценивали колориметрическим методом используя краситель 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ, Sigma-Aldrich, Германия) [Van de Loosdrecht et al., 1994]. Результаты оценивали с помощью считывателя микропланшетов для ELISANiPoMPP-96 (Biosan, Великобритания) при длине волны 570 нм (эталонная длина волны 620 нм). Выживание клеток определяли как процент относительно контрольного образца без добавления ФС.

**Оценка цитотоксической и фототоксической противоопухолевой активности порфиринов и металлопорфиринов *in vivo*.** Противоопухолевую активность порфиринов *in vivo* оценивали на модели солидной опухоли саркомы S-180 (Croker sarcoma). Для каждой

экспериментальной группы использовали 8-10 мышей. Самцам белых беспородных мышей в возрасте 6-7 недель (весом 20-25 г) перевивали опухоль в подмышечную впадину [Софьина и др., 1980]. Шерстный покров животных предварительно депилировали. Выживаемость животных наблюдали в течение 8 дней. Для определения цитотоксической активности исследуемых ФС, мышам, содержащимся в темновых условиях, на третьи сутки после приживления опухоли, внутрибрюшинно ежедневно вводили раствор ФС (0,3 мг/0,5 мл) в течение следующих 3-х суток. Контрольная группа животных оставалась интактной. Для определения фототоксичности ФС, на следующий день после введения последней дозы опухоль освещали вольфрамовой лампой [50 Вт (30 мВт/см<sup>2</sup>), 20 мин]. Контрольной группе мышей ФС не вводили, но проводили освещение. Мышей забивали на 8-й день (после приживления опухоли) и определяли вес опухоли по сравнению с контролем. Противоопухолевую активность определяли по торможению роста опухоли (ТРО):

$$[\text{ТРО}] = [(M_K - M_O) / M_K] \times 100\%,$$

где  $M_K$  и  $M_O$  - средние массы опухоли в контрольной и опытной группах.

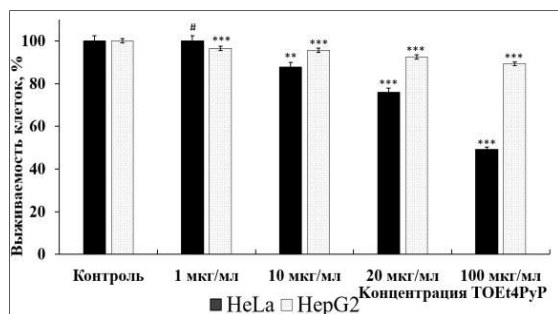
**Статистический анализ** был выполнен с помощью параметрического одностороннего постдисперсионного анализа (one-way Anova) и постдисперсионного теста Холм-Сидака (Sigma Stat 3.5 for Windows). Данные представлены как среднее ( $M$ )  $\pm$  стандартное отклонение (SD) (значимая разница рассматривались при  $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первую очередь была поставлена задача исследовать активность самих катионных порфиринов и металлопорфиринов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

### Цитотоксическая активность порфирина TOEt4PyP (UK) в отношении HeLa и HepG2 клеток *in vitro*

Цитотоксическая активность катионного порфирина TOEt4PyP (UK) в условиях *in vitro* была оценена в отношении HeLa (карцинома шейки матки) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома) клеток. Результаты исследований приведены на рисунке 1.



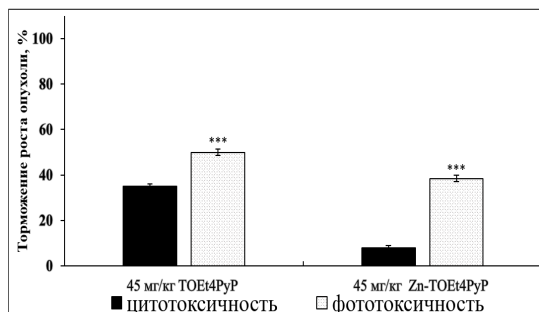
**Рис. 1.** Выживаемость клеток линий HeLa и HepG2 в темновых условиях при воздействии различными концентрациями TOEt4PyP (UK), ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ). #  $p > 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем.

Полученные данные показали, что при инкубации HepG2 клеток в темновых условиях в течение 24 ч с различными концентрациями порфирина TOEt4PyP (UK) (1 - 100 мкг/мл) жизнеспособность клеток снижается на  $10,7 \pm 0,54\%$  относительно контроля.

Инкубация HeLa клеток с 100 мкг/мл TOEt4PyP (UK) в среде привела к наибольшему снижению их выживаемости и составила  $50,9 \pm 2,55\%$ .

### Цитотоксическая и фототоксическая активности порфирина TOEt4PyP (UK) и металлопорфирина Zn-TOEt4PyP (UK) *in vivo*

Цитотоксическая и фототоксическая активности ФС TOEt4PyP (UK) и его Zn-содержащего порфирина (Zn-TOEt4PyP (UK)) в условиях *in vivo* были оценены на модели солидной опухоли саркомы S-180. Результаты исследований приведены на рисунке 2.



**Рис. 2.** Цитото- и фототоксическая активности TOEt4PyP (UK) и Zn-TOEt4PyP (UK) на модели саркомы S-180. Гистограмма торможения роста опухоли в течение 8 дней, (M  $\pm$  SD, n=5). \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с цитотоксической активностью.

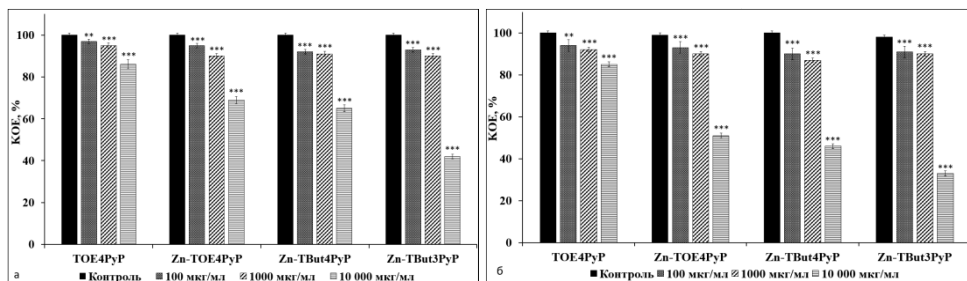
При внутрибрюшинном введении синтетических ФС - TOEt4PyP (UK) и Zn-TOEt4PyP (UK) с дозой 45 мг/кг, ТРО составляет соответственно  $35 \pm 1,8\%$  и  $8 \pm 0,4\%$ . При освещении опухоли контрольных животных ТРО не наблюдается (0%). ФДТ с использованием TOEt4PyP и Zn-TOEt4PyP приводит к уменьшению объема опухоли по сравнению с контролем, ТРО составляет  $50 \pm 2,5\%$  и  $38,5 \pm 1,9\%$ , соответственно. Таким образом, минимальная эффективная фототоксичная доза порфирина TOEt4PyP, определяемая на опухоли саркомы S-180 составила 45 мкг/кг.

