

ФОТОХИМИЯ
И МАГНЕТОХИМИЯ

УДК 541.64:541.14:539.199

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА В ПРОЦЕССАХ
СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ
ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

© 2019 г. А. Б. Соловьева^{a,*}, Н. Н. Глаголев^a, Н. А. Аксенова^{a,b}, А. С. Курьянова^{a,b}, А. Ф. Ванин^{a,b},
В. А. Тимофеева^a, П. С. Тимашев^{a,b}

^a Российская академия наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, Москва, Россия

^b Институт регенеративной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

* e-mail:anna@polymer.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 04.07.2018 г.

После доработки 16.11.2018 г.

Принята к публикации 19.11.2018 г.

Показано, что эффективность процесса фотосенсибилизированного окисления органических субстратов в водной среде (на примере окисления триптофана) может не зависеть от введения в реакционную среду биологически-активных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами, если в среде присутствует плуроник F127, тройной блок сополимер этилен и пропиленоксида, концентрация которого превышает ККМ. В этом случае молекулы фотосенсибилизатора локализуются в мицеллах плуроника и экранируются от разрушающих воздействий радикалов NO[•], образующихся при фоторазложении молекул ДНКЖ. Тем самым открывается принципиальная возможность проведения процедур фотодинамической терапии (ФДТ) – фотоиндуцированных процессов некроза и апоптоза клеток патологических тканей с одновременным инициированием при фоторазложении молекул ДНКЖ регенеративно-репарационных процессов “обработанных” тканей.

Ключевые слова: димегин, фотоокисление триптофан, динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами, фотодинамическая терапия

DOI: 10.1134/S0044453719090279

Фотодинамическая терапия (ФДТ) различного типа новообразований и инфицированных ран (гнойных ран, пролежней и трофических язв) подразумевает не только фотоиндуцируемые (лазерные, фотодиодные) воздействия на патологические ткани с некрозом или апоптозом пораженных клеток, но и эффективную динамику последующих регенеративных процессов грануляции и эпителизации тканей, инициируемых иммунной системой организма в тканях, приграничных с поврежденными тканями новообразований или инфицированных ран. Именно таким образом понимается механизм подавления роста раковых опухолей, открытый Т. Hongjo [1]. Оказалось, что на поверхности раковой опухоли образуются специальные рецепторы, которые проявляют себя как иммуносупрессоры, т.е. ограничители (“подавители”) иммунитета. Их сигналы как бы “обманывают” иммунную систему, и Т-лимфоциты перестают реагировать на раковые клетки. Поэтому задача ФДТ должна состоять в подавлении, и

только в подавлении активности таких иммуносупрессоров, чтобы регенеративные системы организма могли проявлять свою активность в полной мере. И как показал опыт первых исследований в ФДТ раковых новообразований, использование мощных лазерных источников (энергии в импульсе могли достигать до 1000 Дж) для уничтожения “без следа” наиболее злокачественных опухолей к успехам не приводило. В настоящее время при ФДТ новообразований обычно применяются относительно низкоэнергетические воздействия, как правило, с использованием фотосенсибилизаторов (ФС), и при проведении каждой из таких процедур (в течение от получаса до нескольких часов) поглощается доза в несколько сотен Дж/см² [2–5].

Можно полагать, что не только новообразования, но и патологически развивающиеся ткани инфицированных ран “защищают себя”, продуцируя в области своей границы свои иммуносупрессоры. И задача ФДТ инфицированных ран,

когда интенсивности фотооблучения и энергия, вкачиваемая при проведении каждой из процедур, как правило, на порядок и более, меньше, чем при ФДТ раковых опухолей, должна состоять тоже в выборе оптимальных режимов фотодинамических воздействий на патологические ткани и системы *in vivo*. Это позволит согласовать скорость подавления иммуносупрессоров со скоростью восстановительных процессов в условиях воздействия иммунной системы, чтобы решить основную задачу – после прекращения лазерных воздействий создать условия для развития регенерационно-восстановительных процессов в организме. Очевидно, что для решения каждой конкретной проблемы должны подбираться свои условия и режимы ФД-воздействий. В частности, согласно [6], при артериальной гипертензии для придания кровеносным сосудам большей гибкости проводили внутривенную лазерную терапию, и через оптоволокно вводился световой поток (длина волны $\lambda = 635$ нм) с плотностью мощности 0.2 Вт/см² в течение 900 с (10 процедур), так что общая энергетическая доза составляла 180 Дж/см² [6]. Поскольку при процедурах светового облучения крови целевые компоненты крови как объекты для некроза или апаптоза обычно не обсуждаются, можно полагать, что в данных случаях основным объектом энергетического воздействия оказываются факторы иммунной системы.

В случаях ФДТ инфицированных ран или патологических тканей плотность энергетических световых воздействий может быть на порядок или два выше. Так, при ФДТ венозных язв (venous ulcers) плотность энергетической дозы при $\lambda = 660$ нм составляла 20 – 30 Дж/см², а общая доза за процедуру составляла 250 – 350 Дж при общем количестве – пять процедур [7]. Но и в этих случаях речь идет о создании условий для оптимального инициирования последующих регенерационных процессов, поскольку основным показателем эффективности ФДТ инфицированных ран (гнойных ран, пролежней и трофических язв) являются сроки грануляции и эпителизации тканей, инициируемых иммунной системой организма [8]. На основе именно таких оценок уровень энергетических воздействий при ФДТ инфицированных ран следует в определенной степени минимизировать, чтобы инициировать, но не подавлять в какой-либо мере возможности регенеративных систем организма.

