

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Рябухін Сергій Вікторович

Протокол №____ засідання кафедри

від «__» _____ 2023 р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВИЛУЧЕННЯ ФОТОЧУТЛИВИХ
ДІАРИЛЕТИЛЕНВМІСНИХ ПЕПТИДІВ З МОДЕЛЬНИХ ТКАНИН**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента напряму підготовки 102 «Хімія»
освітньої програми «Хімія (високі технології)»

Головко Ірини Олександрівни

Науковий керівник:
директор Навчально-наукового
інституту високих технологій,
доктор хімічних наук
Комаров Ігор Володимирович

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Одним з фотофармакологічних підходів є люмобіотики, що містять молекулярні фотоперемикачі, інтегровані в структуру пептиду. Поєднуючи фотоперемикач із біологічно активним лігандом, можна використовувати світло для «перемикання» ліганду між двома станами. Серед проблем фотофармакології є доставка світла в організм для активації фоточутливої сполуки. Робота присвячена дослідженню активації фоточутливих діарилетиленвмісного пептиду LMB002 у модельних тканинах з вдосконаленням вилучення активованої та неактивованої форм пептиду з модельної біологічної тканини після фотоактивації світлом довжиною хвилі $\lambda=660$ нм. За результатами дослідження було запропоновано умови для підвищення ступеня вилучення фотопептиду з модельної тканини.

Ключові слова: люмобіотики, граміцидин С, екстракція, рідинна хроматографія, спектрофотометрія, фотоперемикач

One of the photopharmacological approaches is lumobiotics, which contain molecular photoswitches integrated into the peptide structure. By combining a photoswitch with a biologically active ligand, light can be used to "switch" the ligand between two states. Among the challenges of photopharmacology is the delivery of light into the body for activation of photosensitive compound. The work is dedicated to the analysis of the activation of the photosensitive diarylethylene-containing peptide LMB002 in model tissues with the improvement of the extraction of activated and non-activated forms of the peptide from the model biological tissue after photoactivation by light with a wavelength of $\lambda=660$ nm. In research proposed conditions for increasing the degree of photopeptide extraction from the model tissue.

Key words: lumobiotics, gramicidin S, extraction, liquid chromatography, spectrophotometry, photoswitch

ЗМІСТ

Вступ	5
1. Огляд літератури.....	7
1.1 Підходи фотофармакології.....	7
1.2 Фотоконтрольовані пептидоміметики	9
1.3 Проникнення світла через біологічні тканини.....	13
2. Результати та обговорення.....	15
2.1 Аналіз результатів попереднього дослідження з фотоактивації фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів у модельній біологічній тканині.....	15
2.2 Аналіз результатів модифікованого вилучення фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів з модельної біологічної тканин.....	18
2.2.1 Початкові спроби вдосконалення вилучення фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів з модельних тканин	18
2.2.2 Дослідження гомогенізації суміші	20
2.2.3 Вдосконалення процедури екстракції	23
3. Експериментальна частина	28
3.1 Обладнання та схема експерименту.....	28
3.2 Експериментальна частина попереднього дослідження з фотоактивації фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів у модельних тканинах	29
3.3 Експериментальна частина початкових спроб вдосконалення вилучення фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів з модельних тканин.....	30
3.3.1. Експериментальна частина дослідження гомогенізації суміші	31
3.3.2 Вдосконалення процедури екстракції	34

Висновок	35
Список використаної літератури.....	36
ДОДАТКИ.....	38

ВСТУП

Фотофармакологія — це зростаюча сфера досліджень, у якій використовуються ліганди, що перемикаються на світлі, щоб забезпечити світлозалежну фармакологічну активність. Поєднуючи світло з терапевтичною дією, можна досягти покращеної просторової та часової вибірковості та згодом використати її для нових концепцій терапії.

Одним з таких фотофармакологічних підходів є оборотні фотофармакологічні агенти, що містять молекулярні фотоперемикачі, інтегровані в їх структуру. Ці фотоперемикачі є компонентами, здатними зазнавати взаємоперетворення між двома різними структурними станами, причому світло служить стимулом для принаймні однієї з подій перемикання. Поєднуючи фотоперемикач із біологічно активним лігандом, можна використовувати світло для «перемикання» ліганду між двома станами.

Багатообіцяючим напрямком фармакологічних досліджень є включення фотоперемикача в молекули природного походження, зокрема пептиди. Ця інтеграція дозволяє розробляти світлочутливі аналоги природних пептидів, які називаються люмобіотиками.

Тим не менш, саме висока спорідненість і специфічність взаємодії пептидів з мішенями робить їх перспективними кандидатами для клінічного використання при лікуванні серцево-судинних захворювань, онкології, остеопорозу, діабету та розладів шлунково-кишкового тракту.

Одним з викликів фотофармакології є доставка світла в організм для активації фоточутливої сполуки. Проникнення світла залежить від оптичних властивостей тканини та довжини хвилі використовуваного світла. Між тканинами і навіть усередині тканини існує неоднорідність. Ці ділянки неоднорідності (наприклад, ядра, мембрани тощо) викликають розсіювання, відображення, пропускання або поглинання світла, вода поглинає світло з певною довжиною хвилі, що також впливає на глибину проникнення світла в

тканину. Тому є необхідним дослідження впливу світла на фоточутливі сполуки в модельних тканинах людського організму.

Мета роботи: дослідження активації фоточутливих діарилетиленвмісного пептиду LMB002 у модельних тканинах з вдосконаленням вилучення активованої та неактивованої форм пептиду з модельної біологічної тканини після фотоактивації світлом довжиною хвилі $\lambda=660$ нм.

Завдання роботи: Визначити оптимальні умови проведення вилучення активованої та неактивованої світлом форм LMB002 для оцінки фотоконверсії у модельній біологічній тканині, а саме вибрати умови гомогенізації та екстракції пептиду з даної матриці.

Об'єктами дослідження були діарилетиленвмісного пептиду LMB002 і модельна біологічна тканина, в якості якої використано свинячий фарш з 10%-водним наповненням.

Предмет дослідження: вилучення активованої та неактивованої форм LMB002 з модельної біологічної тканини.

Методи: лазерне опромінення, рідинна хроматографія, спектрофотометрія.

Особистий внесок здобувача: систематизацію літературних даних, увесь обсяг експериментальної роботи, узагальнення, оформлення та аналіз отриманих результатів було проведено здобувачем особисто. Постановка завдання дослідження та обговорення результатів проводились разом з науковим керівником д.х.н. Комаровим І.В.

1. Огляд літератури

1.1 Підходи фотофармакології

Термін «фотофармакологія» охоплює різні стратегії, які пов'язують фотохімію та фармакологію біологічно активних молекул.

Фармакологічні підходи, що залежать від світла:

- Фотодинамічна терапія;
- Необоротна фотофармакологія;
- Оборотна фотофармакологія з лігандом, який активний лише в одному структурному стані.^[1]

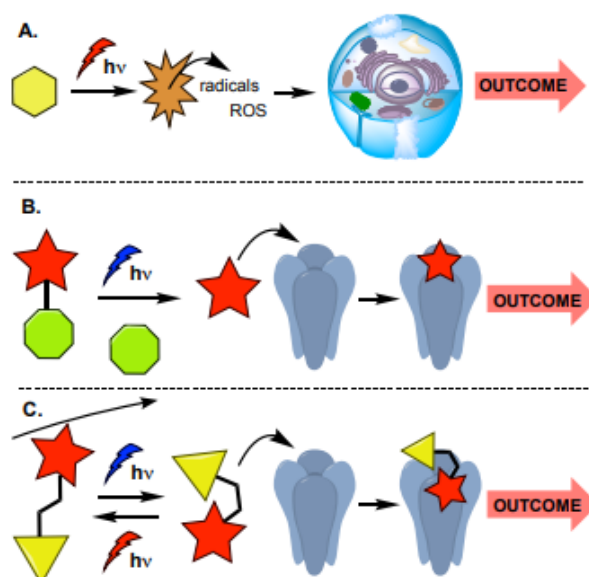


Рис. 1.1. Світлозалежні фармакологічні підходи: а) фотодинамічна терапія (ROS = активні форми кисню); б) необоротна фотофармакологія; в) оборотна фармакологія з лігандом «фотоперемикачем», який активний лише в одному структурному стані.

Фотодинамічна терапія (ФДТ) — це підхід до лікування, який передбачає використання ліків, активованих світлом, для лікування локалізованих уражень. У другій половині 20 століття перші агенти ФДТ, здатні індукувати загибель ракових клітин під час опромінення пухлини, були введені в клінічну практику. Під час ФДТ пацієнтам вводять молекулу

фотосенсибілізує барвник з подальшим впливом світлових хвиль певної довжини. Коли барвник поглинає світло, він переходить у збуджений стан, що призводить до утворення різних реактивних проміжних продуктів, включаючи активні форми кисню (Рис. 1.1 (а)).^[2]

Сучасні підходи протипухлинної ФДТ залежать від наявності кисню в пухлинах. Однак швидкий ріст і проліферація клітин у пухлинах часто призводить до недостатнього постачання киснем, створюючи гіпоксичне мікросередовище. Цей дефіцит кисню може сприяти розвитку клітинних фенотипів з підвищеною резистентністю та інвазивністю, створюючи вищий ризик метастазування та рецидиву. Звичайне кисневозалежне лікування ФДТ є менш ефективним у таких випадках.