### Антибактериальная активность катионных порфиринов и металлопорфиринов *in vitro* Цитотоксическая активность катионных порфиринов и металлопорфиринов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий

Результаты дозависимой цитотоксической активности катионных порфиринов и металлопорфиринов (100 мкг/мл, 1 000 мкг/мл, 10 000 мкг/мл) в отношении *Staphylococcus aureus* 209 P (Грам+) и *E. coli* K-12 (Грам-) микроорганизмов приведены на рисунках 3а и 3б соответственно [Korchenova et al., 2016]. Контролем служили показатели КОЕ для взвесей бактерий, не обработанных порфиринами и металлопорфиринами.

В темновых условиях обработка *S. aureus* 209 P с Zn-порфиринами (10 000 мкг/мл) вызывает снижение числа КОЕ в 1,2 - 2 раза по сравнению с порфирином TOEt4PyP не содержащим металл (Рис. 3а). Обработка клеток Zn-порфиринами в более низких концентрациях (100 мкг/мл, 1000 мкг/мл) не приводила к достоверному сокращению численности бактерий. В темновых условиях обработка клеток грамотрицательного микроорганизма *E. coli* K-12 Zn-порфиринами в концентрации 10 000 мкг/мл также вызывает снижение числа КОЕ в 1,7 - 2,6 раза по сравнению с порфирином TOEt4PyP не содержащим металл. Обработка клеток порфиринами в более низких концентрациях (100 мкг/мл, 1000 мкг/мл) также не приводила к достоверному сокращению численности бактерий.





**Рис. 3.** Цитотоксическая активность порфиринов в отношении микроорганизмов

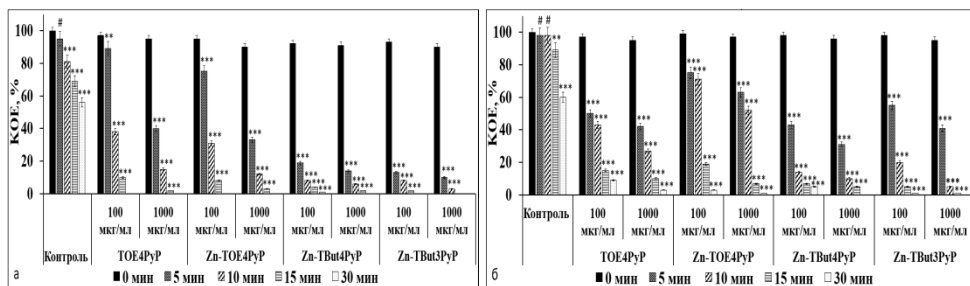
*S. aureus* 209 P (а) и *E. coli* K-12 (б), ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ).

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

Исходя из полученных данных, для дальнейших экспериментов по фототоксической эффективности были выбраны концентрации катионных порфиринов и металлопорфиринов в 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл, которые не оказывали цитотоксического влияния на исследованные микроорганизмы.

#### Фототоксическая активность катионных порфиринов и металлопорфиринов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий

Изучение фототоксической активности катионного порфирина TOE4PyP и металлопорфиринов Zn-TOE4PyP, Zn-TBut4PyP, Zn-TBut3PyP в концентрации 1000 мкг/мл показало, что исследуемые ФС существенно сокращают число КОЕ в колонии *S. Aureus*. Облучение в течение первых 5 мин снижало число КОЕ на 1.0 lg (на 60%, 67%, 86% и 90%) по сравнению с контрольной группой. Увеличение времени облучения до 30 мин снижало число КОЕ на 2.9 lg (на 91%–99%) (Рис. 4а).



**Рис. 4.** Фототоксическая активность катионных порфиринов и металло-порфиринов (TOE4PyP, Zn-TOE4PyP, Zn-TBut4PyP, Zn-TBut3PyP) в отношении микроорганизмов

*S. aureus* 209 P (а) и *E. coli* K-12 (б), ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ).

#  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

Фотодинамическое действие порфиринов на штамм *E. coli* K-12 снижало КОЕ в пределах 2.0lg (на 25%–48%) по сравнению с контрольной группой при концентрации 100 мкг/мл (рис. 4б). Повышение концентрации порфиринов до 1000 мкг/мл при увеличении времени времени облучения снижало КОЕ до 2.8 lg (на 99%).

## Получение комплексов фотосенсибилизаторов с трансферрином

Для получения комплексов [ФС + ТФ], смесь ФС с белком при молярном соотношении 5:1 инкубировали в течение 72 часов при 6-8 °С в 0,01 М ФБ, рН 7,2. Для разделения комплекса [ФС+ТФ] от не связавшегося ФС инкубационную смесь пропускали через колонку с Сефадексом G-25 (fine), уравновешенной 0,01 М ФБ рН 7,2. Концентрацию белка и связавшегося ФС рассчитывали из спектров поглощения и флуоресценции.

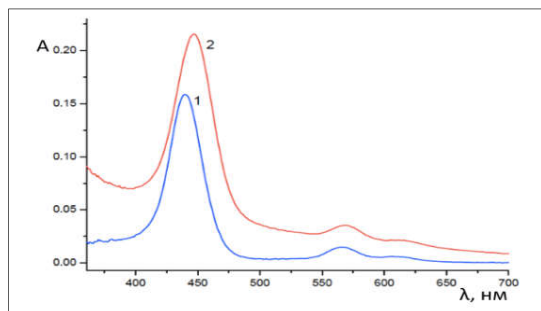
## Получение комплексов фотосенсибилизаторов с церулоплазмином

Для получения комплексов [ФС + ЦП], смесь ФС с белком при молярном соотношении 4:1 (концентрация ФС –  $1,6 \times 10^{-4}$  М, а ЦП –  $4 \times 10^{-5}$  М) инкубировали в течение 48 часов при 6-8 °С в 0,01 М ФБ, рН 7,2. После нековалентного связывания компонентов, от несвязавшегося ФС освобождались на колонке с сефадексом G-25 (fine), уравновешенном 0,01 М ФБ, рН 7,4. Концентрацию белка и связавшегося ФС рассчитывали из спектров поглощения и флуоресценции.

## Исследование комплексов катионных порфиринов и металлопорфиринов с трансферрином и церулоплазмином методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии

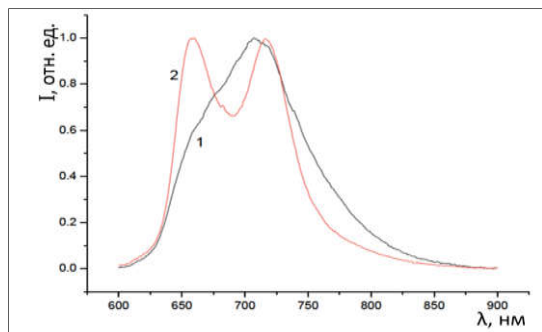
### Комплексы катионных порфиринов и металлопорфиринов с трансферрином

Спектры поглощения катионного порфирина ТОEt4PyP, и его комплекса с ТФ из сыворотки крови человека в 0,01 М ФБ, рН 7,2 приведены на рисунке 5. Наблюдается увеличение интенсивности поглощения полосы Soret (гиперхромный эффект) и сдвиг пика поглощения в длинноволновую область спектра на 7 нм (батохромный эффект). Взаимодействие молекул обычно приводит к некоторому сдвигу полос поглощения в сторону больших (батохромный эффект) или меньших (гипсохромный эффект) длин волн, увеличивает (гиперхромный эффект) или уменьшает (гипсохромный эффект) их интенсивность [<https://chem21.info/info/98510/>].