Контролируемое понижение уровня световых воздействий при ФДТ означает и возможное снижение до определенных значений концентрации фотосенсибилизаторов, в частности, порфириновых ФС – ПФС, что крайне важно и для решения еще одной актуальной проблемы фотодинамической терапии – снижения неизбежной фототоксичности таких соединений, остающихся в крови

пациентов после процедур ФДТ, особенно при внутривенном введении ФС в организм. Именно для снижения эффектов фототоксичности предпринимается постоянный поиск фотосенсибилизующих систем, связанный с использованием совместно с ПФС различных водорастворимых полимеров. Это позволяет понизить концентрацию ПФС для достижения определенного уровня терапевтического воздействия за счет “полимерных эффектов” [9]. Прежде всего, такие эффекты связываются с образованием комплексов ПФС с фрагментами используемых водорастворимых амфифильных полимеров (АП) [10], что определяет дезагрегацию ассоциатов ПФС, обычно образующихся в водных средах, в том числе, при образовании лекарственных форм на основе гелей.

В связи с возможностями понижения концентраций ФС и перехода к меньшим энергетическим дозам фотовоздействия при выборе оптимальных режимов ФДТ, обеспечивающих проявление наибольшей эффективности регенеративных процессов, возникает естественный вопрос, возможно ли, используя внешние воздействия или препараты, повысить эффективность регенеративно-репарационных (восстановительных) процессов в условиях проведения сеансов ФДТ. Прежде всего, укажем на возможность (см., например, [11]) инициирования иммунно-корректирующих эффектов при воздействии непосредственно на рану излучения светодиодов с различными длинами волн (470 , 530 и 630 нм). Другая возможность, предложенная в работе [12], состоит при проведении процедур ФДТ в условиях, когда наряду с фотосенсибилизатором в систему вводится компонент (фактор), известный как инициатор регенеративно-репарационных процессов в организме. В качестве такого фактора было предложено рассматривать, прежде всего, оксид азота и некоторые его производные, в том числе, динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами [12]. Оксид азота – многофункциональная сигнальная молекула, управляющая внутриклеточными и межклеточными процессами в животных, бактериальных и растительных организмах и оказывающая как промотирующее (регуляторное, защитное), так и ингибирующее действие на метаболизм [13–18].

При изучении механизма разложения ДНКЖ в условиях фотоинициирования следует иметь в виду, что динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами (ДНКЖ) существуют в моно- и биядерной форме (М- и Б-ДНКЖ), причем форма Б-ДНКЖ – диамагнитна, а М-ДНКЖ идентифицируется по характерному для них сигналу электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) со средним значением g -фактора $g_{cp} = 2.03$ [19]. В соответствии с результатами [20], при рассмотрении биомедицинских эффектов воздействия ДНКЖ с тиол-содержащими ли-

гандами различия в биологической активности форм М- и Б-ДНКЖ обычно не обсуждаются, и лишь в нескольких случаях указывается на определяющую роль формы Б-ДНКЖ с глутатионом в достижении цитотоксического действия в экспериментах на крысах. Как было показано в [12], в условиях фотосенсибилизирующего окисления органических субстратов молекулярным кислородом в водной среде на указанный процесс фактически оказывает влияние лишь одна из форм ДНКЖ, и именно, Б-ДНКЖ, выполняя роль инициатора репарационных процессов. В последующем тексте при использовании аббревиатуры ДНКЖ мы будем иметь в виду Б-ДНКЖ.

Основная проблема совместного использования ПФС и ДНКЖ при терапии патологических тканей и новообразований состоит в том, что синглетный кислород, продуцируемый при воздействии на ПФС и выступающий как основной фактор поражения фрагментов клеток патологических тканей, гибнет при взаимодействии с продуктами окислительной деструкции ДНКЖ, прежде всего, пероксинитритом [12]. Впервые успешные примеры совместного использования ПФС и ДНКЖ были представлены в работе [12], где в качестве ПФС использовался фотодитазин (ФДн) – диглутаминовая соль хлорина при проведении терапии модельных ран у крыс. В этой же работе были представлены и результаты предварительного поиска условий, при которых оказалось возможным добиться проявления совместной активности ФДн и ДНКЖ в модельном процессе фотоиницируемого окисления органического субстрата – триптофана. Оказалось, что разрушающее воздействие синглетного кислорода на ДНКЖ при фотоиницировании процесса окисления триптофана удалось практически исключить при введении в реакционную систему в качестве АП молекул плуроника F127, тройного блок сополимера этилен и пропиленоксида с м.м. 12600 Да и соотношением пропилен-этиленоксидных группировок – 65/200, при концентрациях молекул плуроника F127, превышающих ККМ. Отсутствие указанных разрушающих воздействий на ДНКЖ, равно как и фиксируемое исключение гибели молекул ПФС из-за взаимодействия с радикалами NO^\bullet , образующимися при фоторазложении ДНКЖ, позволяло полагать, что процесс окисления триптофана происходил непосредственно в объеме мицелл плуроника.

