

## **Wpływ białek transportowych na farmakokinetykę i efektywność fotodynamiczną pochodnych chlorofilu**

Milena Szafranec

Farmakokinetyka związków stosowanych jako fotouczulacze w terapii fotodynamicznej jest niezwykle istotna zarówno z punktu widzenia efektywności terapii, jak i bezpieczeństwa pacjenta. W niniejszej pracy poddano analizie dwa istotne dla dystrybucji w organizmie oddziaływania, tj. transport przez białko błonowe BCRP (ABCG2) oraz wiązanie z albuminą fotouczulaczy będących pochodnymi feoforbidu a, produktu degradacji chlorofilu a występującego w przyrodzie. Badane były dwie pochodne feoforbidu a podstawione w centrum pierścienia magnezem (chlorofilid a) oraz cynkiem (cynkowy feoforbid a). Oddziaływania pochodnych chlorofilu a z BCRP i albuminą badane były równoległe z analizą ich wpływu na efektywność fotodynamiczną fotouczulaczy.

Transport fotouczulaczy badano w linii komórkowej MCF-7 (rak piersi) o podstawowej oraz podwyższonej na drodze transfekcji ekspresji transportera BCRP. Równoległe z analizą transportu określano efekt fotodynamiczny wywoływany przez fotouczulacz pozostający w komórkach po określonym czasie transportu. Wykazano, że zarówno pochodna magnezowa, jak i cynkowa feoforbidu a są substratami transportera, jednak tempo ich transportu jest nieco niższe niż w przypadku feoforbidu a, będącego potwierdzonym wcześniej substratem białka BCRP. Dodatkowo, niższe tempo transportu zaobserwowano dla chlorofilidu niż dla pochodnej cynkowej. Wynika to najprawdopodobniej z różnic w sile ich wiązania z zewnątrzkomórkową pętlą ECL3 transportera. Jednocześnie zaobserwowano, że tempo transportu obu pochodnych, podobnie jak feoforbidu a, jest znacznie obniżone przy braku w środowisku zewnątrzkomórkowym surowicy/albuminy, podobnie jak obserwowano to w przypadku innych związków o podobnej budowie. Tempo transportu wzrasta ze wzrostem stężenia albuminy, osiągając poziom plateau przy stężeniu ok. 250  $\mu$ M. Przyspieszenie transportu może wynikać ze związania fotouczulacza z albuminą, które powoduje, że utworzony kompleks nie wnika zwrótnie do komórki. Możliwe jednak, że nie jest to jedyny mechanizm tego zjawiska, ponieważ nie zaobserwowano zależności pomiędzy tempem transportu fotouczulaczy a ich powinowactwem do albuminy. Zaobserwowano, że pochodne podstawione metalami wiążą się z albuminą znacznie silniej niż feoforbid a. Wiązanie to jest silniejsze dla pochodnej cynkowej niż dla magnezowej. Najprawdopodobniej różnica ta, a nie jak wcześniej przypuszczano, różnica w tempie transportu przez BCRP, odpowiada za obserwowany we wcześniejszych badaniach wydłużony czas retencji w organizmie pochodnej cynkowej w porównaniu z chlorofilidem.

Aby szczegółowo scharakteryzować wiązanie fotouczulaczy z albuminą ludzką, przeprowadzono badania spektroskopowe oraz dokowanie molekularne. Stałe wiązania wyznaczono poprzez pomiar wzmocnienia fluorescencji fotouczulacza przy wzrastającym stężeniu albuminy. Prawdopodobne miejsca wiązania wskazano natomiast na drodze pomiaru wygaszenia fluorescencji albuminy przy wzrastających stężeniach fotouczulaczy oraz dokowania molekularnego. Badania te wykazały, że pochodne chlorofilu wiążą się najsilniej w miejscu wiążącym hem zlokalizowanym w subdomenie IB, słabiej natomiast w głównych miejscach wiązania albuminy tj. Sudlow1 i Sudlow2, zlokalizowanych odpowiednio w subdomenach IIA i IIIA. Wiązanie to jest oparte głównie o oddziaływania hydrofobowe, a w mniejszym stopniu wiązania wodorowe. Wyznaczone stałe wiązania są nieco niższe dla chlorofilidu niż dla cynkowego feoforbidu. Ponadto, liczba zidentyfikowanych reszt aminokwasowych zaangażowanych w wiązanie z albuminą jest dla tego pierwszego niższa niż dla drugiego. To pozwala przypuszczać, że różnice w ich farmakokinetyce zaobserwowane u zwierząt, będą występować również u ludzi.

Ze względu na stosunkowo silne wiązanie cynkowego feoforbidu z albuminą, które hamuje jego wnikanie do komórek nowotworowych, a z drugiej strony wysoką wydajność fotodynamiczną tej pochodnej, postanowiono zbadać, czy kompleks albumina-cynkowy feoforbid wnika do komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. Komórki śródbłonna naczyń posiadają zdolność pobierania albuminy na drodze endocytozy, a jednocześnie stanowią istotny cel terapii fotodynamicznej skierowanej przeciwko różnym jednostkom chorobowym. Eksperymenty z udziałem modelowej linii HUVEC (komórki endotelium pozyskane z żyły pępowinowej) potwierdziły, że kompleks jest transportowany do komórek. Ponadto kompleksowanie fotouczulacza z albuminą podwyższa jego akumulację lizosomalną, wzmacniając tym samym indukowany efekt fotodynamiczny. Wykazano także, że linia HUVEC jest bardziej podatna na traktowanie fotodynamiczne z udziałem cynkowego feoforbidu niż nowotworowa linia MCF-7. Wartość współczynnika IC<sub>50</sub> dla linii HUVEC przy dawce światła równej 2 J/cm<sup>2</sup> i 3-godzinnym czasie akumulacji wynosi ok. 20 nM, podczas gdy dla linii MCF-7 wartość ta jest ok. 25-krotnie wyższa. Wykazano także, że rodzaj śmierci komórkowej indukowanej traktowaniem fotodynamicznym zależy od poziomu cynkowego feoforbidu a zakumulowanego w komórkach. Przy niskim poziomie fotouczulacza komórki podlegają apoptozie, a przy wysokim nekrozie. Ponieważ wysokie stężenia albuminy znacząco obniżają akumulację komórkową fotouczulacza, będą one także kierować komórki na szlak apoptozy, co może być efektem korzystnym, ze względu na ograniczenie stanu zapalnego.