**Рис. 5.** Спектры поглощения  
1) катионного порфирина ТОEt4PyP ( $1,6 \times 10^{-5}$  М) в 0,01 М ФБ, рН 7,2;  
2) комплекса [ТФ + ТОEt4PyP].

Известно, что положение и интенсивность полос поглощения в электронных спектрах порфиринов чувствительны к строению их молекул, а также к присутствию протонирующих и комплексообразующих агентов [Березин, 1978]. Эти изменения свидетельствуют о взаимодействии ФС с ТФ и об образовании комплексов.

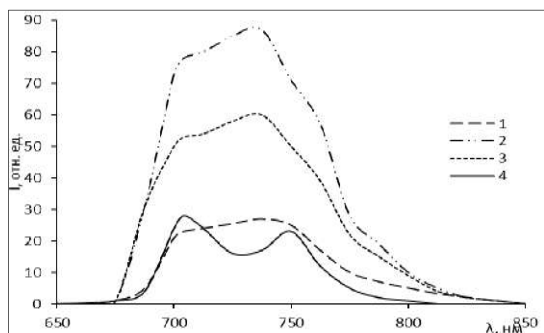


**Рис. 6.** Спектры флуоресценции  
 1) катионного порфирина TOEt4PyP  
 в 0,01 М ФБ, рН 7,2;  
 2) комплекса [ТФ + TOEt4PyP].

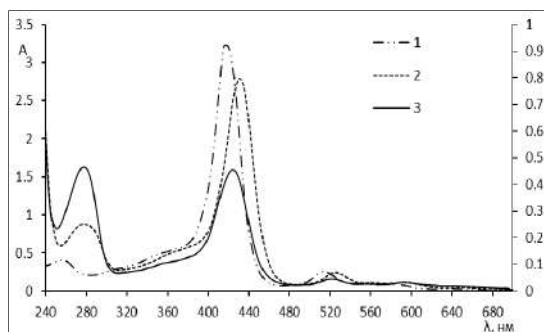
На рисунке 6 представлены спектры флуоресценции TOEt4PyP свободного и в комплексе [ТФ + TOEt4PyP]. При возбуждении комплекса [ТФ + TOEt4PyP] и порфирина длиной волны его максимума поглощения 424 нм, максимум спектра испускания свободного TOEt4PyP приходится на длину волны 709 нм, а спектр комплекса [ТФ + TOEt4PyP] имеет 2 пика эмиссии, при 660 нм и 720 нм. Из рисунка видно, что при образовании комплекса [ТФ + TOEt4PyP] спектр трансформируется, образуя два четко выраженных пика эмиссии (спектр 2). Аналогичные спектральные изменения наблюдаются для родственного порфирина - тетра-метилпиридин порфирина (TMPyP) при его взаимодействии с ДНК и полинуклеотидами [Джагаров и др., 1999]. На основе полученных данных был сделан вывод, что белок ТФ образует комплексы с катионными порфиринами и металлопорфиринами.

### **Спектральные и флуоресцентные характеристики комплексов катионных порфиринов и металлопорфиринов с церулоплазмином**

Нами были исследованы комплексы водорастворимых ФС с ЦП. На рисунке 7 представлены оптические спектры поглощения TOEt4PyP и его комплекса с ЦП в 0,01 М ФБ, рН 7,2. Из рисунка видно, что связывание TOEt4PyP с ЦП происходит менее чем за 3 мин после добавления белка в раствор. Через 3 мин после добавления ЦП в раствор наблюдается гипохромный эффект (уменьшение поглощения полосы Soret) и батохромный эффект (сдвиг пика поглощения в длинноволновую область), что свидетельствует об образовании комплекса в растворе (спектр 2). Пик полосы Soret смещается с 420 нм в длинноволновую область до 430 нм. В последующие 10, 20 мин после добавления ЦП оптический спектр раствора не претерпевал изменений. Далее, для полного связывания TOEt4PyP с ЦП, раствор инкубировали в течении 72 часов при 6-8 °С и комплекс [ЦП+порфирин] отделяли от несвязавшегося порфирина гель-фильтрацией. Спектр комплекса [ЦП + TOEt4PyP] после удаления несвязанного порфирина на Сефадексе G-25 (спектр 3) имеет два основных пика: 1 – при  $\lambda_{\text{max}} = 285$  нм соответствует поглощению белковой молекулы, 2 – с максимумом поглощения полосы Soret при  $\lambda_{\text{max}} = 430$  нм, является характерным поглощением порфириновых соединений (например, TOEt4PyP).



**Рис. 7.** Спектры поглощения  
1) катионного порфирина ТОЕт4Рур ( $1,6 \times 10^{-4}$  М) в 0,01 М ФБ, рН 7,2;  
2) через 3 мин после добавления в раствор ЦП ( $4 \times 10^{-5}$  М);  
3) комплекса [ЦП + ТОЕт4Рур].



**Рис. 8.** Спектры флуоресценции катионного порфирина ТОЕт4Рур в 0,01 М ФБ, рН 7,2:  
1)  $5 \times 10^{-7}$  М; 2)  $3 \times 10^{-6}$  М; 3)  $3 \times 10^{-6}$  М;  
4) [ЦП + ТОЕт4Рур].

На рисунке 8 представлены спектры флуоресценции для 3-х концентраций порфирина ТОЕт4Рур и его комплекса с ЦП [ЦП + ТОЕт4Рур]. Спектры флуоресценции порфирина ТОЕт4Рур и комплекса с ЦП были получены при длине волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 425$  нм. Максимум спектров эмиссии порфирина ТОЕт4Рур соответствуют длине волны  $\lambda_{em} = 737,5$  нм с плечом при 704 нм. Из рисунка видно, что при образовании комплекса [ЦП + ТОЕт4Рур] спектр ТОЕт4Рур трансформируется с образованием двух четко выраженных пиков (спектр 4). Такое изменение спектра эмиссии наблюдалось также при образовании комплекса [ТФ + ТОЕт4Рур] (Рис. 6).

### Влияние рН и NaCl в среде на характеристики комплексов порфиринов и металлопорфирин с ЦП

Было изучено влияние рН в диапазоне от нейтральных до кислых (рН 6,9 – 6,2) на параметры образования комплекса [ЦП + ФС] методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. После получения комплексов [ЦП + ФС] в 0,01 М ФБ, рН 7,2, рН среды изменяли посредством добавления разбавленного раствора фосфорной кислоты (0,01 М или 0,001 М) до получения необходимого рН (от 6,9 до 6,2). Результаты исследования влияния изменения рН от нейтрального до кислого диапазона (от 6,9 до 6,2) на характеристики комплексов [ЦП + ФС] приведены в таблице 1. Для всех исследованных комплексов [ЦП + ФС] изменение исследованных характеристик представлены относительно характеристик комплексов при рН 6,9, выбранной в качестве контроля.