Тем самым, по-видимому, впервые удалось показать, как процедуры фотосенсиблированного воздействия на органические субстраты при ФДТ могут быть совмещены с одновременным инициированием регенеративно-репарационных процессов в организме. При этом важно подчеркнуть, что плуроник F127, предотвращающий фотодеграцию ПФС, инициируемую ДНКЖ в рассматриваемом процессе, является разре-

шенным медицинским препаратом, использование которого в медицинской практике разрешено. При этом возникает вопрос, насколько ДНКЖ может выполнять роль инициатора регенеративно-репарационных (восстановительных) процессов в условиях ФДТ при использовании иных ПФС, разрабатываемых или обычно используемых в медицинской практике, и при наличии в системе плуроника F127. В данной статье этот вопрос разрешается для одного из разрабатываемых в настоящее время фотосенсибилизаторов – димегина при исследовании модельного процесса фотосенсиблированного окисления в водной среде триптофана при разных составах реакционной смеси.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве порфиринового фотосенсибилизатора использовали динатриевую соль 2,7,12,18-тетраметил-3,8-ди(1-метоксиэтил)-13,17-ди(2-оксикарбонилэтил) порфирина (димегин, ДМГ). В качестве АП использовали плуроник F127 (тройной блок сополимер этилен и пропиленоксида, м.м. 12600 Да). Динитрозильные комплексы железа синтезировали по методу, описанному в [21]. В качестве АП использовали плуроник F127 с мол. массой 12600 Да и соотношением пропилен-этиленоксидных группировок – 65/200.

Фотоокисление триптофана (ТФ) (“ч. д. а.”) осуществлялось за счет растворенного в воде молекулярного кислорода в кварцевой кювете (толщина $l = 1$ см) при комнатной температуре при перемешивании с помощью магнитной мешалки. Концентрация триптофана составляла 1.0×10^{-5} моль/л, ДМГ – 1.5×10^{-6} моль/л. Концентрация ДНКЖ менялась от 1.7×10^{-6} до 2.0×10^{-5} моль/л, концентрация F127 – от 0 до 5.0×10^{-4} моль/л, что существенно превышало критическую концентрацию мицеллообразования, составляющую $\sim 10^{-6}$ М. Освещение реакционной смеси осуществляли светодиодом АФС (длина волны $\lambda = 400$ нм, мощность – 86 мВт, плотность потока мощности – 3.6 мВт/см², освещенность образца – 1.05 клк). Кинетику процесса фотоокисления фиксировали по уменьшению интенсивности фотолюминесценции триптофана ($\lambda_{\text{ex}} = 275$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 355$ нм). Спектры фотолюминесценции снимали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). За кинетикой процесса фотодеструкции ДМГ, ФДТ, ДНКЖ следили по уменьшению оптической плотности УФ-полос поглощения в водной среде указанных соединений – $\lambda = 395, 405, 310$ и 335 нм, соответственно. УФ- и электронные спектры поглощения (ЭСП) растворов снимали на спектрофотометре Cary 50 (Varian).

Получение наблюдаемой константы k_{obs} скорости фотоокисления триптофана на основе про-

водимых экспериментов осложнялось тем, что при включении светодиода в момент времени $t = 0$ одновременно с уменьшением концентрации $C^{\text{TP}}(t)$ триптофана в реакционной среде фиксировалось уменьшение концентраций $C^{\text{PPS}}(t)$ [$C^{\text{DMG}}(t)$ и $C^{\text{PD}}(t)$] и $C^{\text{DNCF}}(t)$ – ПФС (ДМГ и ФДн) и ДНКЖ соответственно. Уравнение для кинетики фотоокисления триптофана представлялось следующим образом:

$$\frac{dC^{\text{TP}}(t)}{dt} = -kC^{\text{TP}}(t)C^{\text{PPS}}(t)C^{\text{DNCF}}(t). \quad (1)$$

Здесь k – константа скорости фотосенсибилизированного окисления триптофана, так что при $C^{\text{TP}}(0) \equiv C_0^{\text{TP}}$ получаем:

$$C^{\text{TP}}(t) = C_0^{\text{TP}} \exp \left[-k \int_0^t C^{\text{PPS}}(\tau)C^{\text{DNCF}}(\tau)d\tau \right]. \quad (2)$$

В дальнейшем будем определять наблюдаемую константу k_{obs} скорости фотоокисления триптофана по уменьшению флуоресценции триптофана, анализируя линейный участок соответствующей кинетической зависимости, в течение которого окисляется примерно 20% количества триптофана в исходном растворе. При этом, как это следует из выражения (2), необходимо одновременно исследовать кинетику фотодеструкции ПФС и ДНКЖ, т.е. фиксировать соответствующие зависимости $C^{\text{PPS}}(t)$ и $C^{\text{DNCF}}(t)$. Ниже будет показано, что в исследуемом временном интервале $[0, \Delta t]$ фотоокисления триптофана и при выбранных концентрациях всех компонентов, участвующих в исследуемом процессе фотоокисления триптофана, интегральное выражение в показателе экспоненты (2) с достаточной относительной точностью (~5%) может быть представлено в виде линейной зависимости от времени:

$$\chi(\Delta t) \equiv \int_0^{\Delta t} C^{\text{PPS}}(\tau)C^{\text{DNCF}}(\tau)d\tau \approx \xi\Delta t, \quad (3)$$

и кинетика процесса окисления триптофана на указанном интервале имеет простой вид:

$$\Delta C^{\text{TP}} \equiv C_0^{\text{TP}} - C^{\text{TP}}(\Delta t) = C_0^{\text{TP}}k\xi\Delta t. \quad (4)$$