Фотофармакологія пропонує багатообіцяючу можливість поза фотодинамічною терапією. Це передбачає дослідження підходів, коли світлове опромінення призводить до фотохімічної події, що призводить до зміни фармакологічної активності молекули.

Фотофармакологічні агенти можуть демонструвати необоротну або оборотну фотохімію, залежно від конкретної досліджуваної молекули. Ці агенти використовують світло як тригер, щоб модулювати свою фармакологічну поведінку, забезпечуючи точний контроль і маніпуляції своєю діяльністю. Ця міждисциплінарна сфера має великий потенціал для розробки інноваційних терапевтичних втручань шляхом інтеграції принципів світла та фармакології.

Одним із яскравих прикладів необоротної фотофармакології є процес фоторозпаду, показаний на Рис. 1.1 (б), Рис. 1.2 (а-d). Цей підхід передбачає додавання фотоактивної захисної групи, також відомої як «клітка», до біологічного ліганду. Клітка служить для маскуванню важливих фармакофоричних властивостей ліганду, роблячи його неактивним проти призначеної мішені. Однак при опроміненні світлом клітина піддається

фотохімічному розщепленню, що призводить до вивільнення активного біологічного агента.^[3]

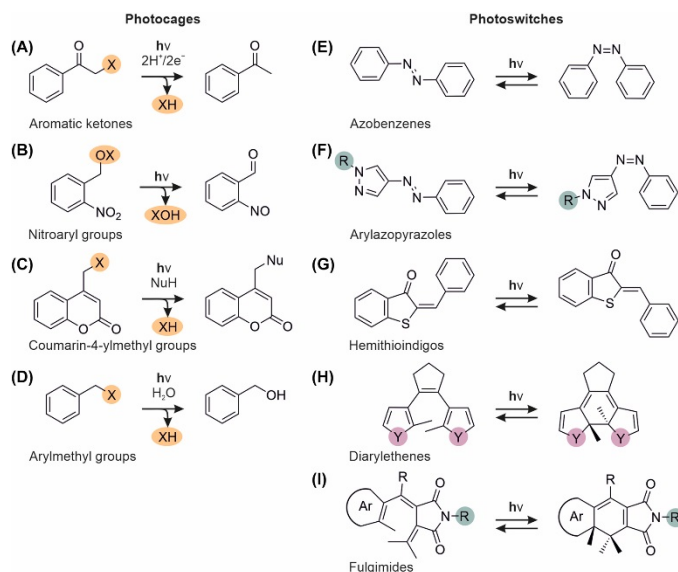


Рис. 1.2. Приклади необоротних (a-d) та оборотних (e-i) фотофармакологічних агентів

Оборотні фотофармакологічні агенти використовують молекулярні фотоперемикачі, інтегровані в їх структуру, як показано на Рис. 1.1 (с), Рис. 1.2 (e-i). Ці фотоперемикачі є компонентами, здатними зазнавати взаємоперетворення між двома різними структурними станами, причому світло служить стимулом для принаймні однієї з подій перемикання. Поєднуючи фотоперемикач із біологічно активним лігандом, можна використовувати світло для «перемикання» ліганду між двома станами. Якщо ці структурні стани демонструють суттєво різну спорідненість зв'язування з мішенню, в принципі можна використовувати світло для вмикання та вимикання активності на основі мішені.^[1]

1.2 Фотоконтрольовані пептидоміметики

Поширеним прикладом оборотних фотофармакологічних підходів є такі, які покладаються на азоароматичні речовини, зокрема на прототип азобензолу

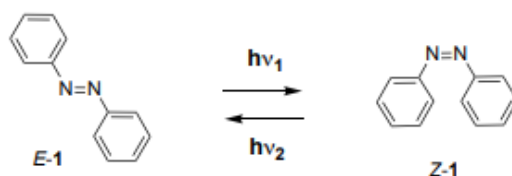


Рис. 1.3. Фотоізомеризація азобензенowego фрагменту

Азоаренові фотоперемикачі можуть бути включені в біологічні системи для світлозалежних досліджень різними способами. Вони включають підходи до зв'язування або перехресного зв'язування з біомолекулами, які були розглянуті в інших місцях.^[4]

Відкриття здатності азобензолу піддаватися взаємоперетворенню двох ізомерних конфігурацій за допомогою світла відбулося в 1930-х роках. З тих пір азобензол став одним із найбільш широко використовуваних фотоперемикачів у різних застосуваннях із адресацією світла, зокрема у фотофармакології. Ізомери E та Z азобензолу демонструють значну зміну наскрізної відстані (рис. 1.3), що має вирішальне значення для багатьох застосувань, включаючи фотофармакологію.

Азобензол ефективний як фотоперемикач, має високі коефіцієнти екстинкції та квантові виходи. Ця характеристика дозволяє фотоперемикання зі світлом низької інтенсивності та забезпечує стабільність під час повторюваних циклів перемикання. Щоб досягти високого ступеня ізомерного перемикання між формами E та Z, важливо визначити довжину хвилі, на якій цільовий ізомер поглинає світло, а ізомер продукту – ні. Як правило, ультрафіолетове світло використовується для переходу від E до Z, а видиме світло використовується для переходу від Z до E на основі відповідних максимумів поглинання (I_{\max}) азоароматичних ізомерів. Однак ультрафіолетове світло має обмеження, включаючи потенційну фототоксичність і обмежене проникнення в тканини.^[5]

Також розроблено клас сполук, що містять діарілетенове ядро з фотоперемиканням, використовуючи циклічний амфіфільний пептид

граміцидин С. Граміцидин С, катіонний пептид із циклічною структурою, добре відомий своїми мембранолітичними властивостями.

Декапептид граміцидин С є похідною природного граміцидину, який виділяється *Bacillus brevis*. Цей декапептид є цитотоксичним агентом, що діє на еукаріотичні клітини. Завдяки своїй амфіфільній циклічній структурі з загальним позитивним зарядом, граміцидин С легко зв'язується з ліпідами, що експонуються на поверхні клітинної мембрани. Це призводить до руйнування мембрани і загибелі клітини. Мембранолітичні властивості граміцидину С роблять його привабливим хіміотерапевтичним засобом для лікування раку. Проте його висока системна токсичність *in vivo* є серйозним недоліком, оскільки він неселективно впливає на ракові і здорові клітини.^[7]

З використанням ДАЕ-фрагмента (Рис. 1.4 (а)) та граміцидину С (Рис. 1.4 (б)) як основи було синтезовано новий клас фотоконтрольованих клітинопроникних пептидів (Рис. 1.4 (с)).^[6] Перехід ДАЕ з "закритої" у "відкритої" форму при опроміненні червоним світлом змінює конформацію пептиду і дозволяє контролювати його проникність в клітини та відповідну цитотоксичність.^[8]

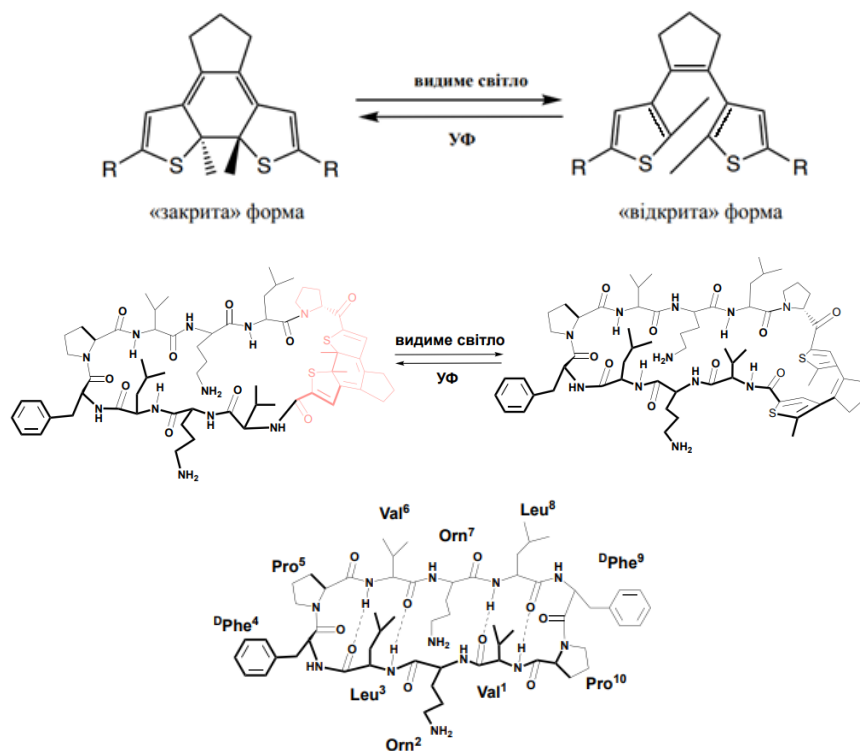


Рис. 1.4. а) Фотоперемикання між «закритою» та «відкритою» формами діарилетену (ДАЕ) б) грамїцидин С с) фотоперемикання між двома формами LMB002 —ДАЕ-модифікованого пептидоміметіку на основі грамїцидину С

Дослідження *in vitro* на трансформованих гепатоцитах та епітеліальних клітинах показали значну різницю в значеннях IC₅₀ між "відкритою" та "закритою" формами, що свідчить про наявність біологічної активності, яку можна контролювати шляхом фото-перемикання між цими двома формами. Таким чином, основна проблема звичайних хіміотерапевтичних препаратів, а саме неселективна токсичність, може бути усунена. Активація ДАЕ-клітинопроникних пептидів світлом безпосередньо в місці розташування пухлини дозволяє знищувати ракові клітини цілеспрямовано, не завдаючи шкоди здоровим клітинам організму.