**Табл. 1.** Расчетные данные спектральных исследований влияния изменения pH от 6,9 до 6,2 на комплексы [ЦП+ФС] ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ).

Комплекс [ЦП+ФС]	pH от 6,9 до 6,2	молярное отношение ФС/ЦП	поверхностные ФС в % от связанных на ЦП
ЦП + Zn-TOEt4PyP (Armenia)	6,9 (контроль)	$0,68 \pm 0,06$	$3,71 \pm 0,02$
	6,7	$0,66 \pm 0,05$ #	$3,75 \pm 0,08$ #
	6,5	$0,35 \pm 0,04$ ***	$4,86 \pm 0,07$ ***
	6,4	$0,33 \pm 0,04$ ***	$6,45 \pm 0,28$ ***
	6,2	$0,30 \pm 0,05$ ***	$6,58 \pm 0,32$ ***
ЦП + TOEt4PyP (Armenia)	6,9 (контроль)	$0,60 \pm 0,06$	$6,7 \pm 0,38$
	6,7	$0,58 \pm 0,02$ #	$6,78 \pm 0,15$ #
	6,5	$0,57 \pm 0,08$ #	$7,5 \pm 0,3$ **
	6,4	$0,28 \pm 0,01$ ***	$13,65 \pm 0,42$ ***
	6,2	$0,24 \pm 0,04$ ***	$16,43 \pm 0,49$ ***
ЦП + TBut4PyP (Armenia)	6,9 (контроль)	$0,23 \pm 0,06$	$3,76 \pm 0,04$
	6,7	$0,15 \pm 0,04$ *	$5,36 \pm 0,04$ ***
	6,5	$0,11 \pm 0,01$ **	$5,19 \pm 0,01$ ***
	6,4	$0,08 \pm 0,01$ ***	$4,2 \pm 0,26$ **
	6,2	$0,07 \pm 0,01$ ***	$4,1 \pm 0,22$ **
ЦП + Zn-TBut4PyP (Armenia)	6,9 (контроль)	$0,32 \pm 0,05$	$5,71 \pm 0,04$
	6,7	$0,17 \pm 0,01$ ***	$9,58 \pm 0,3$ ***
	6,5	$0,15 \pm 0,01$ ***	$9,14 \pm 0,35$ ***
	6,4	$0,14 \pm 0,03$ ***	$7,71 \pm 0,39$ ***
	6,2	$0,12 \pm 0,01$ ***	$8,9 \pm 0,18$ ***
ЦП + Хлорин еб	6,9 (контроль)	$1,45 \pm 0,07$	$6,2 \pm 0,31$
	6,7	$1,43 \pm 0,07$ #	$6,74 \pm 0,21$ **
	6,5	$1,39 \pm 0,05$ #	$7,1 \pm 0,13$ ***
	6,4	$1,25 \pm 0,03$ ***	$7,18 \pm 0,22$ ***
	6,2	$1,12 \pm 0,03$ ***	$7,45 \pm 0,22$ ***

#  $p > 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем.

Анализ флуоресцентных данных (табл. 1) показал, что небольшой процент ФС на поверхности ЦП от всех связанных на поверхности ЦП, увеличивается при снижении pH от 6,9 до 6,2. Это увеличение можно объяснить перераспределением порфиринов, локализованных в основном внутри белковой молекулы, на поверхность вследствие возможных конформационных изменений в структуре белка при снижении pH до 6,2.

Методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии было изучено влияние изменения концентрации хлорида натрия (NaCl) в среде (0,01 М ФБ, pH 7,2) на характеристики комплексов [ЦП+ФС] при 0; 0,1; 0,2; 0,4 и 0,9 % NaCl. Характеристики спектров сравнивали с таковыми, полученными в растворе при физиологической концентрацией NaCl 0,9 % в качестве контроля. Расчетные данные для каждого из изучаемых растворов приведены в таблице 2.

**Табл. 2.** Расчетные данные связывания ФС с молекулой ЦП при изменении концентрации NaCl от 0 до 0,9 %, ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ).

Комплекс [ЦП+ФС]	% NaCl в среде	молярное отношение ФС/ЦП	поверхностные ФС в % от связанных на ЦП
ЦП + Zn-TOEt4PyP (Armenia)	0	1,02 ± 0,07 ***	5,54 ± 0,29 ***
	0,1	0,94 ± 0,06 ***	5,99 ± 0,31 ***
	0,2	0,85 ± 0,04 ***	6,73 ± 0,15 ***
	0,4	0,84 ± 0,02 ***	8,01 ± 0,13 ***
	0,9 (контроль)	0,65 ± 0,03	10,47 ± 0,43
ЦП + TOEt4PyP (Armenia)	0	0,57 ± 0,05 ***	2,46 ± 0,3 ***
	0,1	0,51 ± 0,05 ***	2,75 ± 0,29 ***
	0,2	0,51 ± 0,06 ***	2,75 ± 0,32 ***
	0,4	0,26 ± 0,02 #	5,56 ± 0,26 ***
	0,9 (контроль)	0,26 ± 0,03	7,79 ± 0,17
ЦП + TOEt4PyP (UK)	0	0,51 ± 0,05 ***	3,27 ± 0,24 ***
	0,1	0,49 ± 0,06 ***	3,44 ± 0,45 ***
	0,2	0,49 ± 0,05 ***	3,56 ± 0,54 ***
	0,4	0,43 ± 0,04 ***	3,94 ± 0,59 ***
	0,9 (контроль)	0,3 ± 0,02	8,45 ± 0,49
ЦП + Zn-TBut4PyP (UK)	0	0,93 ± 0,05 ***	3,54 ± 0,55 ***
	0,1	0,84 ± 0,07 ***	6,87 ± 0,33 ***
	0,2	0,82 ± 0,06 ***	6,43 ± 0,33 ***
	0,4	0,81 ± 0,07 ***	8,00 ± 0,4 ***
	0,9 (контроль)	0,32 ± 0,01 ***	15,6 ± 0,36
ЦП + Хлорин е6	0	1,81 ± 0,03 ***	3,25 ± 0,18 **
	0,1	1,78 ± 0,02 ***	2,55 ± 0,34 #
	0,2	1,75 ± 0,04 ***	2,55 ± 0,28 #
	0,4	1,70 ± 0,02 ***	2,4 ± 0,49 #
	0,9 (контроль)	1,38 ± 0,06	2,28 ± 0,46

#  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

По данным абсорбционной спектроскопии следует, что ФС Al-фталацианин связывается с молекулой ЦП на 3,28%, в то время как анионный порфирин Хлорин е6 связывается с ЦП больше всех ФС. Для всех изученных комплексов число ФС на одну молекулу ЦП уменьшается с увеличением концентрации NaCl. Значительное уменьшение числа ФС на одну молекулу ЦП при 0,9 % NaCl означает, что в структуре белка ЦП происходят изменения и частичный отрыв ФС. В случае инъекции комплексов [ЦП + ФС] в кровь возможно частичное отделение ФС от комплекса, однако значительная часть ФС может сохраняться в связанном состоянии. Следовательно, такие комплексы могут существовать в крови человека, и ЦП является переносчиком ФС.

