



УДК 577.127.3: 577.112.824

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВЫХ ПИРИДИЛПОРФИРИНОВ С БЫЧИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

© 2004 г. Н. Г. Карапетян^{*,#}, В. Н. Мадакян^{**}

*Кафедра молекулярной физики физического факультета Ереванского государственного университета, Армения, 375025, Ереван, ул. Ал. Манукяна, 1;

**Кафедра фармацевтической химии Ереванского государственного медицинского университета, Армения

Поступила в редакцию 20.01.2003 г. Принята к печати 28.02.2003 г.

Взаимодействие мезо-тетра(4-*N*-гидроксиэтилпиридил)порфирина, мезо-тетра(3-*N*-гидроксиэтилпиридил)порфирина и их цинковых комплексов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) было исследовано методами спектрофотометрии, КД и равновесного диализа при pH 7.2. В электронных спектрах поглощения порфиринов при их титровании БСА наблюдались гипохромное изменение и батохромный сдвиг полосы Soret, а также наличие изоспестической точки. Показано, что при взаимодействии порфиринов с БСА появляются индуцированные, положительные спектры КД в видимой области, что объясняется сорбированием порфиринов на белковой глобуле. Методом равновесного диализа в координатах Скэтчарда определены стехиометрия и константы связывания исследованных порфиринов с БСА. Взаимодействие имеет неспецифический и обратимый характер.

Ключевые слова: круговой дихроизм; пиридилпорфирины; сывороточный альбумин; спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к исследованию порфиринов за последние годы стремительно растет. Широко изучаются как природные, так и синтетические порфирины. Весьма перспективны такие области применения порфиринов, как диагностика и лечение злокачественных новообразований, лечение анемии, нейропсихических нарушений, кожных и глазных заболеваний [1, 2]. Было замечено, что некоторые порфирины способны ингибировать репликацию вируса иммунодефицита человека [3]. Особое направление в лечении онкологических заболеваний занимает фототерапия опухоли с использованием порфиринов в качестве сенситизаторов [4–6]. Эффективность терапевтического действия этих соединений определяется как физическими свойствами самого порфирина, так и спецификой его связывания с биомолекулами, в том числе и с транспортными белками крови [7, 8].

Транспортные процессы играют значительную фармакологическую роль. Известно, что многие лекарственные препараты, как и естественные метаболиты в организме человека и животных, связываются с сывороточным альбумином и пе-

реносятся к клеткам-мишеням. Для многих порфиринов доказана способность к комплексообразованию с белками плазмы – БСА и ЧСА [9, 10].

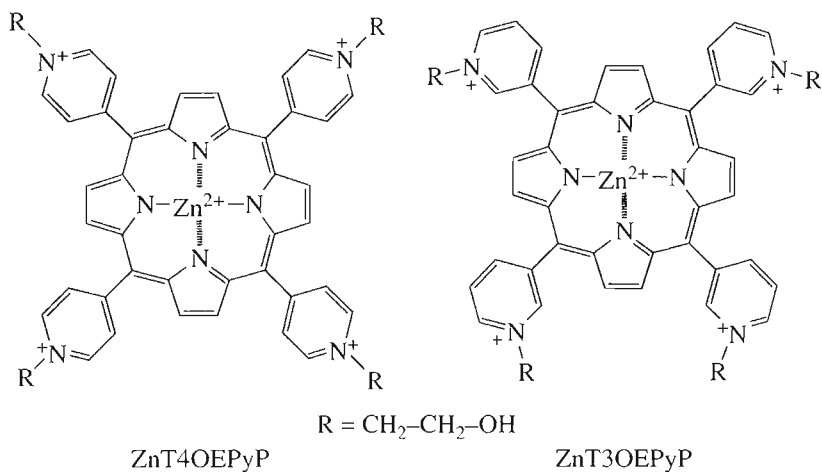
Следует отметить недостаточную изученность вновь синтезируемых порфиринов с точки зрения их биологической активности. Частично восполняя этот пробел, в настоящей работе мы исследовали новые синтетические водорастворимые порфирины: мезо-тетра(4-*N*-гидроксиэтилпиридил)порфирин, мезо-тетра(3-*N*-гидроксиэтилпиридил)порфирин и их цинковые комплексы [11]. Все они являются катионитами – положительные заряды расположены на четырех атомах азота пиридильных заместителей. Порфирины в отсутствие иона металла обладают планарной геометрией. В металлокомплексах порфиринов с цинком ($M = Zn^{2+}$) атом цинка выходит из плоскости порфиринов, так как имеет координационное число, равное пяти. В этом случае координационный центр MN_4 становится пирамидальным, и молекула порфирина имеет один аксиальный лиганд [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее были изучены фармакологические свойства этих соединений, выявлена их противогрибковая, антибактериальная и антивирусная активность. Было показано, что цинксодержащие порфирины увеличивают парциальное давление кислорода артериальной крови, а также обладают общим анальгезирующим действием [13]. Исследовались также и механизмы связывания указанных пор-