Поэтому константу $k_{\text{obs}}^{\text{TP}}$ скорости фотоокисления триптофана представляем в виде, учитывая, что фиксируемая интенсивность фотолюминесценции триптофана пропорциональна его концентрации в рабочей ячейке:

$$k_{\text{obs}}^{\text{TP}} = k^{\text{TP}}\xi = \frac{\Delta I}{I_0\Delta t}, \quad (5)$$

где I_0 и ΔI – соответственно интенсивность люминесценции триптофана (в приборных едини-

цах, а.у.) и изменение этой интенсивности при фотоокислении за время Δt . Истинная константа скорости окисления триптофана в каждом конкретном условиях определяется согласно:

$$k^{\text{TP}} = k_{\text{obs}}^{\text{TP}}/\xi, \quad (6)$$

имея в виду, что величина ξ находится численно с учетом конкретных условий процесса фотоокисления триптофана.

Можно вводить также эффективную константу k_{eff} скорости фотоокисления триптофана, приходящуюся на одну молекулу ПФС, определяя такую константу согласно $k_{\text{eff}}^{\text{TP}} = k_{\text{obs}}^{\text{TP}}/C^{\text{PPS}}$.

Константы $k_d^{(i)}$ скорости фотодеструкции ДМГ и ДНКЖ рассчитывали по линейному участку соответствующих кинетических кривых согласно: $k_d^{(i)} = \Delta C^{(i)} / (C_0^{(i)}\Delta t)$, где $C_0^{(i)}$ и $\Delta C^{(i)}$ – соответственно исходная концентрация i -го компонента – ДМГ, ДНКЖ, и изменение концентрации соответствующего компонента при фотоокислении за время Δt . Как было показано ранее [22], существенное влияние на кинетику исследуемых процессов и, соответственно, на константу скорости фотосенсибилизированного окисления органических субстратов оказывает наличие в реакционной смеси АП, в качестве которого в данной работе использовался плуроник F127. При этом облучение светодиодом с длиной волны $\lambda = 400$ нм не оказывало воздействия на плуроник.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Была исследована фотосенсибилизирующая активность ДМГ в отсутствие и в присутствии плуроника F127 в реакционных системах на примере модельной реакции фотоокисления триптофана при введении в реакционную смесь ДНКЖ. Исходные концентрации C_0^{TP} и C_0^{PPS} (C_0^{DMG} и C_0^{PD}) соответственно, триптофана и фотосенсибилизатора во всех экспериментах составляли 1×10^{-5} М и 1.5×10^{-6} М. Концентрация ДНКЖ варьировалась в пределах от нуля до 5.5×10^{-5} М, а концентрация плуроника F127 – от нуля до 55×10^{-5} М. Ниже мы ограничимся лишь частичным представлением полученных зависимостей. На некоторых примерах показано, каким образом проводился анализ кинетических зависимостей для получения общих заключений о роли разных компонентов в реакционной среде для установления их оптимальных концентраций при проведении фотосенсибилизированных процессов окисления органических субстратов, а также сеансов ФДТ.

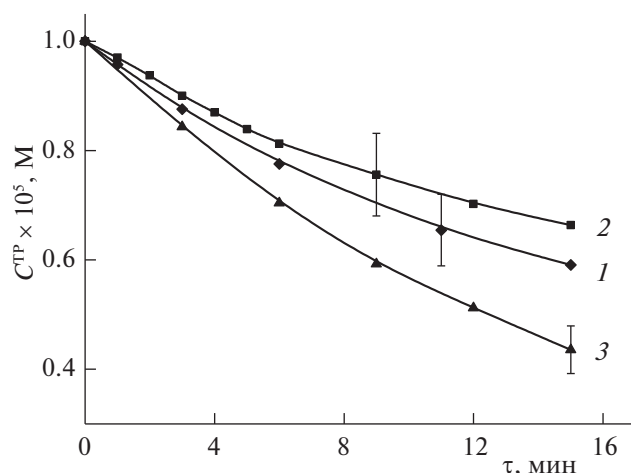


Рис. 1. Изменение концентрации триптофана в процессе реакции фотоокисления при следующих исходных концентрациях компонентов в системе: $C_0^{\text{DMG}} = 1.5 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_0^{\text{TP}} = 1 \times 10^{-5}$ М, $C_0^{\text{DNCF}} = 2.0 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_0^{\text{F127}} = 5.0 \times 10^{-5}$ моль/л; 1 – фотоокисление в присутствии DMG; 2 – фотоокисление в присутствии DMG и DNCF; 3 – фотоокисление в присутствии DMG, солюбилизированного плуроником F127, и DNCF.

На рис. 1 представлена кинетика убыли концентрации триптофана в процессе фотосенсибилизированного окисления растворенным в водной среде молекулярным кислородом при заданных в реакционной среде концентрациях DMG, ДНКЖ и плуроника F127. Каждое из значений результатов измерений, приводимых на этом рисунке, а также на всех последующих рисунках, является средней величиной трех независимых измерений. Для всех приводимых величин ошибки не превышали 10%.

