

ФОТОГЕНЕРАЦИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ РАДИКАЛОВ В РАСТВОРАХ И КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ, СОДЕРЖАЩИХ ГАЛОГЕНМЕТАНЫ, ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

М. П. Цвирко ^{1*}, В. В. Гуринович ²

УДК 541.14:615.277.3

¹ Университет им. Яна Длугоша в Ченстохове, Ченстохова, Польша; e-mail: m.tsvirko@ujd.edu.pl

² Академия Грейхиллс, Туба Сити, США

(Поступила 26 января 2023)

Исследовано усиление галогенметанами (CCl_4 , CHBr_3) фотосенсибилизируемых Zn-тетрафенилпорфином и Zn-тетраметилпиридилпорфирином деструкции белковых триптофанилов и перекисного окисления липидов в изолированных эритроцитарных мембранах. Показано, что эффект обусловлен фотоиндуцированным переносом электрона от Zn-порфиринов к галогенметанам с образованием высокореакционноспособных галогенметильных радикалов. Гидрофильный Zn-тетраметилпиридилпорфирин более активен в опосредуемой галогенметанами фотосенсибилизации повреждений мембранных белков, в то время как гидрофобный Zn-тетрафенилпорфин эффективнее фотосенсибилизирует окисление липидов.

Ключевые слова: порфирин, галогенметан, радикальная реакция, клеточная мембрана, фотодинамическая терапия.

Enhancement by halomethanes (CCl_4 , CHBr_3) of photosensitized by Zn-tetraphenylporphin and Zn-tetramethylpyridylporphyrin destruction of protein tryptophanils and lipid peroxidation in isolated erythrocyte membranes has been studied. It is shown that the effect is due to photoinduced electron transfer from Zn-porphyrins to halomethanes with the formation of highly reactive halomethyl radicals. Hydrophilic Zn-tetramethylpyridylporphyrin is more active in halomethane-mediated photosensitization of membrane protein damage, while hydrophobic Zn-tetraphenylporphin is more effective in photosensitizing lipid oxidation.

Keywords: porphyrin, halomethane, radical reaction, cell membrane, photodynamic therapy.

Введение. Первичные фотохимические процессы, приводящие к фотодинамическим повреждениям биосистем, в том числе фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических и ряда других заболеваний, могут протекать по двум механизмам (реакции типа I и типа II), которые реализуются с участием активных форм кислорода [1]. В ФДТ наиболее широко используются порфирины, что обусловлено их способностью избирательно накапливаться в солидных опухолях, эффективным поглощением ими света в области оптической прозрачности биологических тканей, высоким квантовым выходом образования их триплетного состояния и большими константами скоростей переноса энергии возбуждения с триплетного состояния на молекулы кислорода. Еще в 1986 г. по инициативе и при непосредственном участии Г. П. Гуриновича были начаты работы по применению хлорина e_6 в качестве фотосенсибилизатора ФДТ [3]. Развитие этих работ привело к созданию и организации промышленного выпуска белорусского препарата для диагностики и фототерапии опухолей “Фотолон”.

Известно, что ФДТ реализуется в основном за счет фотодинамических процессов типа II с участием синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, образующегося за счет переноса энергии [1, 2]. Следовательно, терапевтическое действие в сильной степени зависит от содержания O_2 в опухоли. Однако большин-

PHOTOGENERATION OF CYTOTOXIC RADICALS IN SOLUTIONS AND CELL MEMBRANES CONTAINING HALOMETHANES TO INCREASE THE EFFICIENCY OF ANTITUMOR THERAPY

M. P. Tsvirko ^{1*}, V. V. Gurinovich ² (¹ University Jan Dlugosha in Czestochowa, Czestochowa, Poland; e-mail: m.tsvirko@ujd.edu.pl; ² Greyhills Academy, Tuba City, USA)