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; Т4ОЕРуР – мезо-тетра(4-*N*-гидроксиэтилпиридил)порфирин; Т3ОЕРуР – мезо-тетра(3-*N*-гидроксиэтилпиридил)порфирин; $ZnT4OEPuR$ и $ZnT3OEPuR$ – цинковые комплексы соответствующих порфиринов.

Автор для переписки (тел.: (374-1) 554341; факс: (374-1) 15108; эл. почта: Yeva@ysu.am).



форинов с молекулами ДНК [14]. Однако молекулярные механизмы транспорта этих порфиринов в организме не исследовались. Этим объясняется наш интерес к изучению закономерностей комплексообразования новых синтетических порфиринов с транспортным белком – бычьим сывороточным

альбумином. Эти взаимодействия исследовались методами спектрофотометрии и КД в видимой области при изменении соотношения белок–порфирин в фосфатно-солевом буфере рН 7.2 при 20°C.

На рис. 1 показано изменение полосы поглощения Soret исследуемых порфиринов при их титрова-

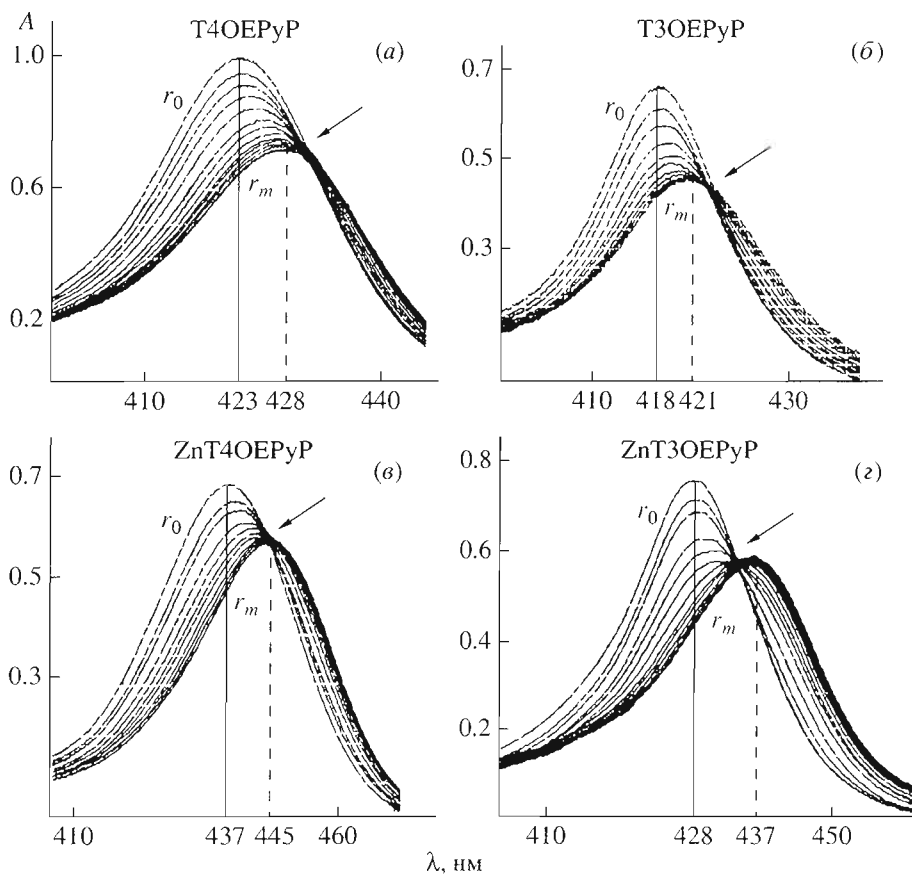


Рис. 1. Электронные спектры поглощения порфиринов и их Zn-комплексов в области полосы Soret при их титровании БСА. Концентрация порфиринов – 5 мкМ, БСА – $0-8 \times 10^{-5}$ М. Символами r_0 и r_m обозначены кривые, соответствующие поглощению чистого порфирина и порфирина при концентрации БСА 8×10^{-5} М. Шаг увеличения концентрации БСА равен 6×10^{-6} М. Стрелками указаны изобеситические точки.

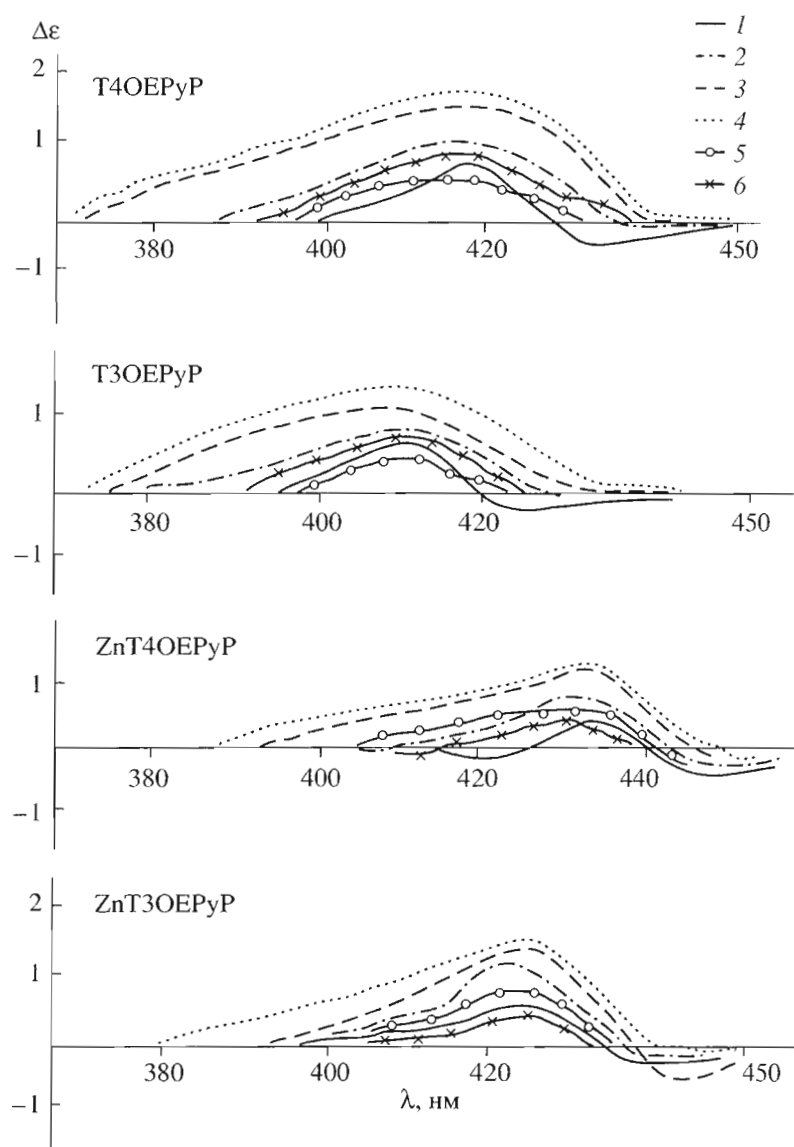


Рис. 2. Спектры КД комплексов БСА с порфиринами при молярных отношениях БСА–порфирин (R), равном 1 (1), 2 (2), 3 (3), 4 (4), $\mu = 0.18$; а также равном 4 (5), при 20°C , $\text{pH } 6.2$, $\mu = 0.18$ и равном 4 (6), при 20°C , $\text{pH } 7.2$, $\mu = 0.5$.