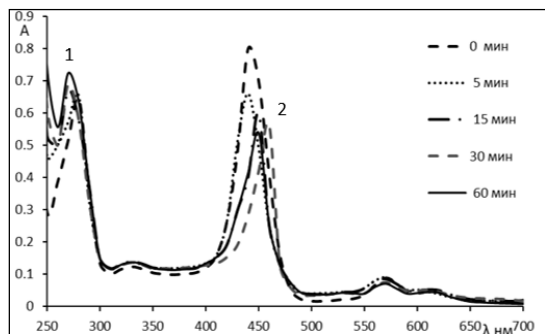
Анализ флуоресцентных спектров показал, что по мере увеличения концентрации NaCl процент связанных ФС на поверхности ЦП возрастает для комплексов с катионными

порфиринами и металлопорфиринами. Так, для [ЦП + Zn-ТОEt4PyP (Arg)] процент связанных ФС на поверхности ЦП возрастает в 1,89 раз. Это свидетельствует об изменении микроокружения катионных порфиринов и металлопорфиринов и возможном выходе отрицательно заряженных аминокислотных остатков молекулы ЦП на поверхность белка.

Для комплекса [ЦП + Хлорин е6] наблюдается обратная картина. По мере увеличения концентрации NaCl и изменении микроокружения комплекса процент связанных молекул Хлорина е6 на поверхности белка уменьшается в 1,43 раз. Это свидетельствует о частичном переходе этих ФС во внутренние структуры белка и/или частичном отрыве Хлорин е6 от молекулы белка. На основе полученных данных был сделан вывод, что белок ЦП может являться переносчиком ФС.

### Фотообесцвечивание катионных порфиринов и металлопорфиринов и их комплексов с церулоплазмином

Изменения в спектрах поглощения комплексов [ЦП + ФС] в 0,01 М ФБ, pH 7,2 исследованы при воздействии вольфрамовой лампы (0 – 60 мин) мощностью 50 Вт (30 мВт/см<sup>2</sup>). Анализ спектров и их изменений проводили путем измерения спектра поглощения образцов в диапазоне 250–700 нм. Спектры поглощения регистрировали после 0, 5, 15, 30 и 60 мин освещения растворов (3 мл). Полученные результаты представлены на рисунке 9 и в таблице 3.



**Рис. 9.** Спектры поглощения комплекса [ЦП + Zn-TBut4PyP] при освещении вольфрамовой лампой с экспозицией от 0 до 60 минут.

На рисунке 9 представлены спектры поглощения комплекса [ЦП + Zn-TBut4PyP] и влияние на комплекс освещения вольфрамовой лампы при экспозиции от 0 до 60 мин. Из рисунка видно, что спектры комплекса [ЦП + Zn-TBut4PyP], (как и все исследованные комплексы ЦП с порфиринами и металлопорфиринами) имеют два основных пика: 1 - при длине волны  $\lambda_{\max} \sim 280$  нм соответствует поглощению белковой молекулы, а 2 - с  $A_{\max}$  полосы Соре при длине волны  $\lambda_{\max} \sim 420-440$  нм, который характерен для поглощения порфириновых соединений. Анализ спектров показал, что при увеличении времени экспозиции в пределах до 60 мин во всех исследованных комплексах интенсивность белкового поглощения при 280 нм увеличивается (гиперхромный эффект) и наблюдается гипсохромный сдвиг этой полосы в синюю, коротковолновую область поглощения (табл. 3). Поведение порфиринового пика спектров в комплексах было иным. С увеличением времени экспозиции до 60 мин для комплексов ЦП с порфиринами и металлопорфиринами наблюдается уменьшение интенсивности поглощения полосы Соре при 420-440 нм

(гипохромный эффект) и батохромный сдвиг в красную область поглощения (рис. 9, пик 2 и табл. 3).

**Таблица 3.** Сдвиги пиков поглощения (нм) относительно пиков исходного спектра для комплексов [ЦП+ФС] после 60 минут освещения, ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ).

N	Комплексы [ЦП+ ФС]	$\Delta\lambda$	$\Delta\lambda$
		$\sim 280$ нм	420-440 нм
1	[ЦП + TBut4PyP]	$-7,0 \pm 0,81$	$6,5 \pm 0,6$
2	[ЦП + TOEt4PyP]	$-5 \pm 0,71$	$9,5 \pm 0,92$
3	[ЦП + Zn-TBut4PyP]	$-8 \pm 0,34$	$6,5 \pm 0,6$
4	[ЦП + Zn-TOEt4PyP]	$-8,5 \pm 0,37$	$0,5 \pm 0,08$
		$\sim 280$ нм	$\sim 672$ нм
5	[ЦП + Хлорин е6]	$-4 \pm 0,65$	$-1,5 \pm 0,28$
		$\sim 280$ нм	$\sim 676$ нм
6	[ЦП + Al-фталотионин]	$-2,5 \pm 0,45$	0

Известно, что в спектрах поглощения белков полоса поглощения с  $\lambda_{\max} = 275-280$  нм обусловлена поглощением энергии света ароматическими аминокислотами (триптофан, тирозин, фенилаланин) [Nelson et al., 2017]. Можно предположить, что действие света влияет на ароматические аминокислоты белковой компоненты комплекса (ЦП), приводящее к гипсохромному сдвигу (в синюю область спектра) полос поглощения изученных комплексов [ЦП + ФС]. Наблюдаемые сдвиги в спектрах поглощения комплексов [ЦП + ФС] свидетельствуют о возможной гибридизации электронных облаков, изменении электронной плотности на месте взаимодействия белка с ФС и конформационном изменении белка ЦП под действием освещения.

### **Цитотоксическая и фототоксическая активности ЦП и его комплексов с Zn-порфиринами в отношении клеток HeLa *in vitro*.**

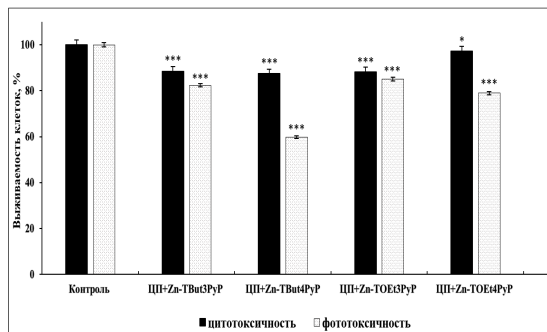
Для изучения цито- и фототоксической активности были получены комплексы [ЦП+Zn-порфирины] в молярных соотношениях ФС/ЦП представленных в таблице 4. Во всех комплексах концентрация ФС не превышала 10 мкг/мл.