ство солидных опухолей гипоксичны, т. е. концентрация кислорода в них значительно ниже, чем в нормальных тканях, так что при ФДТ быстро потребляется свободный кислород [4, 5]. Фотосенсибилизатор не может генерировать цитотоксические радикалы, когда кислород исчерпан. Только когда концентрация кислорода в опухоли восстанавливается, $^1\text{O}_2$ может образоваться снова. В связи с этим для контроля и предотвращения гипоксии при фотооблучении разрабатываются методы мониторинга содержания кислорода в процессе ФДТ в реальном времени [5]. Кроме того, на основании O_2 -зависимой природы ФДТ предложены различные стратегии транспорта кислорода непосредственно к месту опухоли или катализа H_2O_2 в опухолевой ткани с образованием кислорода [6, 7], что повышает эффективность ФДТ для лечения опухоли. Однако такие стратегии ограничены скоростью процессов переноса кислорода и содержанием H_2O_2 в опухоли и не в состоянии обеспечить достаточное количество кислорода для поддержания ФДТ. Поэтому в последнее время большое внимание уделяется развитию не зависимой от кислорода фототерапии [8].

Изучение возможности создания в биосистемах генератора бескислородных цитотоксичных радикалов, приводимого в действие возбужденными молекулами порфиринов, представляет значительный интерес. Работа такого генератора может быть основана на переносе электронов с возбужденных порфиринов на вводимые в систему молекулы некоторых их акцепторов. Ранее было обнаружено [9], что введение галогенпроизводных метана (CCl_4) в эфирные растворы порфиринов и хлорофилла резко снижает их фотохимическую устойчивость. Данные, полученные методами ЭПР, флуоресценции и спектроскопии нестационарного поглощения, показывают [10, 11], что в начальной стадии фотохимической реакции происходит перенос электрона от возбужденной синглетной молекулы пигментов к молекуле CCl_4 . Галогенметаны захватывают электроны синглетно-возбужденных молекул порфиринов с образованием порфириновых катион-радикалов и галогенметановых анион-радикалов CCl_4^- . Анион-радикалы диссоциируют с образованием галогенметильных радикалов $\text{CCl}_3^{\cdot+}$ и Cl^- , обладающих высокой реакционной способностью [9–11]. Одной из основных мишеней фотосенсибилизированного порфирином цитотоксического действия являются клеточные мембраны, в которых, как правило, локализованы сенсибилизаторы, их повреждение приводит к потере функциональной активности и распаду клеток [1, 2, 5, 6]. Поскольку галогенированные углеводороды являются мембранотропными соединениями, это открывает возможность для создания молекулярного фотогенератора их радикалов в клеточных мембранах. Предварительные результаты исследования усиления галогенметанами фотосенсибилизируемых порфиринами повреждений изолированных эритроцитарных мембран представлены в [12].

Эксперимент. В качестве фотосенсибилизаторов использованы гидрофобный Zn-тетрафенилпорфин (Zn-ТФП) (Sigma) и положительно заряженный Zn-5,10,15,20-тетракис(4-N-метилпиридил)порфирин (Zn-ТМПП), обладающие относительно низкими окислительными потенциалами, в качестве акцепторов — имеющие низкие восстановительные потенциалы галогенметаны: четыреххлористый углерод (CCl_4) и бромформ (CHBr_3). Изолированные эритроцитарные мембраны выделяли из эритроцитов человека по методу Доджа [13] и переводили в забуференный фосфатами физиологический раствор (ЗФР) с pH 7.4. Введение порфиринов и галогенметанов в суспензию мембран осуществляли в виде этанольных растворов, тушителя синглетного кислорода азид натрия — в водном растворе. Суспензии мембран (0.2 мг белка/мл), содержащие галогенметаны (0.5 мМ) и Zn-ТФП ($4 \cdot 10^{-7}$ М) или Zn-ТМПП ($6 \cdot 10^{-7}$ М), инкубировали в течение 20 мин в закрытом стеклянном бюксе при 20 °С и постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Освещение проводили светом слайд-проектора (галогеновая лампа накаливания КГМ, 150 Вт), расположенного на расстоянии 15 см от образца, через водяной фильтр, в закрытом стеклянном бюксе, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке, толщина освещаемого слоя 1 см. Перекисное окисление липидов в мембранах определяли по образованию продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [14]. Разрушение триптофанилов мембранных белков и включенных в мембраны порфириновых сенсибилизаторов регистрировали по флуоресценции хромофоров. Измерения проводили непосредственно после освещения образцов.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 приведены спектры флуоресценции Zn-ТФП и Zn-ТМПП в буферном растворе, этаноле и в суспензии теней эритроцитов при возбуждении в максимумах полос Соре. Для всех растворов наблюдается характерная для порфиринов двухполосная флуоресценция. Для Zn-ТФП в этаноле $\lambda_{\text{макс}} = 604$ и 657 нм, а в суспензии мембран полосы флуоресценции несколько уширены и смещены ($\lambda_{\text{макс}} = 610$ и 651 нм). В буферном растворе Zn-ТФП флуоресцирует очень слабо, так как находится в агрегированном состоянии (полоса Соре спектра поглощения