ни раствором БСА. При постоянной концентрации порфиринов и постепенном увеличении концентрации БСА в экспериментах (молярное отношение БСА–порфирин (r) менялось в пределах от 0 до 16) в электронных спектрах поглощения порфиринов наблюдается уширение полосы Soret, его сдвиг максимума поглощения в область более длинных волн, а также значительное падение интенсивности поглощения (табл. 1 и рис. 1). Наблюдаемое гипохромное изменение, скорее всего, можно объяснить появлением в растворе комплексов БСА–порфирин, где хромофор находится в более упорядоченной форме по сравнению со своим свободным состоянием [14]. По мере титрования доля связанного порфирина в растворе возрастает, поэтому и гипохромное изменение растёт

до тех пор, пока весь порфирин не окажется в связанном состоянии, и дальнейшее увеличение концентрации БСА не сказывается на спектрах. Наличие изосбестической точки на спектрах поглощения свидетельствует, что хромофор в растворе может находиться только в двух состояниях – свободном и связанном с БСА. Поэтому мы предполагаем, что каждый из исследованных порфиринов, связываясь с БСА при $\text{pH } 7.2$, образует идентичные комплексы [15, 16].

Взаимодействие порфиринов с БСА исследовали также методом КД в видимой области в диапазоне длин волн 370–450 нм (рис. 2). Использованные в работе порфирины не имеют оптической активности, так как у них отсутствует хиральность. Известно, что белки также в види-

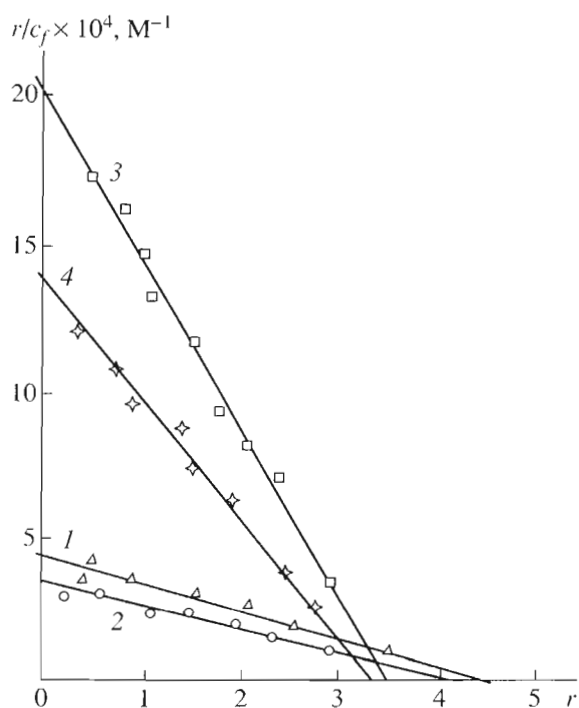


Рис. 3. Графическая зависимость связывания порфиринов с БСА в координатах Скэтчарда: 1 – Т4ОЕРуР, 2 – Т3ОЕРуР, 3 – ZnТ4ОЕРуР, 4 – ZnТ3ОЕРуР. r – молярное отношение связанного порфирина к БСА, c_f – концентрация свободного порфирина.

мой области не поглощают и не имеют спектров КД [17]. Однако комплексообразование порфиринов с БСА приводит к появлению в видимой области спектров КД с положительным эффектом Коттона в области полосы Соре. Индуцированная оптическая активность является результатом асимметрии комплекса белок–порфирин и проявляется в области поглощения порфиринов. Из рис. 2 видно, что положительный сигнал КД растет с увеличением молярного отношения порфирин–альбумин (R) до 4. Дальнейшее увеличение величины R не приводит к изменению спектров КД (на рис. 2 не показано). То, что при титровании альбумина порфирином получаются идентичные

Таблица 1. Данные по спектрофотометрическому титрованию порфиринов БСА при рН 7.2

Порфирины	Полоса Соре чистого порфирина, λ , нм	Максимальный батохромный сдвиг, $\Delta\lambda$, нм	Максимальное гипохромное изменение, %
Т4ОЕРуР	423	5	36
Т3ОЕРуР	418	3	32
ZnТ4ОЕРуР	437	8	17
ZnТ3ОЕРуР	428	9	23

положительные спектры КД, также свидетельствует об едином типе связывания.