**Таблица 4.** Молярное соотношение Zn-металлопорфиринов с ЦП, ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ).

N	Комплексы [ЦП +ФС]	молярное отношение ФС/ЦП
1	ЦП+ Zn-TBut3PyP	$0,86 \pm 0,09$
2	ЦП+ Zn-TBut4PyP	$0,46 \pm 0,06$
3	ЦП+ Zn-TOEt3PyP	$1,73 \pm 0,03$
4	ЦП+ Zn-TOEt4PyP	$0,69 \pm 0,03$



Результаты исследований цито- и фототоксической активности полученных комплексов [ЦП + ФС] приведены на рисунке 10.

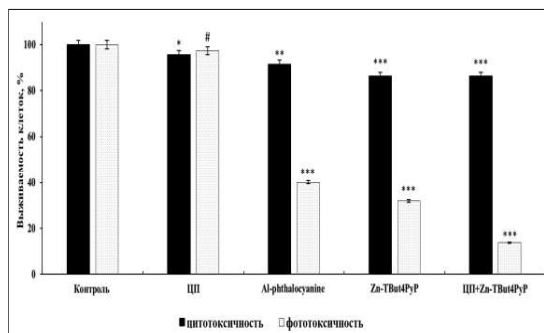


**Рис. 10.** Цито- и фототоксические активности комплексов [ЦП + ФС] в отношении HeLa клеток.

(M ± SD, n=5);

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

Из полученных и исследованных комплексов [ЦП+ФС] наиболее эффективным является комплекс [ЦП+Zn-TBut4PyP] при соотношении ЦП/ФС=0,46 (концентрация порфирина 4,49 мкг/мл), который снижает выживаемость клеток HeLa на 40,23 % относительно контроля. На основании полученных данных дальнейшие исследования проводили используя комплекс [ЦП+Zn-TBut4PyP] (Рис. 11).



**Рис. 11.** Цито- и фототоксические активности [ЦП+Zn-TBut4PyP], его компонентов и Al-phthalocyanine в отношении клеток HeLa.

(M ± SD, n=5);

#  $p > 0.05$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ,

\*\*\*  $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

Результаты, представленные на рисунке 11 показывают, что комплекс [ЦП+Zn-TBut4PyP] с концентрациями ЦП и Zn-TBut4PyP 1900 мкг/мл и 6,4 мкг/мл, соответственно, его компоненты ЦП и Zn-TBut4PyP в тех же концентрациях, а также применяемый в настоящее время в ФДТ опухолей Al-phthalocyanine, не проявляют высокой цитотоксичности. При освещении содержание в культуральной среде Al-phthalocyanine и Zn-TBut4PyP в условиях *in vitro* снижают выживаемость клеток HeLa на 59,83 % и 67,95 %, соответственно. Освещение среды, содержащей комплекс [ЦП+Zn-TBut4PyP], приводит к наибольшему снижению жизнеспособности клеток HeLa относительно контроля, на 86,16 %. Это является свидетельством того, что освещению клеток HeLa в присутствии комплекса [ЦП+Zn-TBut4PyP] в культуральной среде приводит к образованию АФК (в том числе, и  $H_2O_2$ ) и вызывает конформационные изменения в структуре ЦП. Вследствие конформационных изменений ЦП происходит высвобождение и/или выход на поверхность свободного  $Cu^{2+}$  из ЦП, что усиливает образование АФК.  $H_2O_2$  и свободный  $Cu^{2+}$ , способствуя генерации  $\cdot OH$

радикалов и в усиливая реакции свободнорадикального окисления, приводят к большему подавлению роста опухолевых клеток: в 1,3 раза по сравнению со свободным порфирином Zn-TBut4PyP и в 1,4 раза по сравнению с применяемым в ФДТ Al-phthalocyanine. Описанные данные свидетельствуют о высоком противоопухолевом потенциале комплекса [ЦП+Zn-TBut4PyP] для ФДТ.

## ВЫВОДЫ

1. Катионный порфирин TOEt4PyP не проявляет значимой цитотоксичности в условиях *in vitro* и *in vivo*, но обладает фототоксичностью. На мышинной модели *in vivo* (саркома S-180) минимальная эффективная фототоксичная доза TOEt4PyP составляет 45 мкг/кг. Перспективно дальнейшее исследование противоопухолевых свойств его комплекса с ЦП.
2. Содержание в культуральной среде порфирина TOEt4PyP и Zn-порфиринов (Zn-TOEt4PyP, Zn-TBut4PyP, Zn-TBut3PyP) в условиях *in vitro* снижает колониеобразующую способность Грам(-) и Грам(+) микроорганизмов на 99 % при светодиодном излучении. Это свидетельствует об их высоком потенциале для АФДТ.
3. Получены комплексы катионных порфиринов и металлопорфиринов [ФС + ЦП/ТФ]. При физиологических условиях среды (pH 7,4 и 0,9 % NaCl) и близких для тканей опухоли вклеточных условий ( $6,9 \leq \text{pH} \leq 6,2$ ) в исследованных комплексах [ФС+ЦП] значительная часть ФС сохраняется в связанном состоянии.
4. Образование комплексов [ЦП+Zn-порфирин] не влияет на оксидазную активность ЦП. Освещение комплексов [ЦП+Zn-порфирин] в течение 30 мин приводит к конформационным изменениям молекулы белка, не разрушая их.
5. Исследованные комплексы [ЦП+Zn-порфирин] в условиях *in vitro* не проявляют значимую цитотоксичность, но обладают достаточно высокой фототоксичностью. Наиболее эффективный комплекс [ЦП+Zn-TBut4PyP] снижает выживаемость клеток HeLa на 86,16 % относительно контроля. Перспективно дальнейшее исследование противоопухолевого потенциала этого комплекса с целью применения в ФДТ.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

### СТАТЬИ

1. Закоян А.А. Влияние света на оптическое поглощение фотосенсибилизаторов и их комплексов с церулоплазмином человека. // Медицинская наука Армении. 2020; 60(3):62-70.
2. Zakoyan A.A. Binding of photosensitizers of ceruloplasmin with a charge in the salt composition of the medium. // Bullitein of the Russian-Armenian University. 2020; 2:102-112.
3. Zakoyan A.A., Mkrtchyan L.V., Gyulkhandanyan G.V. The effect of light on the oxidase activity of human ceruloplasmin in complexes with cationic Zn-porphyrins. // Medical Science of Armenia. 2021; 61(3):80-89.
4. Закоян А.А., Мкртчян Л.В., Бабяян Н.С., Арсенян Ф. Г., Паронян М. Г., Сеферян Т.Е., Гюльханданян Г.В. Активность водорастворимых катионных порфиринов и их комплексов с церулоплазмином для фотодинамической терапии опухолей *in vitro* и *in vivo*. // Медицинская наука Армении. 2021; 61(1): 27-35.
5. Mkrtchyan L.V., Zakoyan A.A., Sargsyan A.A., Paronyan M.H., Gyulkhandanyan G.V. pH as the important factor for the complexation of porphyrins with ceruloplasmin for photodynamic therapy of tumor. // Biolog. Journal of Armenia. 2020; 72(4):55-60.
6. Korchenova M.V., Tuchina E.S., Shvayko V.Y., Gulkhandanyan A.G., Zakoyan A.A., Kazaryan R.K., Gulkhandanyan G.V., Dzhagarov B.M., Tuchin V.V. Photodynamic effect of

radiation with the wavelength 405 nm on the cells of microorganisms sensitised by metalloporphyrin compounds. // **Quantum Electronics**, 2016; 46(6):521–527.