1.3 Проникнення світла через біологічні тканини

Фотофармакологічні підходи— це світлоіндукована терапія, і їх терапевтична дія базується на властивостях світла, яке використовується для збудження конкретного хромофора. Вимога збудження світлом є як перевагою, так і недоліком. Фотофармакологічний агент не буде активним не буде переходити в активну форму, якщо він не збуджений. Це надає процедурі властиву вибірковість, оскільки можна вибрати час і область опромінення.

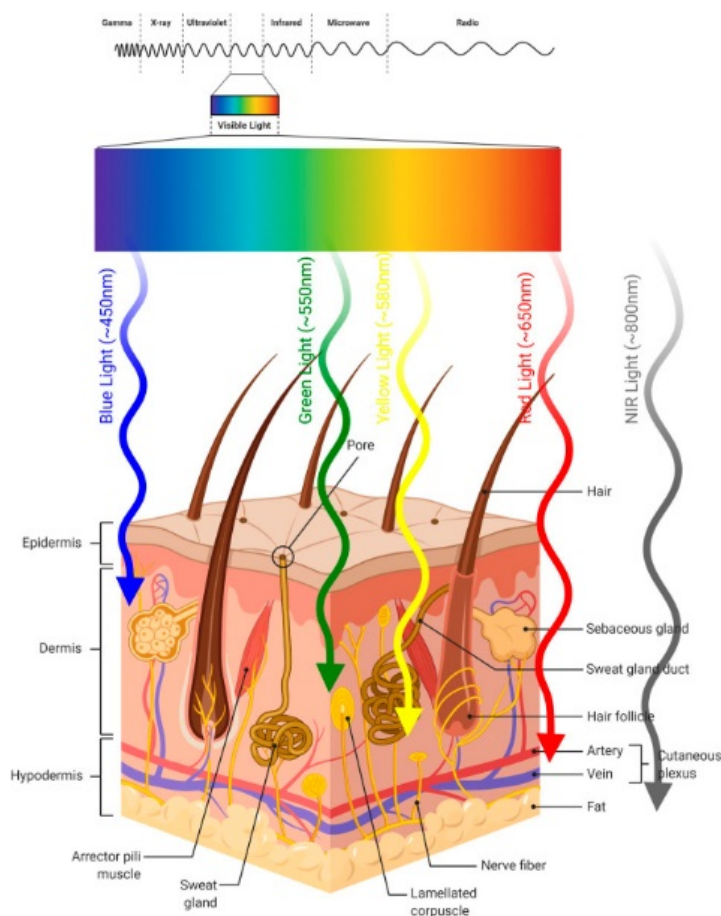


Рис. 1.5. Проникнення світла в шкіру. Проілюстровано приблизну глибину проникнення світла в шкіру відповідно до його довжини хвилі.

Однак світло не може проникати^[9] за межі кількох міліметрів тканини (Рис. 1.5), обмежуючи терапевтичний потенціал поверхневими тканинами.

Проникнення світла залежить від оптичних властивостей тканини та довжини хвилі використовуваного світла. Між тканинами і усередині тканини існує неоднорідність. Ці ділянки неоднорідності (наприклад ядра,

мембрани тощо) викликають розсіювання, відображення, пропускання або поглинання світла^[11]. Крім того, вода поглинає світло з певною довжиною хвилі, що впливає на глибину проникнення світла в тканину.

Крім того, гемоглобін і меланін, які є ендogenousними барвниками, поглинають світло на коротших хвилях. Тому вони впливають на проникнення світла^[12]. Тому світло спектрального діапазону (так зване «фототерапевтичне вікно») є важливим для фотофармакологічних підходів.

«Фототерапевтичне вікно» становить від 600 до 1300 нм^[13]. З іншого боку, світло в діапазоні довжин хвиль від 620 до 850 нм має найбільшу проникаючу здатність для досягнення максимальної проникності шкіри. При довжині довжини вище 850 нм світло не забезпечує достатньої енергії, необхідної для активації фотофармакологічного агенту.

Підсумовуючи, світло в діапазоні спектру 620–850 нм забезпечує оптимальне проникнення в тканини та застосування фотофармакологічних підходів. Ефективними пристроями, що використовуються для доставки світла, є лампи розжарювання та лазери^[14].

2. Результати та обговорення

2.1 Аналіз результатів попереднього дослідження з фотоактивації фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів у модельній біологічній тканині

Об'єктом дослідження був шприц з сумішшю, яка складається з 5 г фаршу об'ємом $V=4.83 \text{ см}^3$, 537 мкл рідини (277 мкл розчину ФП 1 мг/мл змішати з 260 мкл буферного розчину) (10% об'ємне заповнення). Об'єкт експонувався напівпровідниковим лазером LIKA-surgeon з оптоволоконним виходом та довжиною хвилі 660 нм.

Дослідження конверсії LMB002 відбувалось шляхом порівняння площ сигналів активної та неактивної форм на хроматограмах, отриманих за допомогою методу рідинної хроматографії для ацетонітрильно-водних екстрактів суміші.

Під час дослідження було встановлено, що зі збільшенням глибини проникнення світла в біологічну тканину збільшується концентрація неактивованого ФП, та зменшується концентрація активованого.

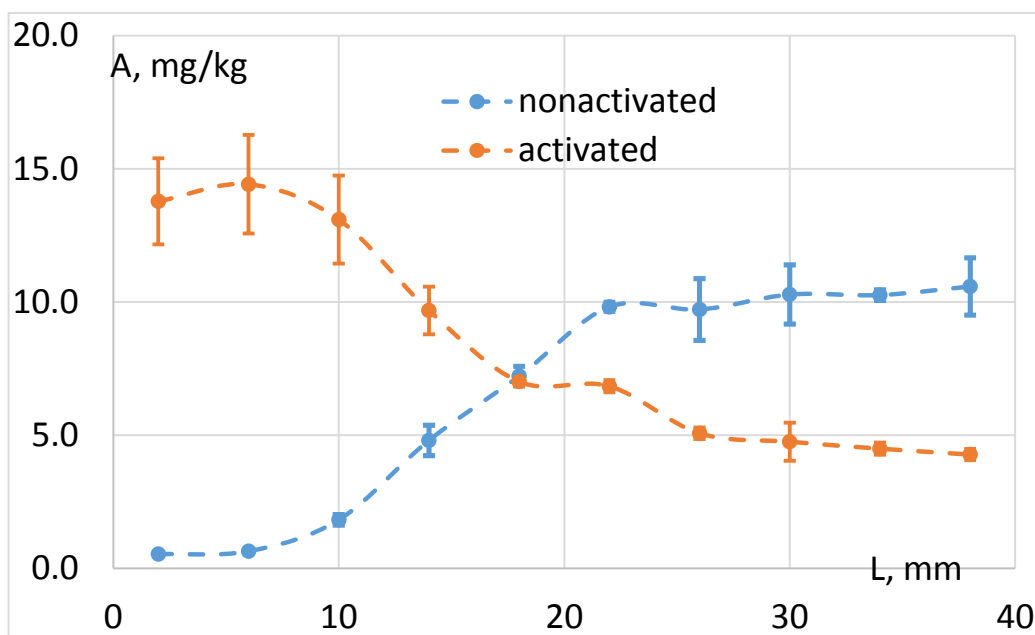


Рисунок 2.1. Залежність концентрації неактивованої та активованої форм ФП LMB002 від глибини проникнення світла у зразок при експозиції 60 Дж/см^2

**Розрахована концентрація ФП LMB002 для проб, що відповідають
різним глибинам проникнення світла у зразок**

Глибина проникне ння L, mm	Конц. неакт. ФП, мг/кг	Станд. відх. конц. неакт. ФП, мг/кг	Конц. акт. ФП, мг/кг	Станд. відх. конц. акт. ФП, мг/кг	Повна концент рація ФП, мг/кг	Станд. відх. повн. конц. ФП, мг/кг
2	0.53	0.03	13.78	1.62	14.3	1.6
6	0.64	0.04	14.42	1.85	15.1	1.9
10	1.82	0.20	13.10	1.65	14.9	1.7
14	4.80	0.57	9.68	0.89	14.5	1.1
18	7.21	0.37	7.01	0.17	14.2	0.4
22	9.82	0.17	6.84	0.23	16.7	0.3
26	9.72	1.16	5.07	0.22	14.8	1.2
30	10.28	1.11	4.75	0.71	15.0	1.3
34	10.26	0.20	4.49	0.23	14.8	0.3
38	10.58	1.07	4.27	0.21	14.9	1.1
Середня концентрація ФП у зразку					14.9±1.1 мг/кг	

Попередній експеримент дає результати середньої концентрації ФП LMB002 у зразку 14.9 ± 1.1 мг/кг.