Как указывалось выше, при анализе представленных на рис. 1 зависимостей с целью получения информации о величинах наблюдаемых констант скоростей фотосенсибилизированного окисления триптофана необходимо фиксировать одновременно с уменьшающейся концентрацией $C^{\text{TP}}(t)$ триптофана в реакционной среде уменьшающиеся концентрации $C^{\text{PPS}}(t)$ и $C^{\text{DNCF}}(t)$ – ПФС и ДНКЖ соответственно. В исследуемых нами системах фиксируемые степени превращения этих компонентов варьировались от 10–15% до 50%. На рис. 2 и 3 для примера представлены зависимости $C^{\text{DMG}}(t)$ и $C^{\text{DNCF}}(t)$, фиксируемые при исследовании кинетических зависимостей окисления триптофана, представленных на рис. 1, когда в качестве ПФС использовался димегин. На рис. 4 представлены результаты численных расчетов (точки) зависимостей $\chi(\Delta t)$, получаемых в со-

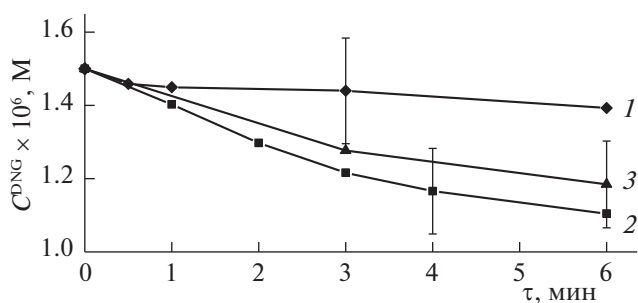


Рис. 2. Изменение концентрации димегина в процессе реакции фотоокисления триптофана при следующих исходных концентрациях компонентов в системе: $C_0^{\text{DMG}} = 1.5 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_0^{\text{TP}} = 1 \times 10^{-5}$ М, $C_0^{\text{DNCF}} = 2.0 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_0^{\text{F127}} = 5.0 \times 10^{-5}$ моль/л; 1 – фотоокисление в присутствии DMG, 2 – фотоокисление в присутствии DMG и ДНКЖ, 3 – фотоокисление в присутствии DMG, солюбилизированного плуроником F127, и ДНКЖ.

ответствии с выражением (3), и соответствующие интерполяционные линейные зависимости, определяющие параметры ξ , с использованием которых на основе выражений (5) и (6) определяются константы скорости углы рассматриваемых процессов.

Найденные на основе этих зависимостей параметры и константы скорости окисления триптофана в водной среде при рассматриваемом содержании компонентов в реакционной среде представлены в табл. 1.

Очевидно, что фотодеградация DMG в процессе окисления триптофана приводит к понижению константы $k_{\text{obs}}^{\text{TP}}$ скорости его окисления, то есть к уменьшению функциональной активности рассматриваемой фотосенсибилизирующей (ФС)

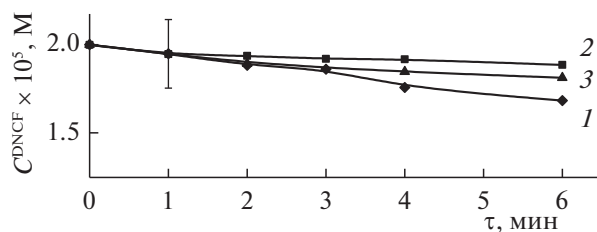


Рис. 3. Изменение концентрации ДНКЖ в процессе реакции фотоокисления триптофана при следующих исходных концентрациях компонентов в системе: $C_0^{\text{DMG}} = 1.5 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_0^{\text{TP}} = 1 \times 10^{-5}$ М, $C_0^{\text{DNCF}} = 2.0 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_0^{\text{F127}} = 5.0 \times 10^{-5}$ моль/л; 1 – фотоокисление в присутствии DMG и ДНКЖ; 2 – фотоокисление в присутствии DMG, солюбилизированного плуроником F127, и ДНКЖ; 3 – фотолитиз раствора ДНКЖ.