Константы связывания ($K_{св}$) и стехиометрию комплекса определяли методом равновесного анализа при титровании БСА возрастающими концентрациями порфиринов. По полученным данным построены изотермы связывания в координатах Скэтчарда (рис. 3). Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, дает число участков связывания порфиринов на БСА (n). Поскольку зависимость линейная, то, очевидно, что каждый из исследуемых порфиринов связывается с идентичными и независимыми участками на молекуле БСА.

Исходя из полученных данных (табл. 2), можно заключить, что положение боковых N -гидроксиэтильных групп в порфиринах почти не сказывается на величине их $K_{св}$. В то же время присутствие иона цинка в порфиринах приводит к увеличению $K_{св}$ более чем в пять раз, что можно объяснить способностью цинка образовывать дополнительную связь с отрицательно заряженными группами на поверхности белка. А уменьшение числа участков связывания, по-видимому, можно объяснить выходом атома Zn из плоскости кольца, что приводит к определенным стерическим ограничениям. Исследования выявили обратимость комплексообразования порфиринов с БСА для всех случаев. В литературе имеются данные по рентгеноструктурному анализу и флуоресценции комплексов альбумин–порфирин. На молекулах БСА и ЧСА предполагают наличие одного или двух специфических и нескольких неспецифических мест связывания для различных порфиринов [18, 19]. Некоторые авторы описывают как жесткое связывание с БСА и ЧСА (молекулы порфирина встроены в неполярные центральные домены белковых матриц, константы связывания $\sim 10^5$ – 10^6 M^{-1}), так и слабое связывание (молекулы порфирина сорбируются на поверхности белковых глобул, константы связывания $\sim 10^3$ – 10^4 M^{-1}) [15, 20, 21]. При сравнении полученных нами результатов с литературными можно заключить, что мы имеем дело со вторым случаем, т.е. исследованные порфирины сорбируются на поверхности БСА. Образовавшийся комплекс стабилизируется за счет электростатических взаимодействий. Этот вывод следует из того, что сывороточный альбумин имеет низкую изоэлектрическую точку, равную 4.6. При рН 7.4 отрицательный заряд альбумина равен 18 [22]. Поэтому он может образовать ионные связи с катионитными порфиринами. Исследованные порфирины, являясь полярными молекулами, не способны проникать в центральные, гидрофобные домены альбумина. Небольшие константы связывания также свидетельствуют о том, что порфирины сорбируются на поверхности белковых глобул.

Корректность наших выводов относительно электростатического характера взаимодействия подтверждают эксперименты по круговому дихроизму и равновесному диализу, проведенные при кислых значениях pH, а также при высокой ионной силе буфера. Показана pH-чувствительность эффекта сорбции порфиринов на белке, например, при pH 6.2, когда частично нейтрализуется отрицательный заряд альбумина, $K_{св}$ уменьшается на два порядка, а увеличение ионной силы (до $\mu = 0.5$) экранирует электростатические взаимодействия и во столько же раз уменьшает $K_{св}$ (не показано). Эти изменения сказываются и на спектрах КД – здесь наблюдается понижение положительного эффекта Коттона (рис. 2, кривые 5, 6). Дальнейшая нейтрализация и экранизация не проводилась, так как молекула БСА чувствительна к изменению pH, ионной силы, температуры среды, и значительные изменения условий эксперимента приводили к конформационным изменениям белка [22].