У 5 г фаршу внесено 277 мкл розчину ФП 1 мг/мл, тобто у 5 г фаршу (чи у 5,537 г суміші) внесено 277 мкг ФП. Концентрація ФП на отриману суміш фарш+рідина $277 \text{ мкг} / 0,005537 \text{ кг} = 50\,027 \text{ мкг/кг}$ або 50,03 мг ФП / кг суміші. Концентрація ФП на масу фаршу $277 \text{ мкг} / 0,005537 \text{ кг} = 55\,400 \text{ мкг/кг}$ або 55,4 мг ФП / кг фаршу.

Тобто вилучається орієнтовно 30 % внесеної речовини, що не дає змоги оцінювати ступінь перетворення біологічно неактивної форми модифікованого граміцидину С у активну форму (можливо, одна з форм більше утримується з сумішшю, ніж інша, тощо).

Якщо припустити, що розподілення на етапі екстракції ацетонітрилом-водою рівномірне, то з грубої оцінки (0.7 мл екстрагенту / 1.2 г екстрагент+суміш = 0.58) має екстрагуватись принаймні 58 % усієї речовини, чи хоча б 29 мг/кг.

Ймовірними причинами низького вилучення можуть бути: недостатня гомогенізація зразка суміші фаршу, буферного розчину, розчину ФП; недостатнє перемішування експонованої суміші та екстрагенту ацетонітрил-вода; недостатня кількість екстракцій (необхідність повторної екстракції експонованої суміші); низький коефіцієнт розподілу ФП між фазами екстрагенту та модельної тканини (необхідність заміни екстрагенту).

2.2 Аналіз результатів модифікованого вилучення фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів з модельної біологічної тканин

2.2.1 Початкові спроби вдосконалення вилучення фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів з модельних тканин

Спочатку було модифіковано пробопідготовку наступним чином: гомогенізація відбувалась шляхом перемішування суміші на ZX3 Advanced Vortex Mixer протягом 3 хвилин обертовими рухами з періодичними перемішуваннями вмісту шпателем, а також було виконано повторну екстракцію.

Для детектування форм LMB002 методом РХ було визначено наступні довжини хвиль:

- неактивована форма ФП містить максимум поглинання при $\lambda=570$ нм;
- максимум поглинання активованої форми знаходиться на краю діапазону при $\lambda=210$ нм. Крім того, є локальний максимум поглинання при $\lambda=270$ нм.

Проте при $\lambda \leq 220$ нм хроматограма фаршу без ФП містить значну кількість піків, в тому числі з часом утримання близьким до часу утримання піка відкритої форми ФП. Виходячи з цих міркувань, подальший аналіз проводився на довжинах хвиль $\lambda=270$ нм та $\lambda=570$ нм.

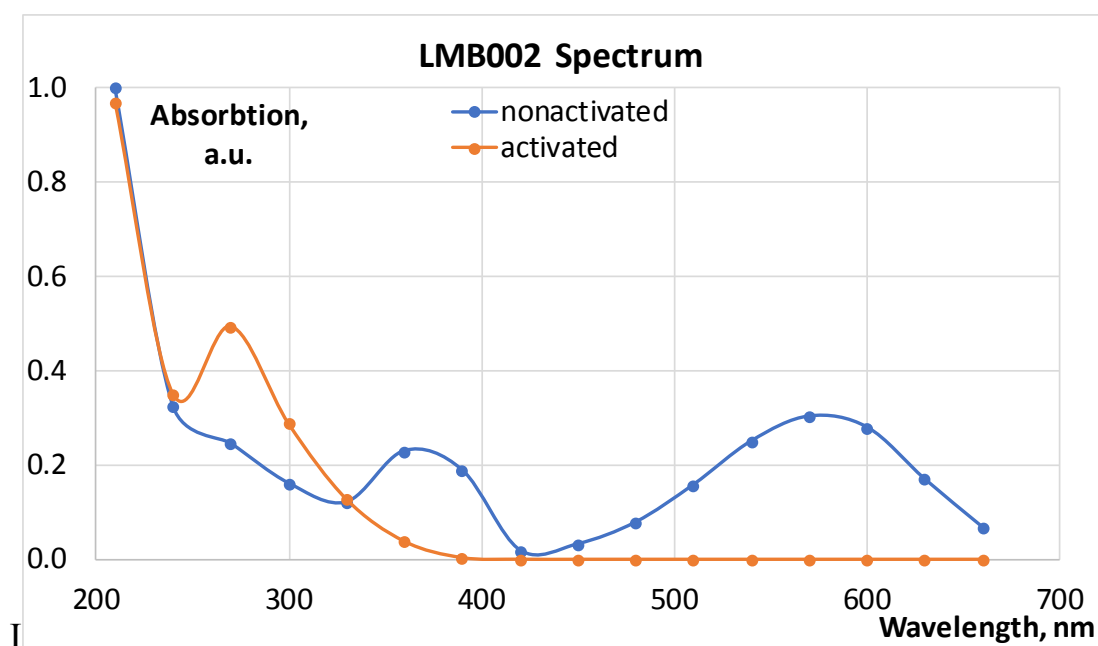


Рис. 2.2. Спектр поглинання LMB002

Таблиця 2

Розрахована концентрація ФП LMB002 для проб, отриманих при початкових спробах вдосконалення вилучення

№ зразка	Перша екстракція серія А				Друга екстракція серія В				Калібрувальний розчин ФП	
	1		2		1		2			
Форма ¹	А	НА	А	НА	А	НА	А	НА	А	НА
Площа	0	3295552	0	3259663	0	343579	0	162880	3941043	3887876
Концентрація ФП, мг/кг	21.05		20.82		2.19		1.04		50.00	
w, %	42.10		41.64		4.38		2.08		-	

При початкових спробах усунення низького вилучення ФП (впровадження гомогенізації суміші за допомогою ZX3 Advanced Vortex Міхер протягом 3 хвилин та повторної екстракції) сумарний рівень вилучення становить $45.10 \pm 1.38\%$. Тобто ступінь вилучення було підвищено на 12%,

¹ А – активована форма ФП, НА – неактивована форма.

втім значення концентрації ФП нижче за очікуване при рівномірному розподіленні при екстракції.

Також результати повторної екстракції не є відтворюваними, тому необхідне подальше вдосконалення вилучення ФП з суміші, зокрема гомогенізації.

Було визначено два основні напрями вдосконалення: гомогенізація та екстракція.

2.2.2 Дослідження гомогенізації суміші

Заходи, спрямовані на вдосконалення гомогенізації:

1) Перемішування суміші на ZX3 Advanced Vortex Mixer протягом 10 хвилин обертовими рухами з періодичними перемішуваннями вмісту шпателем.

2) Перемішування суміші з екстрагентом протягом 5 хвилин.

Задля перевірки достатнього ступеня гомогенізації варто ввести маркерну речовину, та провести всі етапи попередньої пробопідготовки з урахуванням заходів для вдосконалення.

Спочатку у якості маркерної речовини було обрано метиленовий синій. Для визначення ступеня вилучення було необхідне визначення концентрації метиленового синього у екстрагентах, що проводилось за допомогою методу спектрофотометрії. Однак в даному експерименті значення поглинань екстрактів не є відтворюваними.

Також були спроби провести аналогічні дії з метилоранжем у якості маркерної сполуки, однак екстракти також були у вигляді емульсії, що не дозволяє отримувати відтворювані результати методом спектрофотометрії.

Однією з вимог до розчинів для дослідження методом спектрофотометрії є однорідність розчину. Так як екстракція відбувається зі

складної матриці (фарш), то екстракція розчином ацетонітрил-вода не дозволяє отримати однорідний розчин (рідина містить частинки тканини, краплі жиру, тощо). Це вимагає заміни екстрагента для перевірки гомогенізації.

Було проведено пошук наукової літератури задля вибору іншого екстрагенту. У науковій публікації «LAVILLE, I. (2004). A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*» екстракцію порфіринів з суспензії клітин здійснювали етилацетатом. Тому було прийнято рішення для перевірки гомогенізації здійснити **заміну екстрагенту з ацетонітрил-вода на етилацетат.**^[15]

Для перевірки гомогенізації маркерна речовина має бути добре розчинна у обраному екстрагенті. Прикладом речовини, яка добре розчинна у етилацетаті, є метиловий червоний.

Результати перевірки вдосконаленої гомогенізації

№	Масова частка екстрагенту в суміші з екстрагентом, %	Очікувана концентрація метилового червоного в екстракті за умови повного вилучення, 10^{-4} М	Виміряна концентрація метилового червоного в екстракті, 10^{-4} М	Ступінь вилучення, %
1_1	44.73	1.97	1.10	36.72
1_2	44.58	1.96	1.38	45.49
1_3	44.06	1.91	1.38	44.55
2_1	43.62	1.87	1.38	43.75
2_2	43.76	1.88	1.38	44.00
2_3	44.34	1.94	1.38	45.05
3_1	44.55	1.95	1.57	51.77
3_2	44.67	1.96	1.38	45.66
3_3	43.96	1.91	2.23	71.96
Середнє теоретичне вилучення 44.25 ± 0.65 %			Середнє практичне вилучення 44.62 ± 7.90 %	

У припущенні, що розподіл маркерної речовини між сумішшю та екстрагентом є рівномірним, то в екстрагенті має міститись $44.25 \pm 0.65\%$ від вмісту маркерної речовини у системі, що відповідає масовому вмісту екстрагенту у системі суміш-екстрагент.