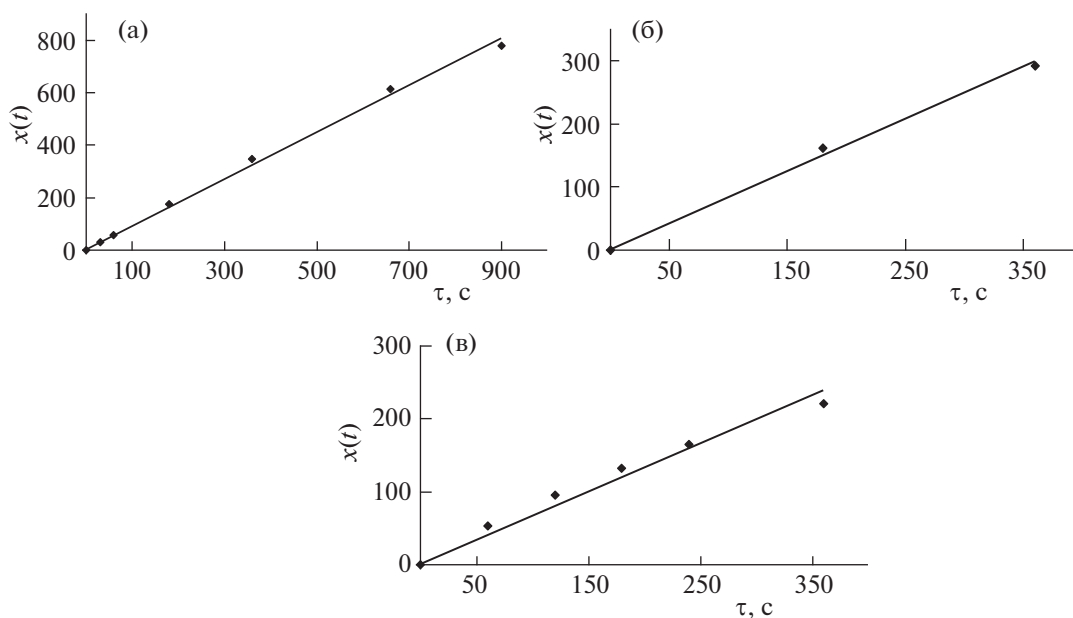


Рис. 4. Зависимости (3), построенные для расчета величин k^{TP} , соответствующих кинетическим зависимостям, представленным на рис. 1: кривой 1 – а, кривой 2 – б, кривой 3 – в.

системы. Наличие в реакционной системе комплексов ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами приводит к усилению деградации ДМГ из-за взаимодействия продуктов фотоокислительной деградации ДНКЖ непосредственно с порфириновым макроциклом [12]. Для получения соответствующих количественных оценок был исследован процесс фотолиза ДМГ при наличии или отсутствии в реакционной среде ДНКЖ. В обоих случаях в среде отсутствовал триптофан, наличие которого затрудняло бы получение количественной информации о содержании ДНКЖ реакционной среде, поскольку полосы поглощения продуктов разложения триптофана и ДНКЖ практически совпадают (290–310 нм и 310–360 нм соответственно). Оказалось, что в присутствии

ДНКЖ (при концентрациях, используемых обычно в реакциях фотоокисления триптофана – см. рис. 2 и 3), константа скорости фоторазложения димегина возрастает более, чем на порядок. Было показано также, что аналогичным образом в присутствии димегина возрастает и скорость фоторазложения ДНКЖ (этот эксперимент также проводили в отсутствие триптофана в реакционной среде), причем возрастание это оказывается значительным в каталитических концентрациях ДМГ (5×10^{-6} М).

Поскольку при фотоиндуцированном разложении ДНКЖ с введением в реакционную среду радикалов NO^\bullet происходит не только фотодеструкция молекул ПФС, но и должна увеличивать скорость целевой реакции – прямого фотоокисления триптофана при взаимодействии с NO^\bullet , проблема увеличения общей скорости этого процесса должна состоять в исключении или в существенном снижении негативного разрушающего воздействия NO^\bullet и пероксинитрита на молекулы ПФС и, в то же время, сохранении таких воздействия на триптофан. И зависимость 3 на рис. 1 указывает на принципиальную возможность решения этой проблемы за счет введения в реакционную среду плуроника F-127. Ключевая роль плуроника в данном случае определяется ранее обнаруженным феноменом – образованием комплексов ПФС с АП и эффективной солубилизацией ПФС. Последнее заключается в иммобилизации ДМГ в окрестности внутренних (по отношению к внешней водной среде) фрагментов

Таблица 1. Расчетные параметры ξ и константы скорости окисления триптофана (исходная концентрация $C_0^{\text{TP}} = 1 \times 10^{-5}$ М) при разных составах реакционной среды, указанных в подписи к рис. 1 (здесь R^2 – величина достоверности используемых линейных аппроксимаций в зависимостях, представленных на рис. 3)

Состав реакционной смеси	ξ	R^2	$k_{\text{obs}}^{\text{TP}} \times 10^3, \text{c}^{-1}$	$k^{\text{TP}} \times 10^3, \text{c}^{-1}$
ТФ-ДМГ	0.896	0.997	0.64	0.71
TP-DNCF-DMG	0.829	0.996	0.50	0.60
TP-DNCF-DMG-F127	0.693	0.986	0.83	1.26

Таблица 2. Расчетные параметры ξ и R^2 , а также константы скорости разложения ДНКЖ и скорости фотодегградации ДМГ при составах реакционной среды, указанных в подписях к рис. 5

Система	ξ	R^2	$k_{\text{obs}}^{\text{DNCF}} \times 10^3, \text{c}^{-1}$	$k^{\text{DNCF}} \times 10^3, \text{c}^{-1}$	$k_{\text{obs}}^{\text{DMG}} \times 10^3, \text{c}^{-1}$	$k^{\text{DMG}} \times 10^3, \text{c}^{-1}$
DMG	0.9512	0.9996	—	—	0.50	0.526
DNCF	0.9467	0.9997	0.35	0.37	—	—
DNCF-DMG	0.5611	0.9589	0.48	0.86	5.8	10.34
DNCF-DMG-F127	0.8354	0.9941	0.30	0.36	1.14	1.36

F127 с формированием комплексов ДМГ-F127, которые эффективно экранируют молекулы ДМГ от воздействия образующихся при разложении ДНКЖ радикалов NO^\bullet [12]. При этом константа скорости фотодеструкции солиubilизированного ДМГ в смеси с ДНКЖ уменьшается почти в семь раз при возрастании концентрации плуроника F127 до 2×10^{-4} М. Следует подчеркнуть, что условием экранирования является также отсутствие взаимодействия плуроника F127 с ДНКЖ, на что указывает независимость скорости фотодеструкции ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами (это демонстрируют специально поставленные эксперименты) от присутствия в реакционной среде плуроника. Необходимо также указать, что в то время как молекулы ПФС оказываются “защищенными” от разрушающего воздействия NO^\bullet , в реакционной среде сохраняются такие “разрушающие” воздействия радикалов NO^\bullet на триптофан. При этом одновременно понижается скорость фотодегградации ПФС и возрастает (см. также ниже табл. 2) скорость фотоиндуцированного разложения ДНКЖ, определяя эффективное возрастание константы скорости фотосенсибилизированного окисления триптофана.