очень уширена, и коэффициент экстинкции в максимуме снижен почти на порядок по отношению к раствору в этаноле). В суспензии мембран интенсивность флуоресценции Zn-ТФП резко возрастает и приближается к таковой в этанольном растворе, что свидетельствует о связывании данного гидрофобного порфирина с мембраной в мономерном состоянии. Для Zn-ТМПП $\lambda_{\text{макс}} = 635$ и 671 нм и практически не зависят от среды. Исходя из полученных результатов трудно говорить о связывании молекул Zn-ТМПП с мембраной, однако приведенные ниже данные о тушении флуоресценции триптофанилов мембранных белков этим порфирином свидетельствуют о таком связывании.

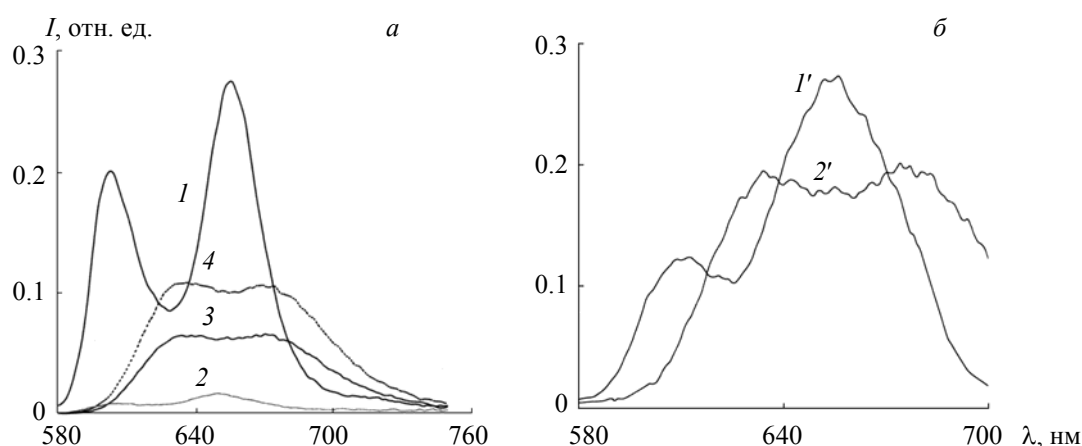


Рис. 1. Спектры флуоресценции Zn-ТФП (1, 1', 2) и Zn-ТМПП (2', 3, 4) в этаноле (1, 3) и в ЗФР (2, 4) (а) и в суспензии эритроцитарных мембран в ЗФР (б); концентрация Zn-ТФП $4 \cdot 10^{-7}$ моль/л, Zn-ТМПП $6 \cdot 10^{-7}$ моль/л; для Zn-тетрафенилпорфина $\lambda_{\text{возб}} = 435$ нм, для Zn-ТМПП $\lambda_{\text{возб}} = 425$ нм

Т а б л и ц а 1. Тушение флуоресценции белковых триптофанилов и порфиринов, фотосенсибилизируемая порфиринами деструкция триптофанилов, окисление мембранных липидов и автосенсибилизируемое фотообесцвечивание порфиринов в эритроцитарных мембранах в присутствии галогенметанов