Таким образом, проведенные исследования природы взаимодействия между Т4ОЕРуР, Т3ОЕРуР, ZnТ4ОЕРуР, ZnТ3ОЕРуР и сывороточным альбумином выявили неспецифический и обратимый характер этих взаимодействий. Такой механизм взаимодействия позволяет установиться равновесию между порфирином, связанным с БСА, и порфирином, связанным с тканевыми элементами. В результате порфирин может накапливаться в тканях, имеющих высокое сродство к нему, оказывать свое терапевтическое действие, а затем вымываться из этих тканей. В то же время электростатический характер связывания дает возможность порфиринам конкурировать с другими веществами, транспортируемыми альбумином. Это придает клиническую ценность данным, касающимся способности альбумина связывать порфирины. В заключение отметим перспективность подобных исследований специфики связывания порфиринов с биологическими структурами в аспекте целенаправленного синтеза лекарственных препаратов на основе порфиринов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали высокоочищенный препарат БСА фирмы “Merck” (ФРГ) (ϵ 47000 при 278–279 нм, M_r 68000), свободный от глобулинов и жирных кислот. Порфирины Т4ОЕРуР, Т3ОЕРуР, ZnТ4ОЕРуР и ZnТ3ОЕРуР были синтезированы на кафедре фармацевтической химии Ереванского государственного медицинского университета по описанной методике [11]. Все эксперименты (где не указано особо) проводили в фосфатно-солевом буфере (0.01 М фосфат натрия, pH 7.2, 0.14 М NaCl, ионная сила $\mu = 0.18$) при температуре 20°C. Используемые в работе реактивы имели квалификацию “ос.ч.”; pH измеряли с помощью pH-мет-

Таблица 2. Параметры связывания порфиринов с БСА и время 50%-ной диссоциации комплексов (t_{50}) при pH 7.2

Порфирины	$K_{св} \times 10^{-4}, M^{-1}$	n^*	$t_{50}, ч$
Т4ОЕРуР	1.1 ± 0.15	4.4 ± 0.1	2.5
Т3ОЕРуР	0.8 ± 0.1	4.2 ± 0.15	2.3
ZnТ4ОЕРуР	5.9 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.5
ZnТ3ОЕРуР	4.4 ± 0.15	3.3 ± 0.2	3.4

* n – число участков связывания порфиринов на БСА.

ра Beckman (США). Непосредственно перед исследованием готовили 10^{-3} М растворы порфиринов в дистиллированной воде. Альбумин растворяли в фосфатно-солевом буфере; концентрацию определяли спектрофотометрически.

Спектральные методы исследования. Спектры поглощения порфиринов регистрировали в области их наиболее интенсивного поглощения – полосы Core (400–470 нм). При спектрофотометрическом титровании концентрация порфиринов в кювете была постоянной (5 мкМ), а концентрация БСА менялась ($0-8 \times 10^{-5}$ М). Измерения проводились в 1-см кювете на спектрофотометре Sperecord UV VIS (ГДР). Спектры КД измеряли на дихрографе Roussel Jouan-II (Франция). В экспериментах концентрация БСА в кювете бралась постоянной (3×10^{-5} М), а концентрация порфирина увеличивалась, так, что молярное соотношение порфирин/альбумин было равно 1, 2, 3, 4, 5.

Равновесный диализ. Для равновесного диализа использовали трубки от Thomas Scientific Products. Внутренний раствор диализного мешка содержал 10^{-5} М БСА. Внешний раствор, против которого проводили диализ, состоял из буфера, содержащего определенные количества порфиринов в интервале $10^{-5}-10^{-4}$ М. Для установления равновесия диализ проводили 20–24 ч при температуре 20°C, после чего спектрофотометрически определяли концентрации свободного и связанного порфирина по изменению значений поглощения внешнего и внутреннего растворов при 420 нм [23]. По полученным данным строили графики зависимости связывания порфиринов с БСА в координатах Скэтчарда [24].