Практичне вилучення було розраховано як відношення вимірної концентрації метилового червоного у екстрагенті до розрахованої концентрації метилового червоного у екстрагенті за умови 100% вилучення.

Висновок: отримані результати щодо екстракції для трьох серій зразків суміші фаршу та метилового червоного свідчать **про рівномірне розподілення маркерної речовини у суміші фаршу з 10% водним наповненням**, так як значення ступеня вилучення метилового червоного з суміші становить $44.62 \pm 7.9 \%$.

Також значення ступеня вилучення є близьким до значення розрахованого ступеня вилучення за умови рівномірного масового розподілення маркерної речовини між сумішшю та екстрагентом етилацетатом.

2.2.3 Вдосконалення процедури екстракції

2) Екстракція (вибір екстрагенту; кількість послідовних екстракцій)

Заходи, спрямовані на підвищення ефективності екстракції:

1) При використанні екстрагенту ацетонітрил 70% + вода 30% отримані екстракти не є одразу придатними для дослідження методами рідинної хроматографії та спектрофотометрії, адже екстракти не є однорідними, а саме містять видимі частинки жиру та тканини тощо. Альтернативою обрано використання у якості екстрагенту етилацетату або ацетонітрилу без води.

2) Проведення повторної екстракції та об'єднання з отриманими екстрактами з першого вилучення.

Результати першої екстракції метилового червоного ацетонітрилом

№	Масова частка екстрагента в суміші з екстрагентом, %	Очікувана концентрація метилового червоного в екстракті за умови повного вилучення, 10^{-4} М	Виміряна концентрація метилового червоного в екстракті, 10^{-4} М	Ступінь вилучення, %
1_1	51.48	2.94	2.04	69.28
1_2	51.88	2.99	2.04	68.18
1_3	52.21	3.03	2.13	70.49
1_4	51.96	3.00	2.52	84.12
2_1	53.62	3.20	2.04	63.58
2_2	52.40	3.05	2.04	66.76
2_3	52.57	3.07	2.04	66.34
2_4	52.23	2.96	1.77	59.54
Середнє теоретичне вилучення 52.23±1.39 %			Середнє практичне вилучення 68.54±15.58 %	

У припущенні, що розподіл маркерної речовини між сумішшю та екстрагентом є рівномірним, то в екстрагенті має міститись 52.23±1.39% від вмісту маркерної речовини у системі. Визначений ступінь вилучення при екстракції ацетонітрилом (68.54±15.58 %) є вищим за розрахований, що означає, що рівновага при екстракції зсунута в бік ацетонітрилу.

Практичне вилучення було розраховано як відношення вимірної концентрації метилового червоного у екстрагенті до розрахованої концентрації метилового червоного у екстрагенті за умови 100% вилучення.

При першій екстракції маркерної речовини етилацетатом було встановлено ступінь вилучення 44.62 ± 7.9 % речовини, тобто більше половини речовини ще лишається у суміші. Тому було прийняте рішення про повторну екстракцію досліджуваних зразків, результати якої наведено нижче.

Таблиця 5

Результати повторної екстракції метилового червоного

№	Очікувана концентрація метилового червоного в екстракті за умови повного вилучення при першій екстракції, 10^{-4} М	Вимірня концентрація метилового червоного в екстракті, 10^{-5} М	Ступінь вилучення, %
1_1	1.97	2.52	8.38
1_2	1.96	0.00	0.00
1_3	1.91	4.48	14.50
2_1	1.87	6.48	20.61
2_2	1.88	8.24	26.35
2_3	1.94	16.00	52.39
3_1	1.95	13.02	43.05
3_2	1.96	13.02	43.27
3_3	1.91	6.48	20.89
Вилучення			25.49 ± 26.90

Практичне вилучення було розраховано як відношення вимірної концентрації метилового червоного у екстрагенті до розрахованої концентрації метилового червоного у екстрагенті за умови 100% вилучення при першій екстракції. Отримані результати екстракції лежать у широкому діапазоні значень. Такий розкид даних відбувається через те, що, ймовірно, на значення оптичної густини впливає не лише концентрація метилового червоного у екстракті, а й об'ємне співвідношення вода-етилацетат.

Тому було досліджено залежність значення коефіцієнту екстинції від співвідношення вода-етилацетат у розчині. Розчинність води в етилацетаті становить 9.7% по масі. Для порівняння було взято три серії етилацетатних розчинів з масовою часткою води 0, 2.2, і 4.4% відповідно. Їх було досліджено методом спектрофотометрії. Отримані результати на графіку нижче.

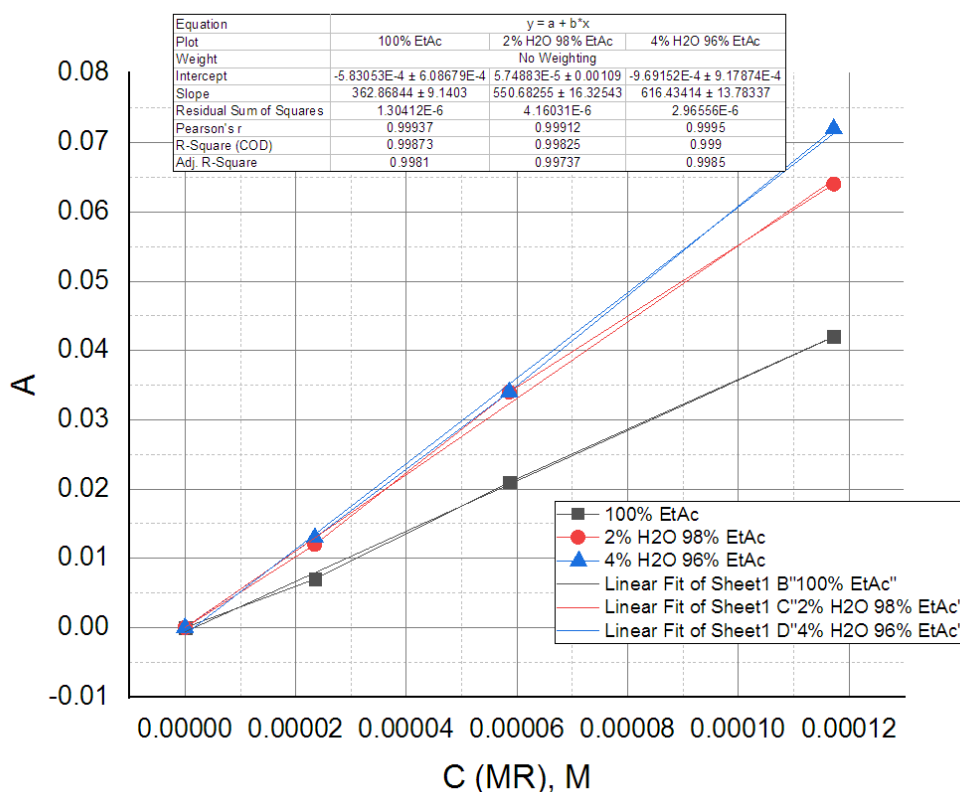


Рис. 2.2. Залежність значення оптичної густини від співвідношення вода:етилацетат

**Залежність значення коефіцієнту екстинції від співвідношення
вода:етилацетат**

С (метилового червоного), 10^{-5} М	Коефіцієнт екстинції ε_1 , $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$	Коефіцієнт екстинції ε_2 , $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$	Коефіцієнт екстинції ε_3 , $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$
2.4	304	356	359
5.9	458	576	542
11.8	458	576	615
Середнє значення	407	503	505

Було підтверджено вплив співвідношення вода:етилацетат на значення коефіцієнту екстинції: чим більший вміст води у етилацетаті, тим більший коефіцієнт екстинції.

Висновок: результати повторної екстракції не є відтворюваними через те, що у екстрактах різне співвідношення вода:етилацетат, тому екстракти мають різні коефіцієнти екстинції та, відповідно, різні значення оптичної густини.

При першій екстракції вилучення етилацетатом води з суміші обмежується розчинністю води в етилацетаті, адже в суміші міститься більше води, ніж може розчинити 0.7 мл етилацетаті. Після першого вилучення у суміші лишається менша кількість води, аніж може вилучити етилацетат об'ємом 0.9 мл, втім вона може бути різною через недостатню однорідність фаршу. Тому екстракти, отримані при повторному вилученні, мають різне співвідношення вода:етилацетат, що робить дані невідтворюваними.

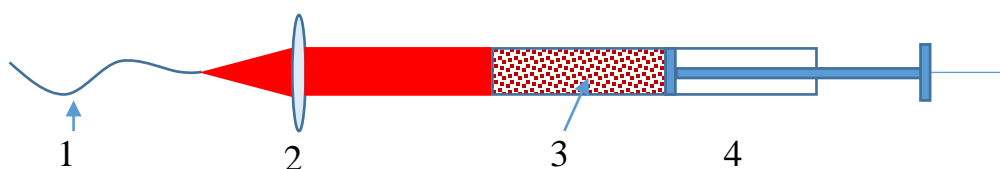
3. Експериментальна частина

3.1 Обладнання та схема експерименту

Обладнання:

- лазер LIKA-surgeon $\lambda=660$ нм з оптоволоконним виходом;
- вимірювач потужності ИМО-2Н;
- мікроцентрифуга Eppendorf 5415C, 14000 RPM max, 16000g RCF max;
- мікроцентрифуга NEYA MULTISPIN 12;
- спектрофотометр спектрофотометр ULAB 102UV;
- ZX3 Advanced Vortex Mixer
- система для рідинної хроматографії Agilent 1100, укомплектована колонкою для хроматографії з оберненою фазою та мультихвильовим 8-канальним детектором G1365C. Температура колонки 30°C. Елюенти вода з домішкою 0,1% трифтороцтової кислоти (розчин А) та 90% розчин ацетонітрилу у воді (розчин В). Довжини хвиль для аналізу: 270 та 570 нм.