Процесс	Zn-ТМПП			Zn-ТФП		
	без ГМ	CCl ₄	CHBr ₃	без ГМ	CCl ₄	CHBr ₃
Тушение флуоресценции порфиринов галогенметанами, %	—	18	9	—	нет	80
Тушение флуоресценции триптофанилов порфиринами и галогенметанами, %	5	50	56	нет	50	62
Автосенсибилизируемое фотообесцвечивание порфиринов, %	<4	<2	9	49	70	60
Фотосенсибилизируемая деструкция триптофанилов, %	12	20	24	<4	13	10
Фотосенсибилизируемая деструкция триптофанилов в присутствии 2 мМ NaN ₃ , %	5	27	—	—	—	—
Фотосенсибилизируемое окисление липидов, нмоль/мг белка	0.08	0.56	0.26	0.24	0.54	0.28

П р и м е ч а н и е. Концентрации: мембран 0.2 мг белка/мл; CCl₄ и CHBr₃ 0.5 мМ; Zn-ТФП $4 \cdot 10^{-7}$ М, Zn-ТМПП $6 \cdot 10^{-7}$ М; ГМ — галогенметан.

В присутствии галогенметанов наблюдается тушение флуоресценции Zn-ТМПП в суспензии мембран (табл. 1). Однако для Zn-ТФП введение CCl₄ приводит не к тушению, а к небольшому (на ~10 %) увеличению интенсивности флуоресценции. Отсутствие тушения флуоресценции Zn-ТФП четыреххлористым углеродом связано с тем, что гидрофобный порфирин находится в буферном растворе в слабо флуоресцирующей агрегированной форме, а введение галогенметана увеличивает его растворимость в мембране с переводом в мономерную форму. Данный эффект “маскирует” тушение

возбужденного синглетного состояния галогенметаном. Такая маскировка связана с низкой константой скорости тушения флуоресценции порфиринов галогенметанами в органических растворителях, в частности, для Zn-ТФП в этаноле бимолекулярная константа тушения четыреххлористым углеродом равна $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [9]. При добавлении потенциально более сильного тушителя флуоресценции CHBr_3 , для которого возможно тушение не только по механизму переноса электрона, но и по механизму тяжелого атома, тушение флуоресценции Zn-ТФП наблюдается, причем более сильное, чем в случае Zn-ТМПП. По-видимому, гидрофобный Zn-ТФП, как и галогенметан, локализуется преимущественно в липидном бислое мембраны, в то время как Zn-ТМПП — вблизи мембранных белков, что и приводит к более сильному тушению CHBr_3 в первом случае. Такие представления о локализации в мембране используемых порфиринов согласуются с данными по их влиянию на флуоресценцию белковых триптофанилов. Так, добавление Zn-ТФП к суспензии мембран не влияет на спектр и интенсивность флуоресценции триптофанилов, в то время как Zn-ТМПП тушит (на 5—10 %) их флуоресценцию, вероятно, в результате безызлучательного индуктивно-резонансного переноса энергии от аминокислоты в возбужденном S_1 -состоянии к Zn-ТМПП.

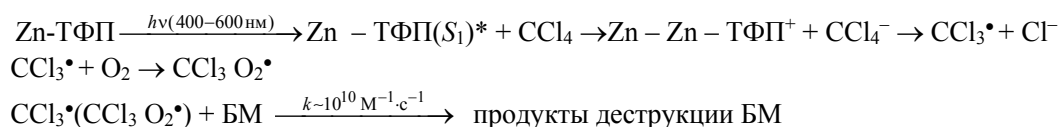
Оба используемых галогенметана сильно тушат флуоресценцию триптофанилов мембранных белков (табл. 1). Такое тушение, очевидно, связано с переносом электрона от возбужденных триптофанилов к галогенметанам, как показано для триптофана в растворе [15]. Это свидетельствует о том, что галогенметаны включаются в мембрану и способны локализоваться вблизи мембранных белков или непосредственно связываться с ними. Таким образом, флуоресцентные исследования показали близкую пространственную локализацию в мембранах фотосенсибилизатора, галогенметана и потенциальной мишени фотоповреждения, что является необходимым условием для функционирования в мембране молекулярного фотогенератора радикалов и деструктивного действия последних.