## ТЕЗИСЫ

1. Gyulkhanyan Anna G., Parkhats M.V., Knyukshto V.N., Lepeshkevich S.V., Dzhagarov B.M., Zakoyan A.A., Gyulkhanyan Aram G., Sheyranyan M.A., Kevorkian G.A., Gyulkhanyan G.V. Binding of cationic porphyrins and metalloporphyrins to the human transferrin for photodynamic therapy of tumors. Proc. of SPIE. 2018, 10685, 1068504-1 - 1068504-9.
2. Gyulkhanyan Anna G., Zakoyan A.A., Gyulkhanyan Aram G., Parkhats M.V., Dzhagarov B.M., Lazareva E.N., Tuchin V.V., Gyulkhanyan G.V. Ceruloplasmin - a potential carrier of photosensitizers for photodynamic therapy of tumors. Proc. of SPIE. 2019, 11079, 110791T-1 - 110791T-3.
3. Gyulkhanyan Aram G., Zakoyan A.A., Mkrtchyan L.V., Gyulkhanyan Anna G., Parkhats M.V., Dzhagarov B.M., Sheyranyan M.A., Simonyan G.M., Lazareva E.N., Tuchin V.V., Gyulkhanyan Grigor V. Binding of ceruloplasmin with cationic porphyrins: pH and salt composition of a medium. Proc. of SPIE. 2020, 11363, 1136329-1 - 1136329-9.
4. Mkrtchyan L.V., Gyulkhanyan A.G., Zakoyan A.A., Gyulkhanyan G.V. Study of the pH-dependence of porphyrins binding in complexes with ceruloplasmin for photodynamic therapy of tumors. International Conference “Microbes: Biology & Application”. Book of Abstracts. Yerevan, Armenia. 2019, 51.
5. Zakoyan A.A., Gyulkhanyan A.G., Mkrtchyan L.V., Gyulkhanyan G.V. Photobleaching of photosensitizers solutions under different lighting conditions. International conference "Microbes: Biology and Application". Book of Abstracts. Yerevan, Armenia. 2019, 41.
6. Пархоц М.В., Кнюкшто В.Н., Закоян А.А., Мкртчян Л.В., Гюльхандянян А.Г., Симонян Г.М., Гюльхандянян Г.В., Джагаров Б.М. “Комплексы церулоплазмينا с порфиринами – модельные системы для исследования фотофизических процессов в биоструктурах при ФДТ”. Тезисы докладов международной научной конференции, четырнадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков “Молекулярные, Мембранные и Клеточные Основы Функционирования Биосистем”, Минск, Беларусь, 2020, 50.
7. Пархоц М.В., Лепешкевич С.В., Гюльхандянян Анна Г., Закоян А.А., Гюльхандянян Арам Г., Гюльхандянян Г.В., Джагаров Б.М. Фотофизические характеристики фотосенсибилизатора направленного действия на основе комплекса трансферрина с катионным порфирином. VI Конгресс физиков Беларуси. Сборник научных трудов, Минск, Беларусь, 2017, 309-310.

## Զարդյան Աննա Արթուրի

### Կատիոնային պորֆիրինների հետ ցերուլոպլազմինի և տրանսֆերինի կոմպլեքսների ստացումը ֆոտոդինամիկ թերապիայի համար

#### Ամփոփում

*Առանցքային բառեր.* քաղցկեղ, ուռուցքների ֆոտոդինամիկ թերապիա, հակաբակտերիալ ֆոտոդինամիկ թերապիա, ֆոտոսենսիբիլիզատորներ, կատիոնային պորֆիրիններ, տրանսֆերին, ցերուլոպլազմին

Կատիոնային պորֆիրինները և մետաղապորֆիրինները առանձնահատուկ տեղ են զբաղեցնում ուռուցքների ֆոտոդինամիկ թերապիայում (ՖԴԹ), ինչպես նաև մանրէների դեմ պայքարում՝ հակաբակտերիալ ՖԴԹ-ում (ՀՖԴԹ): Դրանք պատկանում են ֆոտոսենսիբիլիզատորների (ՖՍ) շարքին, որոնք չարորակ բջիջների և միկրոօրգանիզմների նկատմամբ ունեն բարձր ճնշող ակտիվություն:

Ներկայացված աշխատանքում ուսումնասիրվել է արյան սպիտակուցների՝ ցերուլոպլազմինի (ՅՊ) և տրանսֆերինի (ՏՖ) հետ կատիոնային պորֆիրինների և մետաղապորֆիրինների կոմպլեքսների առաջացումը ՖԴԹ-ի արդյունավետության բարձրացման նպատակով:

Ուսումնասիրվել են կատիոնային պորֆիրինների և մետաղապորֆիրինների հակաուռուցքային և հակաբակտերիալ ակտիվությունները: *In vitro* պայմաններում HeLa բջիջների կուլտուրայի նկատմամբ TOEt4PyP կատիոնային պորֆիրինի նվազագույն արդյունավետ ցիտոտոքսիկ չափաբաժինը կազմում է 100 մկգ/մլ: TOEt4PyP և Zn-TOEt4PyP ՖՍ-ների ցիտոտոքսիկ և ֆոտոտոքսիկ ակտիվությունները *in vivo* պայմաններում գնահատվել են մկան S-180 կարծր ուռուցքի մոդելի նկատմամբ (Crocker sarcoma): Մկան S-180 սարկոմայի *in vivo* մոդելի վրա TOEt4PyP պորֆիրինի ֆոտոտոքսիկ արդյունավետ չափաբաժինը 45 մկգ/կգ է: Մութ պայմաններում Գրամ (+) *Staphylococcus aureus* 209 P-ի և Գրամ (-) *E. coli* K-12 միկրոօրգանիզմների մշակումը պորֆիրիններով և մետաղապորֆիրիններով (TOEt4PyP, Zn-TOEt4PyP, Zn-TBut4PyP, Zn-TBut3PyP) չի հանգեցնում բակտերիաների քանակի նվազեցման: Ուսումնասիրված պորֆիրինների ու մետաղապորֆիրինների առկայության դեպքում բջջային միջավայրի 405 նմ ալիքի երկարությամբ LED ճառագայթումը *in vitro* պայմաններում նվազեցնում է այս միկրոօրգանիզմների գաղութներ ձևավորող միավորները մինչև 99 %:

Հետազոտվել է արյան սպիտակուցների՝ ՅՊ-ի և ՏՖ-ի հետ ՖՍ-ների (կատիոնային պորֆիրիններ և մետաղապորֆիրիններ, Քլորին e6, Al-ֆտալոցիանին) կոմպլեքսների առաջացումը: Ուսումնասիրված ՖՍ-ները նշված սպիտակուցների հետ կազմում են կոմպլեքսներ: Մանրակրկիտ ուսումնասիրվել են կոմպլեքսների կառուցվածքային վերադասավորումները տարբեր pH-ի աղի (NaCl) բաղադրության և լուսավորման պայմաններում: pH-ի մինչև 6,2 փոփոխության դեպքում [ՅՊ + ՖՍ] կոմպլեքսներում

տեղի են ունենում սպիտակուցի կոնֆորմացիոն փոփոխություններ: Միջավայրում աղի բաղադրության աճի հետ մինչև 0,9 % տեղի են ունենում ՅՊ-ի կառուցվածքային վերադասավորումներ, և ՖՍ/ՅՊ մոլային հարաբերակցությունը նվազում է: [ՅՊ + ՖՍ] կոմպլեքսներում տեղի է ունենում ՖՍ-ի անցում դեպի մակերես (կատիոնային պորֆիրինների համար) կամ սպիտակուցի մակրոմոլեկուլի ներքին մաս (անիոնային պորֆիրին Քլորին e6-ի համար)՝ պորֆիրինի մասնակի արտազատմամբ լուծույթի մեջ:

[ՅՊ + Zn-պորֆիրիններ] կոմպլեքսների առաջացումը չի ազդում սպիտակուցի օքսիդացային ակտիվության վրա: 30 րոպե տևողությամբ [ՅՊ + ՖՍ] կոմպլեքսների լուսավորումը հանգեցնում է կլանման սպեկտրների փոփոխության՝ առանց դրանք ոչնչացնելու:

Ստացած տվյալները վկայում են, որ ուսումնասիրված [ՅՊ + ՖՍ] կոմպլեքսներից ամենարդյունավետը [ՅՊ + Zn-TBut4PyP] կոմպլեքսն է: Բջջային միջավայրի լուսավորումը [ՅՊ + Zn-TBut4PyP] կոմպլեքսի առկայության դեպքում հանգեցնում է HeLa բջջերի կենսունակության 86,16 % նվազման ստուգիչի համեմատ, ինչը 1,3 անգամ ավելի արդյունավետ է, քան Zn-TBut4PyP ազատ պորֆիրինի ազդեցությունը և 1,4 անգամ ավելի արդյունավետ է, քան ՖԴ-ում կիրառվող հայտնի ՖՍ Al-ֆտալոցիանինը:

Հետազոտությունների արդյունքները հանգեցրել են այն եզրակացության, որ ուսումնասիրված կատիոնային պորֆիրինները և մետաղապորֆիրինները կարող են արդյունավետորեն օգտագործվել ՖԴ-ում և ՀՖԴ-ում, իսկ ՅՊ սպիտակուցի հետ ստացված կոմպլեքսները կարող են առաջարկվել ուռուցքների ՖԴ-ի համար:

**Zakoyan Anna Artur**

### **Complexation of cationic porphyrins with ceruloplasmin and transferrin for photodynamic therapy**

#### **Summary**

*Key words:* cancer, photodynamic therapy of tumors, antibacterial photodynamic therapy, photosensitizers, cationic porphyrins, transferrin, ceruloplasmin.

Cationic porphyrins and metalloporphyrins play a crucial role in the photodynamic therapy of tumors (PDT), as well as in the fight against bacteria, in the antibacterial PDT (APDT). Cationic porphyrins and metalloporphyrins belong to the series of photosensitizers (PS), which have a high suppressive activity against both malignant cells and microorganisms.

The main research direction is to study the formation of cationic porphyrin and metalloporphyrin complexes with blood proteins - ceruloplasmin (CP) and transferrin (TF) in order to improve the carriage of PS to the target tissues and cells, hence to increase the efficiency of PDT.

The initial stage of our work was devoted to the investigation of antitumor and antibacterial activities of cationic porphyrins and metalloporphyrins. The obtained data revealed that the minimum effective cytotoxic dose of TOEt4PyP cationic porphyrin for HeLa cells in culture was

100 µg / ml. The cytotoxic and phototoxic activities of TOEt4PyP and Zn-TOEt4PyP have been evaluated on S-180 solid tumor mouse model (Croker sarcoma) under *in vivo* conditions. It was shown that the effective phototoxic dose of TOEt4PyP on solid tumor is 45 µg/ml. Treatment of cells with porphyrins and metalloporphyrins at concentrations of 100 µg/ml, 1000 µg/ml for Gram (+) *Staphylococcus aureus* 209 P and Gram (-) *E. coli* K-12 microorganism does not lead to a reduction in the number of bacteria under dark conditions. The LED radiation of the porphyrins and metalloporphyrins (TOEt4PyP, Zn-TOEt4PyP, Zn-TBut4PyP, Zn-TBut3PyP) at 405 nm wave length reduced the number of colonizing units of these microorganisms by up to 99%.

Next, the complexation of PS (cationic porphyrins and metalloporphyrins, Chlorine e6, Al-phthalocyanine) with blood proteins CP and TF was studied. Then, the results of spectral measurement showed that the used PS form complexes with blood proteins CP and TF. The structural rearrangements of the formed complexes at different pH, salt composition (NaCl) and under light regimens with different exposition time, were studied by spectroscopic and spectrofluorometric analysis. The conformational changes occur in the CP protein structure of complexes [CP + PS] with pH value changes up to 6.2. With an increase of the NaCl concentration in the medium up to 0.9%, there were structural rearrangements of the CP, while the molar ratio of PS/CP was decreased. Considering these data, we came to the conclusion that in case of [CP+PS] complexes the PS is transmitted to the surface (for cationic porphyrins) or to the inner part (for the anionic porphyrin Chlorin e6) of the macromolecular structure of CP protein with partial release of the PS into the solution.

It was found that the formation of [CP + Zn-porphyrins] complexes does not affect the CP protein oxidase activity. Studies have shown that 30 min illumination of [CP + FS] complexes leads to the changes of the absorption spectra without destroying complexes.

The obtained data indicate that among all the studied [CP + PS] complexes the most effective is the [CP + Zn-TBut4PyP] complex. Illumination of the cell medium in the presence of [CP + Zn-TBut4PyP] complex leads to the reduction of the HeLa cell survival by 86.16%. Hence, [CP + Zn-TBut4PyP] complex is 1.3 times effective than free porphyrin Zn-TBut4PyP and 1.4 times effective than the well-known PS Al-phthalocyanine used in PDT.

Summarizing these results, the studied cationic porphyrins and metalloporphyrins can be effectively used in PDT and APDT, and the obtained complexes of porphyrins and metalloporphyrins with the protein CP can be recommended for PDT of tumors.