Схема експерименту показана на рис. 3.1, фотографія установки – на рис. 3.2.



1. Світловод від лазера LIKA-surgeon.
2. Об'єктив зі змінною фокусною відстанню Гранит-11.
3. Фарш з домішкою фотопептиду.
4. Шприц, вміщений в непрозорий чохол.

Рис. 3.1. Схема експерименту



Рис. 3.2. Фотографія експериментальної установки

3.2 Експериментальна частина попереднього дослідження з фотоактивації фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів у модельних тканинах

Об'єктом дослідження: шприц з сумішшю, яка складається з 5 г фаршу об'ємом $V=4.83 \text{ см}^3$, 537 мкл рідини (277 мкл розчину ФП 1 мг/мл змішати з 260 мкл буферного розчину) (10% об'ємне заповнення). Об'єкт експонувався напівпровідниковим лазером LIKA-surgeon з оптоволоконним виходом та довжиною хвилі 660 нм.

Пробопідготовка:

- 1) Експоновану суміш розділено на 10 порцій (по 0.5 г фаршу);
- 2) До кожної з отриманих порцій додано 0.7 мл розчину ацетонітрил 70% + вода 30% та перемішано вміст кожної пробірки вузьким шпателем;
- 3) Проведено центрифугування протягом 20 хв., 8000 об/хв;
- 4) Відділено по 0.7 мл з кожного зразка отриманої після центрифугування рідини, та відцентрифуговано протягом 30 хв., 14000 об/хв.
- 5) Віддібрано по 0.5 мл рідини після попереднього центрифугування та досліджено отримані зразки методом РХ.

Дослідження методом РХ: отримані хроматограми кожного зразка та хроматограму порожнього заколу для компенсації дрейфу базової лінії при $\lambda=220, 240, 270, 300, 330, 360, 570$ та 600 нм. Для аналізу обрано хроматограми, зареєстровані при $\lambda=270$ (активована форма) та 570 (неактивована форма) нм.

3.3 Експериментальна частина початкових спроб вдосконалення вилучення фоточутливих діарилетиленвмісних пептидів з модельних тканин

Початковий об'єкт дослідження: суміш, яка складається з 4.5 г фаршу, 500 мкл рідини (260 мкл розчину ФП 1 мг/мл змішано з 240 мкл води) (10% об'ємне заповнення). Гомогенізація суміші проводилась на ZX3 Advanced Vortex Mixer протягом 3 хвилин обертовими рухами.

Пробопідготовка зразків для дослідження методом РХ:

- 1) Було відібрано наважки сумішей по по 0.5 г;
- 2) До кожної з отриманих порцій додано 0.7 мл розчину ацетонітрил 70% + вода 30% та перемішано;
- 3) Проведено центрифугування протягом 3 хв., 12 000 об/хв;
- 4) Відділено по 0.7 мл з кожного зразка отриманої після центрифугування рідини, та відцентрифуговано протягом 3 хв., 12 000 об/хв.
- 5) Віддібрано по 0.7 мл рідини, отриману серію екстрактів позначено **1А, 2А**.
- 6) До сумішей знову додано 0.7 мл розчину ацетонітрил 70% + вода 30% та перемішано;
- 7) Проведено центрифугування протягом 3 хв., 12 000 об/хв;
- 8) Відділено по 0.7 мл з кожного зразка отриманої після центрифугування рідини, та відцентрифуговано протягом 3 хв., 12 000 об/хв.

9) Віддібрано по 0.7 мл рідини, отриману серію екстрактів позначено **1В, 2В**.

Додатково було приготовано **бланк** (ацетонітрильно-водний розчин ФП концентрацією 0.020 мг/мл).

Зразки **1А, 2А, 1В, 2В, бланк** було досліджено методом рідинної хроматографії. Для аналізу обрано хроматограми, зареєстровані при $\lambda=270$ (активована форма) та 570 (неактивована форма) нм.

Хроматограми для довжин хвиль 570 нм (неактивована форма) та 270 нм (активована форма) зразків 1А, 2А, 1В, 2В, бланку наведено у **Додатку, Рис. 1-5**.

Піки активованої форми присутні на хроматограмі, зареєстрованій при $\lambda=270$ нм, піки неактивованої форми - на хроматограмі, зареєстрованій при $\lambda=560$ нм. Час виходу активованої форми 6.1 хв., неактивованої форми - 2.0 хв.

3.3.1. Експериментальна частина дослідження гомогенізації суміші

Пробопідготовка задля перевірки гомогенізації:

1) Відібрано 4.5019 г фаршу, додано 0.250 мл (0.250 г) розчину метилового червоного 1 мг/мл і 0.250 мл води.

2) Суміш було перемішано шпателем, та витримано на ZX3 Advanced Vortex Mixer протягом 10 хвилин обертовими рухами з періодичними перемішуваннями вмісту шпателем.

3) Зроблено 3 наважки суміші по 0.5 г, додано по 0.7 мл етилацетату, перемішано протягом 5 хвилин.

4) Проведено центрифугування протягом 3 хв., 12000 об/хв.

5) Відділено по 0.5 мл з кожного зразка отриманої після центрифугування рідини, та доведено до 4 мл.

б) Отримані розчини було досліджено методом спектрофотометрії при $\lambda=560$ нм (перед цим побудовано калібрувальну залежність по етилацетатним розчинам метилового червоного з молярними концентраціями $2.4e-5$ - $11.8e-5$; розчином порівняння був етилацетат; також було зроблено три серії екстрактів фаршу без маркерної речовини, виміряно їхню оптичну густину, яку потім віднято від значень поглинань екстрактів метилового червоного).

Було аналогічно виконано пробопідготовку для ще двох суміші з масами фаршу 4.5251 г і 4.5043 г.

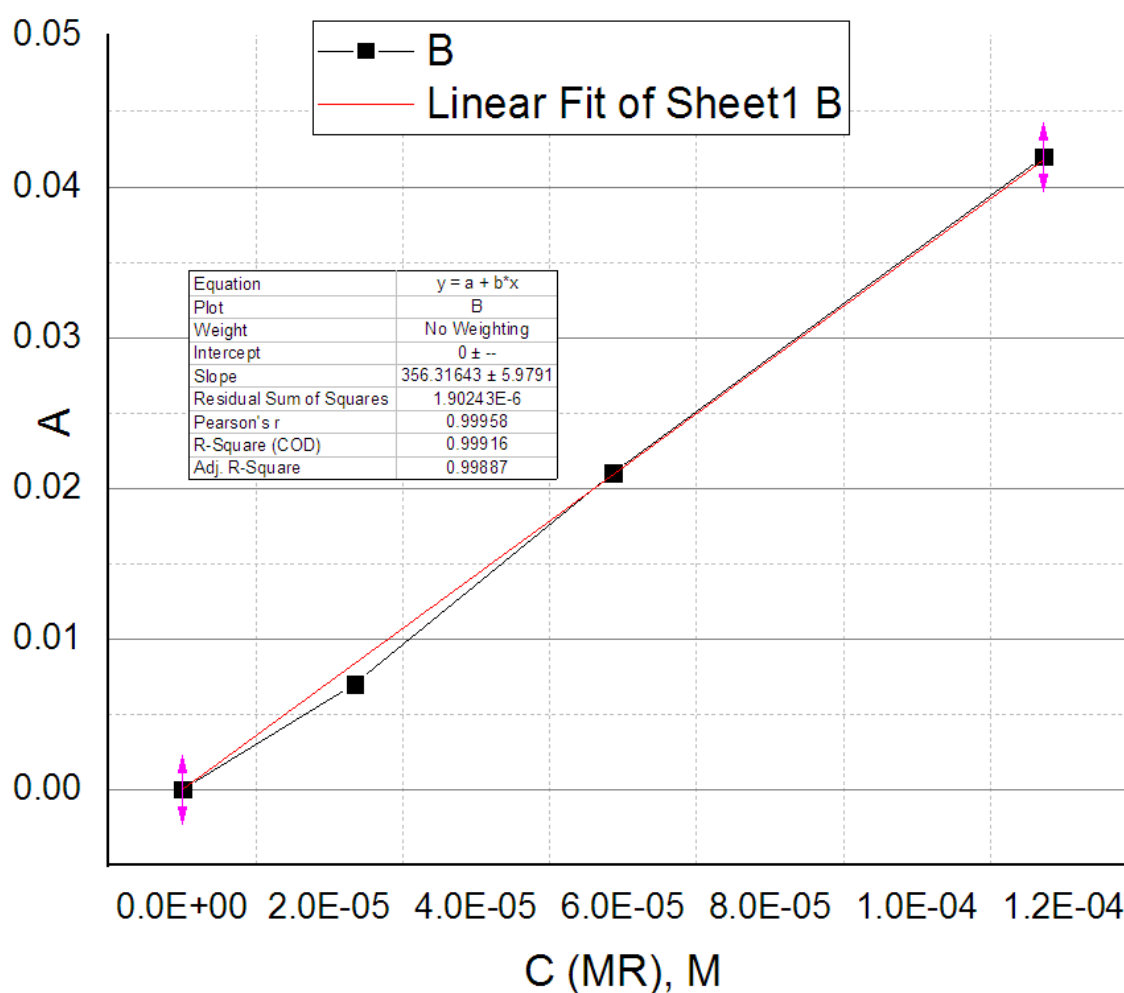


Рис. 3.3. Калібрувальний графік етилацетатних розчинів метилового червоного

Дослідження екстракції метилового червоного ацетонітрилом

Для порівняння проведено екстракцію розчином 70% ацетонітрил+30% вода, а також ацетонітрилом без додавання води.