Объединенные данные по фотодеструкции ДМГ и ДНКЖ приведены на рис. 5а и 5б, где представлены относительные изменения со временем после начала фотовоздействия концентраций ДМГ и ДНКЖ в водных смесях, содержащих и не содержащих плуроник F127.

На основе данных, представленных на рис. 5, были получены константы скорости фотоиницируемого разложения ДНКЖ и константы скорости фотодегградации ДМГ (табл. 2). Найденные величины представленных в этой таблице констант скоростей в полной мере соответствуют сделанным выше заключениям о качественных различиях констант разложения комплексов ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами и фотодегградации ПФС для реакционных сред разного состава.

Найденные на основе проведенного анализа зависимости $k_{\text{obs}}^{\text{TP}}$ от C_0^{DNCF} при фиксированных

значениях C_0^{PPS} (C_0^{DMG} и C_0^{PD}), а также зависимости $k_{\text{obs}}^{\text{TP}}$ от C_0^{PI} представлены на рис. 6 и 7. На этих же рисунках для сопоставления представлены полученные в работе [12] соответствующие зависимости для констант скорости окисления триптофана при использовании фотодитазина (ФДн) в качестве ПФС. Как следует из сопоставления этих зависимостей, нахождение в реакционной среде плуроника F127 с концентрацией, превышающей концентрацию мицеллообразования, не

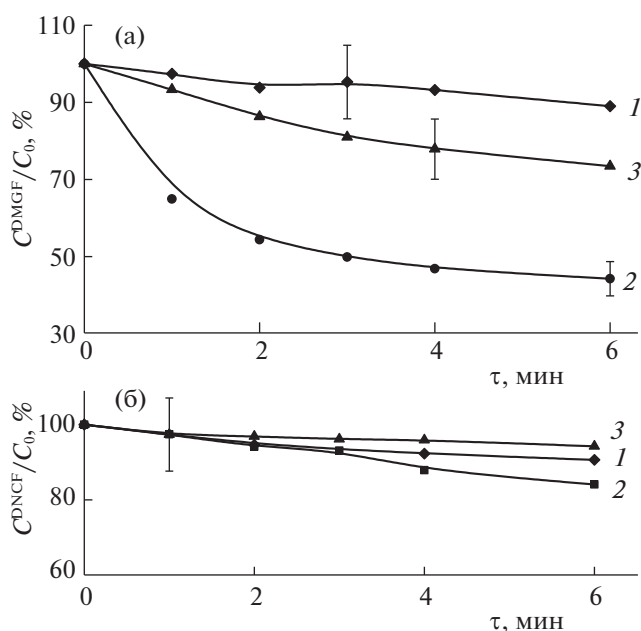


Рис. 5. Относительное изменение со временем концентраций ДМГ (а) и ДНКЖ (б) в водных смесях, содержащих и не содержащих ДНКЖ (а), ДМГ (б) и плуроник F127 ($C_0^{\text{DNCF}} = 6.0 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_0^{\text{DMG}} = 1.5 \times 10^{-6}$ моль/л; $C_0^{\text{F127}} = 2.0 \times 10^{-4}$ моль/л), при облучении светом с длиной волны 400 нм: 1 – изменение концентрации ДМГ (а), ДНКЖ (б); 2 – изменение концентрации: а – ДМГ в присутствии ДНКЖ и б – ДНКЖ в присутствии ДМГ; 3 – изменение концентрации: а – ДМГ в системе с ДНКЖ и б – ДНКЖ в системе с ДМГ в присутствии плуроника F127.

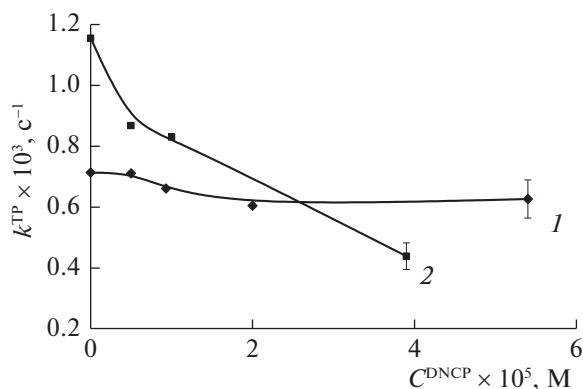


Рис. 6. Зависимости константы k^{TP} скорости фотоокисления триптофана в присутствии ПФС от концентрации ДНКЖ при $C_0^{\text{F127}} = 0$, где в качестве ПФС использовался ДМГ ($C_0^{\text{DMG}} = 2.2 \times 10^{-6}$ моль/л) – 1 и ФДн ($C_0^{\text{PD}} = 1.5 \times 10^{-6}$ моль/л) – 2 при исходной концентрации триптофана $C_0^{\text{TP}} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л.