При освещении мембран видимым светом в присутствии порфиринов наблюдается фотосенсибилизируемая порфиринами деструкция триптофанилов. Наряду с этим происходит перекисное фотоокисление липидов (табл. 1). В присутствии CCl_4 и CHBr_3 выход фотосенсибилизируемой деструкции триптофанилов возрастает в ~2 раза. Галогенметаны также усиливают фотосенсибилизируемое перекисное окисление мембранных липидов. В присутствии CCl_4 наблюдается усиление в 7 раз для Zn-ТМПП и более чем в 2 раза для Zn-ТФП. Эксперименты с тушителем синглетного кислорода азидом натрия показали, что при концентрации 2 мМ азид, как и ожидалось, уменьшает в 2.5 раза эффективность фотосенсибилизируемой деструкции триптофанилов в отсутствие галогенметанов. В то же время он не оказывает ингибирующего влияния на фотодеструкцию триптофанилов в присутствии CCl_4 . Это означает, что фотосенсибилизируемые реакции деструкции триптофанилов и перекисного окисления липидов в присутствии галогенметанов протекают без участия синглетного кислорода. Эффект усиления галогенметанами фотодеструкции основных компонентов мембраны, скорее всего, связан с возникновением нового радикального канала фотоиндуцируемых реакций.

Рассмотрим возможные механизмы сенсibiliзируемых порфиринами процессов в мембранах в присутствии галогенметанов. Известно, что в растворах галогенметаны тушат нижнее возбужденное синглетное состояние порфиринов по механизму переноса электрона с образованием катион-радикалов порфиринов и анион-радикалов галогенметанов [9—11]. При освещении хлорметановых растворов порфиринов в полосах поглощения наблюдается фотодеструкция порфиринов, квантовый выход которой возрастает с уменьшением окислительного потенциала порфирина и уменьшением потенциала полуволны полярографического восстановления галогенметанов, характеризующего усиление их акцепторных свойств. Первичным процессом этой фотореакции является перенос электрона с образованием высокореакционноспособных радикалов галогенметанов [10]. Отметим, что при воздействии УФ-излучением на изолированные эритроцитарные мембраны в присутствии CHCl_3 или CCl_4 также происходит образование таких радикалов, обусловленное переносом электрона от возбужденных молекул триптофанилов на галогенметаны, что проявляется в усилении фотодеструкции мембранных белков и перекисного окисления липидов [16].

На основании полученных данных и результатов [9—11] можно предложить следующий механизм усиления галогенметанами фотосенсибилизируемой порфиринами деструкции мембран. Галогенметаны захватывают электроны с порфиринов в синглетном возбужденном состоянии с образованием катион-радикала порфиринов и анион-радикалов галогенметанов. Последние распадаются с образованием галогенметильных радикалов, имеющих очень высокую реакционную способность (бимолекулярные константы скоростей взаимодействия с биологическими молекулами близки к диффузионно контролируемым) [17]. Известно также, что в присутствии кислорода галогенметиль-

ные радикалы образуют перекисные радикалы $\text{CCl}_3 \text{O}_2^\bullet$ с еще более высокой реакционной способностью [17]. Схему усиления галогенметанами сенсibiliзируемых порфиринами повреждений биомолекул (БМ) можно представить в виде



Оценка потенциальной возможности создания молекулярного фотогенератора цитотоксических галогенметильных радикалов может быть сделана на основе определения изменений свободной энергии Гиббса ΔG для процесса переноса электрона от возбужденных в S_1 -состоянии порфиринов к галогенметанам. Показано, что для CCl_4 и CHBr_3 (потенциалы полувольты полярографического восстановления $E_{\text{вос}} = -0.78$ и -0.67 В) $\Delta G < 0$, т. е. с энергетической точки зрения процесс переноса электрона с используемых Zn-порфиринов в S_1 -состоянии на CCl_4 и CHBr_3 возможен. В то же время такой процесс с участием CHCl_3 ($E_{\text{вос}} = -1.6$ В) энергетически маловероятен, так как $\Delta G > 0$ [12]. Проведенные исследования показали, что хлороформ не тушит флуоресценцию Zn-порфиринов в суспензии мембран и не усиливает фотосенсибилизируемую им деструкцию компонентов мембран.