После измерений пробы снова ставили на диализ против буфера с целью выявления обратимости процесса. Диализ проводили в тех же условиях, многократно меняя буфер. Через определенные промежутки времени отбирали пробы и в них спектрофотометрически определяли количество вымываемого порфирина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cuzzocrea S., Zingarelli B., Costantino G. // *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. V. 26. P. 25–33.
2. Tan A., Xu B., Huand S. // *Termochimica Acta*. 1999. V. 333. P. 99–102.
3. Asanaka M., Kurimura T., Toya H. // *AIDS*. 1989. V. 3. P. 403–404.
4. Kvam E. // *J. Moan. Photochem. Photobiol.* 1990. V. 52. P. 769.
5. Bonnett R., White R.D., Winfield U.J. // *Biochem. J.* 1989. V. 261. P. 277.
6. Pandey R.K., Smith K.M., Dougherty T.J. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. P. 2032.
7. Reddy E., Richelli F., Jori G. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1984. V. 12. P. 402–408.
8. Костенич Г.А., Гуринович Г.П., Кочубеев Г.А. Актуальные проблемы онкологии и медрдиологии. Минск: НИИ ОМР МЗ РБ, 1996. Вып. 14. С. 162–173.
9. Bartosova J., Kalousek I., Hrkal Z. // *Int. J. Biochem.* 1994. V. 26. P. 631–637.
10. Trynda-Lemiesz L., Pruchnik F.P. // *J. Inorg. Biochem.* 1997. V. 66. 187–192.
11. Мадакян В.Н., Казарян Р.К., Хачатрян М.А., Степанян А.С., Куртикян Т.С., Ордян М.Б. // *Химия гетероцикл. соед.* 1986. № 2. С. 212–216.
12. Pasternack R.F., Gibbs E.J. // *Metal Ions in Biological Systems* / Eds A. Sigel, H. Sigel. New York: Marcel Dekker, 1996. V. 33. P. 367–397.
13. Мадакян В.Н., Казарян Р.К., Саакян Н.В. // *Мед. наука. Арм.* 1999. Т. 39. С. 50–56.
14. Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G., Ananyan G.V. // *J. of Biomol. Struc. and Dynamics*. 2001. V. 18. P. 677–687.
15. Chatterjee S., Srivastava T.S. // *J. of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2000. V. 4. P. 147–157.
16. Dougherty G., Pilbrow J.R. // *Int. J. Biochem.* 1984. V. 16. P. 1179.
17. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. Т. 3. Пер. с англ. М.: Мир, 1985. С. 179–185.
18. Pandey R.K., Constantine S., Tsuchida T. // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 2770.
19. Tsuchida T., Zheng G., Pandey R.K. // *Photochem. Photobiol.* 1997. V. 66. P. 224–228.
20. Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1975. V. 2. P. 129.
21. Кочубеев Г.А., Фролов А.А., Зенькевич Э.И. // *Молекуляр. биология*. 1988. Т. 22. С. 968–975.
22. Чегер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. Бухарест: Акад. соц. респ. Румынии, 1975. С. 19–80.
23. Westphal U. // *Methods Enzymol* / Ed. Lowenstein J.M. New York–London: Acad. Press, 1969. V. 15. P. 761–796.
24. Scatchard G. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1949. V. 51. P. 660–672.

The Interaction of New Pyridylporphyrins with Bovine Serum Albumin

N. H. Karapetyan** and V. N. Madakyan**

Phone: (374-1) 55-4341; fax: (374-1) 15-108; e-mail: yeva@ysu.am

*Chair of Molecular Physics, Department of Physics, Yerevan State University,
ul. Al. Manoogian 1, Yerevan, 375025 Armenia

**Chair of Pharmaceutical Chemistry, Yerevan State Medical University, ul. Korun 2, Yerevan, 375025 Armenia

The interaction of *meso*-tetra(4-*N*-hydroxyethylpyridyl)porphyrin, *meso*-tetra(3-*N*-hydroxyethylpyridyl)porphyrin, and their zinc complexes with bovine serum albumin (BSA) was studied by electronic spectroscopy, CD, and equilibrium dialysis at pH 7.2. The titration of the porphyrins with BSA was accompanied by a decrease in light absorption and a bathochromic shift of the Soret band, as well as by the appearance of an isobestic point. The porphyrin interaction with BSA also led to the induction of positive CD spectra in the visible region, which is explained by the porphyrin sorption on the protein globule. The equilibrium dialysis helped in determining the stoichiometry of binding and the binding constants of the porphyrins under study with BSA using Scatchard plots. This interaction is nonspecific and reversible. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: circular dichroism, pyridylporphyrins, serum albumin, spectroscopy