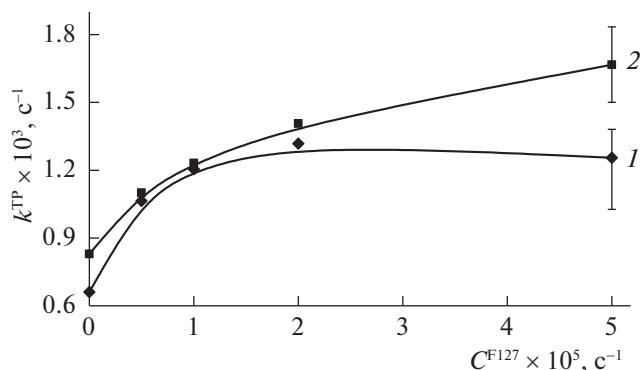


Рис. 7. Зависимости константы скорости k^{TP} фотоокисления триптофана в присутствии ДНКЖ от концентрации плуроника F127, где в качестве ПФС использовались ДМГ-кривая (1) и ФДн-кривая (2); $C_0^{\text{PD}} = 1.5 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_0^{\text{DMG}} = 2.2 \times 10^{-6}$ моль/л, $C_0^{\text{TP}} = 1 \times 10^{-5}$ моль/л, $C_0^{\text{DNCF}} = 1.0 \times 10^{-5}$ моль/л.

только обуславливает повышение константы скорости фотоокисления органического субстрата, но и может способствовать проявлению специфической активности ДНКЖ, что особенно важно при осуществлении процедур фотосенсибилизированного окисления органических субстратов в нативных системах. Фактически зависимости, представленные на рис. 6 и 7, отражают в общих чертах взаимосвязи компонентов реакционных смесей, которые можно формировать для процедур ФДТ, имея в виду обнаруженную в данном исследовании возможность – инициирование одновременно с фотосенсибилизирующими воздействиями на патологические фрагменты пораженных тканей дополнительных воздействий, как цитотоксических, так и регуляторно-регенеративных, определяемых введением в систему комплексов ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами [22].

Таким образом, использование плуроника F127 в качестве фактора, предотвращающего фотодеграцию ПФС в условиях фотосенсибилизированного окисления органических субстратов при введении в реакционную систему ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, открывает принципиальную возможность проведения процедур ФДТ с одновременным инициированием регенеративно-репарационных процессов в организме. Конечно, только результаты практического использования таких вариантов ФДТ позволят оценить, насколько совмещение фотоиндуцированных процессов некроза и апоптоза клеток патологических тканей с инициированием процессов

грануляции и эпителизации “обработанных” тканей повысит эффективность предлагаемой терапии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 16-13-10295).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Iwai Y., Ishida M., Honjo T. et al. // PNAS. 2002. V. 99. № 19. P. 12293.
2. Popov P.B. // XLIX International Scientific and Practical Conference. Hajdusoboszlo. Hungary. 2018. P. 88.
3. Легостаев В.М., Бабенков О.Ю., Мальдонадо Г.М. и др. // Ibid. 2018. P. 42.
4. Странадко Е.Ф., Малова Т.И., Пономарев Г.В. // Ibid. 2018. P. 134.
5. Шишко Е.Д., Штонь И.А., Прокопенко И.В. // Ibid. 2018. P. 181.
6. Kovalenko Y.L., Melekhovets O.K., Melekhovets Yu.V. // Ibid. 2018. P. 36.
7. Kharchenko T.O., Melekhovets O.K., Melekhovets Y.V., Rad'ko A.C. // Ibid. 2018. P. 34.
8. Solovieva A.B., Tolstih P.I., Melik-Nubarov N.S. et al. // Las.Phys. 2010. № 5. P. 1068–1074.
9. Solovieva A.B., Aksenova N.A., Glagoleva N.N. et al. // R.J. of Ph. Ch. B. 2012. V. 6. № 3. P. 433–440.
10. Solovieva A.B., Melik-Nubarov N.S., Zhiyentayev T.M. et al. // Las. Phys. 2009. V. 19. № 4. P. 1.
11. Климова Е.М., Лавинская Е.В., Быченко Е.А. и др. // XLIX International Scientific and Practical Conference. Hajdusoboszlo. Hungary. 2018. P. 103.
12. Solovieva A.B., Vanin A.F., Timashev S.F. // The 26th International Conference on Advanced Laser Technologies. Tarragona. Spain. 2018. P. B-O-2.

13. *Ванин А.Ф.* Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. *Физикохимия, биология, медицина*. М.: Ижевск. 2015, 219 с.
14. *Ванин А.Ф.* // *Успехи физических наук*. 2000. Т. 170. № 4. С. 455–458.
15. *Murad F.* // *Biosci Rep*. 1999. V. 19. P. 133.
16. *Mur L.A.J., Carver T.W., Prats E.* // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. P. 489.
17. *Besson-Bard A., Pugin A.* // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. V. 59. P. 21.
18. *Wink D.A., Mitchell J.B.* // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 25. P. 434.
19. *Vanin A.F., Svistunenko D., Mikoyan V.D. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 24100.
20. *Ванин А.Ф.* // *Биохимия*. 1998. Т. 63. № 7. С. 924.
21. *Vanin A.F., Poltorakov A.P., Mikoyan V.D. et al.* // *Nitric Oxide: Biol. & Chem.* 2010. V. 23. № 2. P. 136.
22. *Aksenova N.A., Glagolev N.N., Chernjak A.V.* // *Laser Physics*. 2012. V. 22. № 10. P. 1642.