Заключение. Освещение мембран изолированных эритроцитов видимым светом в присутствии Zn-порфиринов приводит к фотосенсиблизированной порфиринами деградации триптофанилов и пероксидному фотоокислению липидов. В присутствии CCl_4 или CHBr_3 выход фотосенсиблизированной порфиринами деградации триптофанилов увеличивается в ~ 2 раза. Для фотосенсиблизированного перекисного окисления мембранных липидов в присутствии CCl_4 получено усиление в 7 раз для ZnTMPP и более чем в 2 раза для ZnTPP. Полученные данные открывают возможность создания в клеточных мембранах донорно-акцепторных систем на основе порфиринов и галогенметанов, реализующих фотоиндуцируемый перенос электронов с синглетно-возбужденных молекул сенсibilизатора на молекулы акцептора. Образующиеся при этом радикалы галогенметанов проявляют высокую эффективность в деструктивном действии на основные компоненты клеточных мембран (белки и липиды).

Авторы выражают благодарность А. В. Воробью (Институт физики НАН Беларуси) за помощь в проведении измерений.

- [1] A. F. Mironov, K. A. Zhdanova, N. A. Bragina. Russ. Chem. Rev., **87**, N 9 (2018) 859—881
- [2] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Vessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng. J. Natl. Cancer Instrum., **90**, N 12 (1998) 889—905
- [3] A. A. Frolov, Yu. M. Arkatov, G. P. Gurinovich, G. A. Kochubeev, M. V. Sarzhevskaya, S. N. Cherenkevich. Dokl. Akad. Nauk SSSR, **291** (1986) 715—719 (in Russ.)
- [4] J. Liu, X. Zhao, W. Nie, Y. Yang, C. Wu, W. Liu, K. Zhang, Z. Zhang, J. Shi. Theranostics, **11**, N 1 (2021) 379—396
- [5] T. C. Zhu, J. C. Finlay. Med. Phys., **35**, N 7 (2008) 3127—3136
- [6] B. Pucelik, A. Sulek, A. Barzowska, J. M. Dąbrowski. Cancer Lett., **492** (2020) 116—135
- [7] G. Li, Q. Wang, J. Liu, M. Wu, H. Ji, Y. Qin, X. Zhou, L. Wu. J. Mater. Chem. B, **9**, N 36 (2021) 7347—7370
- [8] L. Hong, J. Li, Y. Luo, T. Guo, C. Zhang, S. Ou, Y. Long Z. Hu. Biomolecules, **12**, 81 (2022)
- [9] В. В. Гуринович, Е. И. Сагун, М. П. Цвирко. Журн. прикл. спектр., **47**, № 3 (1987) 465—469 [V. V. Gurinovich, E. I. Sagun, M. P. Tsvirko. J. Appl. Spectr., **47** (1987) 942—946]
- [10] В. В. Гуринович, М. П. Цвирко. Журн. прикл. спектр., **54**, № 5 (1991) 768—772 [V. V. Gurinovich, M. P. Tsvirko. J. Appl. Spectr., **54** (1991) 458—461]
- [11] В. В. Гуринович, М. П. Цвирко. Журн. прикл. спектр., **68**, № 1 (2001) 82—87 [V. V. Gurinovich, M. P. Tsvirko. J. Appl. Spectr., **68** (2001) 110—117]
- [12] V. V. Gurinovich, A. V. Vorobei, M. P. Tsvirko. High Energy Chem., **44**, N 3 (2010) 267—271
- [13] J. T. Dodge, C. Mitchel, D. J. Hanahan. Arch. Biochem. Biophys., **100**, N 1 (1966) 119—127
- [14] J. Stocks, T. L. Dormandy. Brit. J. Haemat., **20** (1971) 95—102
- [15] С. В. Пинчук, А. В. Воробей. Журн. прикл. спектр., **59**, № 4 (1993) 312—317 [S. V. Pinchuk, A. V. Vorobei. J. Appl. Spectr., **59** (1993) 711—715]
- [16] С. В. Пинчук, А. В. Воробей. Биофизика, **45**, № 3 (2000) 839—843
- [17] M. Lal, C. Schoneich, J. Monig, K.-D. Asmus. Int. J. Radiat. Biol., **54**, N 5 (1988) 773—785