Пробопідготовка зразків відбувалась так само, як описано в пункті «Пробопідготовка задля перевірки гомогенізації» з заміною екстрагенту на: а) розчин 70% ацетонітрил+30% вода, б) ацетонітрилу без додавання води. Відділені по 0.5 мл екстракти доводили до 4 мл розчином 70% ацетонітрил+30% вода.

Отримані розчини було досліджено методом спектрофотометрії при $\lambda=560$ нм (перед цим побудовано калібрувальну залежність по 70% ацетонітрильно- 30% водним розчинам метилового червоного з молярними концентраціями $2.0\text{e-}5$ - $10.1\text{e-}5$; розчином порівняння був розчин 70% ацетонітрил+30% вода; також було зроблено три серії екстрактів фаршу без маркерної речовини, виміряно їхню оптичну густину, яку потім віднято від значень поглинань екстрактів метилового червоного).

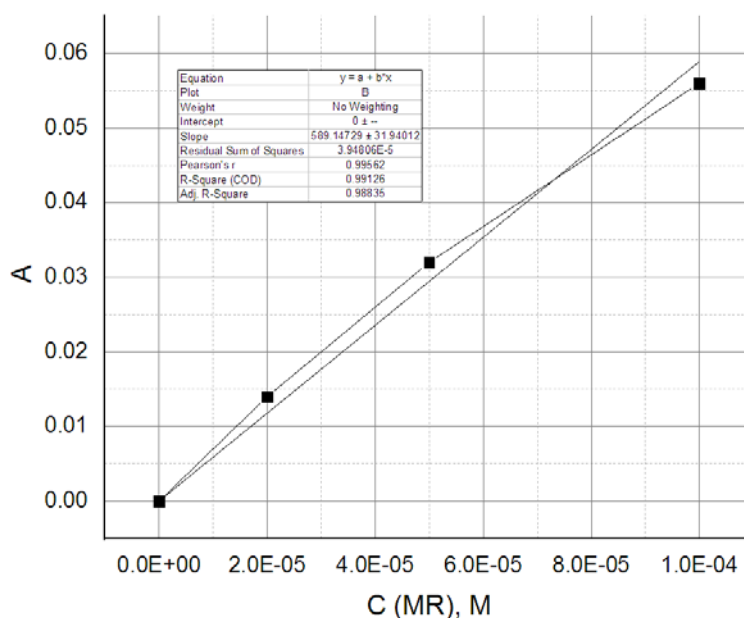


Рис. 3.4. Калібрувальний графік ацетонітрильних розчинів метилового червоного

Екстракти 70% ацетонітрил-30% вода не є прозорими, а значення оптичної густини А утворюють великий розкид даних (0.028-0.152), ніж ті, що в калібрувальній залежності, тоді коли ацетонітрильні екстракти є прозорими, не містять частинки жиру та тканини. значення оптичних густин та визначених концентрацій метилового червоного у ацетонітрильних екстрактах наведено у Таблиці 4.

3.3.2 Вдосконалення процедури екстракції

Повторна екстракція метилового червоного етилацетатом

1) До сумішей після першої екстракції етилацетатом повторно додано 0.7 мл етилацетату, перемішано протягом 5 хвилин.

2) Проведено центрифугування протягом 3 хв., 12000 об/хв.

3) Відділено по 0.5 мл з кожного зразка отриманої після центрифугування рідини, та доведено до 4 мл.

4) Отримані розчини було досліджено методом спектрофотометрії при $\lambda=560$ нм (також було повторно екстраговано три серії екстрактів фаршу без маркерної речовини, виміряно оптичну густину отриманих екстрактів, отримане значення потім віднято від значень поглинань екстрактів метилового червоного).

Висновок

Було визначено наступні основні фактори, що впливають на ефективність вилучення LBM002 з модельної біологічної тканини (свинячий фарш з 10%-водним наповненням), а саме гомогенізація ФП з тканиною, тип екстрагенту та наявність послідовних екстракцій.

Достатнього розподілення речовини у модельній тканині вдається досягти з використання перемішування суміші з використанням за допомогою ZX3 Advanced Vortex Mixer протягом 10 хвилин.

При використанні в якості екстрагенту суміші 30% вода+ 70% ацетонітрил екстрагенти містять забруднюючі частинки, що може зашкодити системі хроматографування. Ступінь вилучення становить $33.0 \pm 3.2\%$, що є нижчим за очікуваним при рівномірному розподілі екстрагованої речовини між екстрагентом та модельною тканиною. При використанні в якості екстрагента етилацетату або ацетонітрилу екстракти не містять засмічуючих частинок, а ступінь вилучення речовини є вищим: $44.62 \pm 7.90\%$ з використанням етилацетату, що відповідає рівномірному розподілу між екстрагентом та тканиною, і $68.54 \pm 15.58\%$ з використанням ацетонітрилу, що свідчить про перехід більшої частини речовини в екстрагент.

При використанні повторної екстракції з суміші модельної тканини з LBM002 було отримано вищий ступінь вилучення сумарний рівень вилучення становить $45.10 \pm 1.38\%$. Тобто ступінь вилучення було підвищено на 12%.

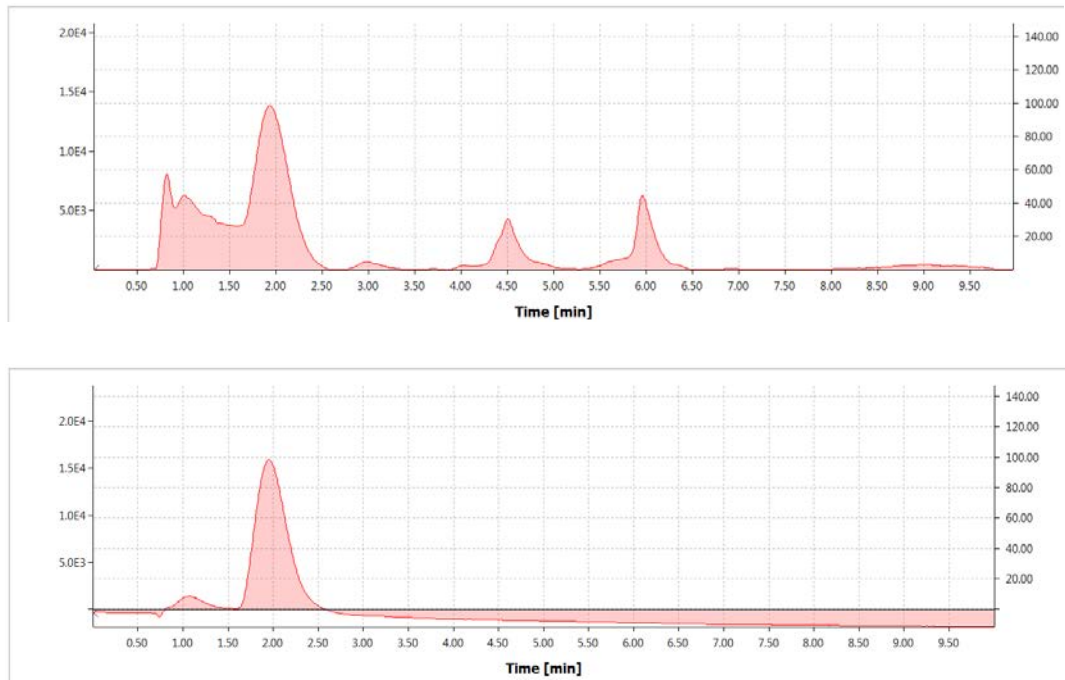
Визначено наступні кроки покращення вилучення: застосування описаної вище процедури гомогенізації, заміну екстрагенту на ацетонітрил чи етилацетат, та проведення повторної екстракції безпосередньо для LBM002 з модельної тканини після фотоактивації.

Список використаної літератури

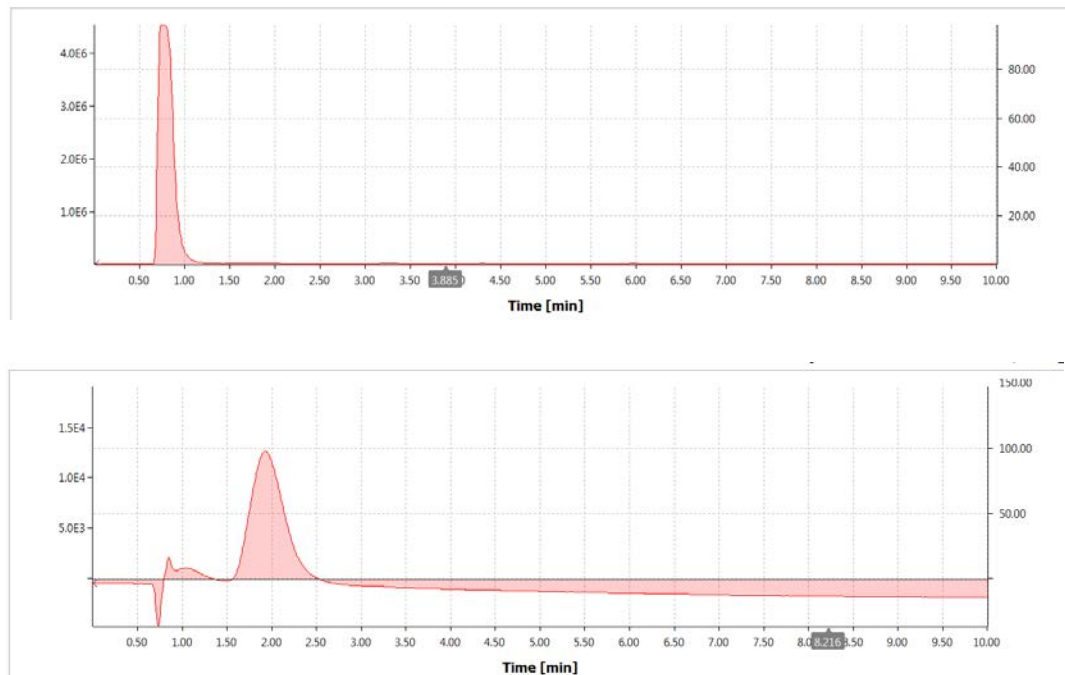
- 1) Fuchter, M. J. (2020). On the Promise of Photopharmacology Using Photoswitches: A Medicinal Chemist's Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(20), 11436–11447.
- 2) Blázquez-Castro, A.; Breitenbach, T.; Ogilby, P. R. Singlet oxygen and ROS in a new light: low-dose subcellular photodynamic treatment enhances proliferation at the single cell level. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014, 13, 1235-1240.
- 3) Kneuttinger AC. A guide to designing photocontrol in proteins: methods, strategies and applications. *Biol Chem.* 2022 Mar 31;403(5-6):573-613. doi: 10.1515/hsz-2021-0417. PMID: 35355495.)
- 4) Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. In vivo photopharmacology. *Chem. Rev.* 2018, 118, 10710-10747.)
- 5) Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Samanta, S.; Beharry, A. A.; Woolley, G. A. Redshifting azobenzene photoswitches for in vivo use. *Acc. Chem. Res.* 2015, 48, 2662-2670.)
- 6) Babii, O., Afonin, S., Garmanchuk, L. V., Nikulina, V. V., Nikolaienko, T. V., Storozhuk, O. V., ... Komarov, I. V. (2016). Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(18), 5493–5496.
- 7) K. Okamoto, Y. Tomita, H. Yonezawa, T. Hirohata, R. Ogura, N. Izumiya Inhibitory effect of gramicidin S on the growth of murine tumor cells in vitro and in vivo. *Oncology*, 41(1), 43-49 (1984).
- 8) O. Babii, S. Afonin, L.V. Garmanchuk, V.V Nikulina, T.V. Nikolaienko, O.V. Storozhuk, D.V. Shelest, O.I. Dasyukevich, L.I. Ostapchenko, V. Iurchenko, S. Zozulya, A.S. Ulrich, I.V. Komarov Direct Photocontrol of Peptidomimetics: An Alternative to Oxygen-Dependent Photodynamic

- Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(18), 5493–5496 (2016).
- 9) Stolik S, Delgado JA, Pérez A, Anasagasti L. Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human "ex vivo" tissues. *J Photochem Photobiol B*. 2000 Sep;57(2-3):90-3.
 - 10) Gunaydin G, Gedik ME, Ayan S. Photodynamic Therapy-Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem*. 2021 Jun 10;9:691697.
 - 11) van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H., Oliveira, S., and Robinson, D. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers* 9 (2), 19.
 - 12) Carroll, L., and Humphreys, T. R. (2006). LASER-tissue Interactions. *Clin. Dermatol*. 24 (1), 2–7.
 - 13) Kim, M. M., and Darafsheh, A. (2020). Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol*. 96 (2), 280–294.
 - 14) Brancalion, L., and Moseley, H. (2002). Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med. Sci*. 17 (3), 173–186.
 - 15) Laville, I., Pigaglio, S., Blais, J.-C., Loock, B., Maillard, P., Grierson, D. ., & Blais, J. (2004). A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(13), 3673–3682.

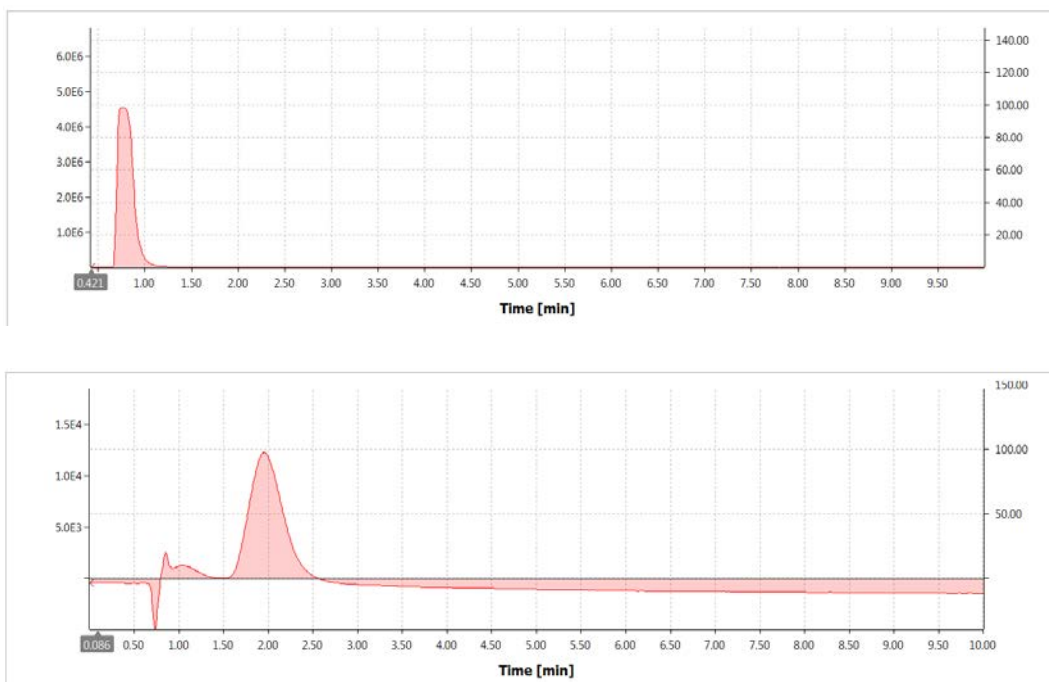
ДОДАТКИ



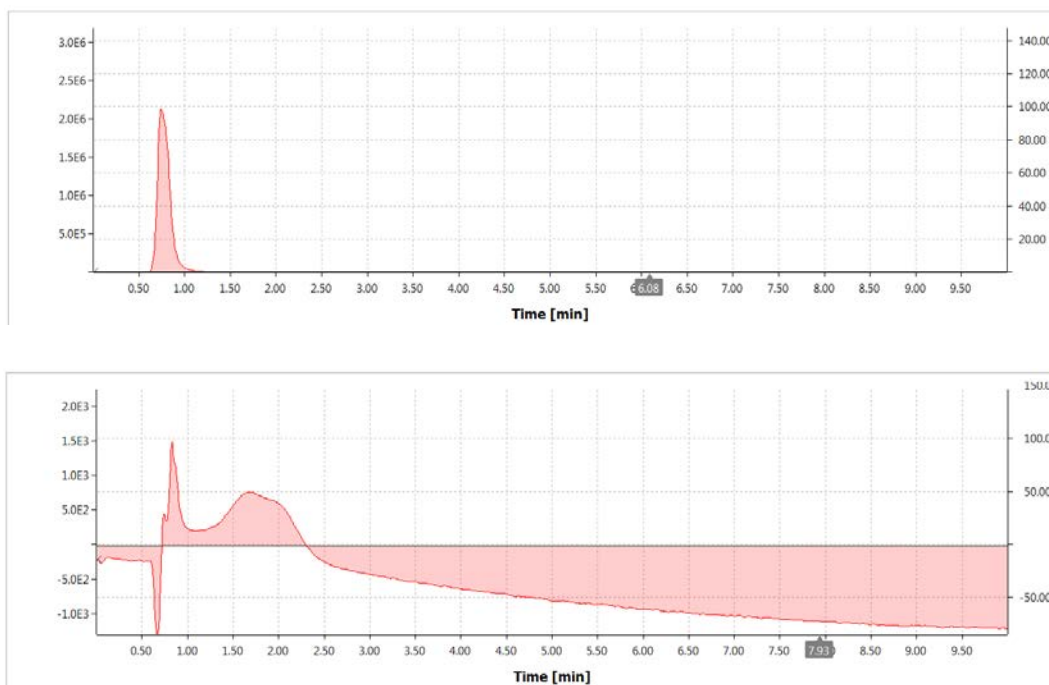
**Рис. 1. Хроматограми бланку: вгорі для $\lambda=270$ нм (активована форма);
внизу 570 нм (неактивована форма).**



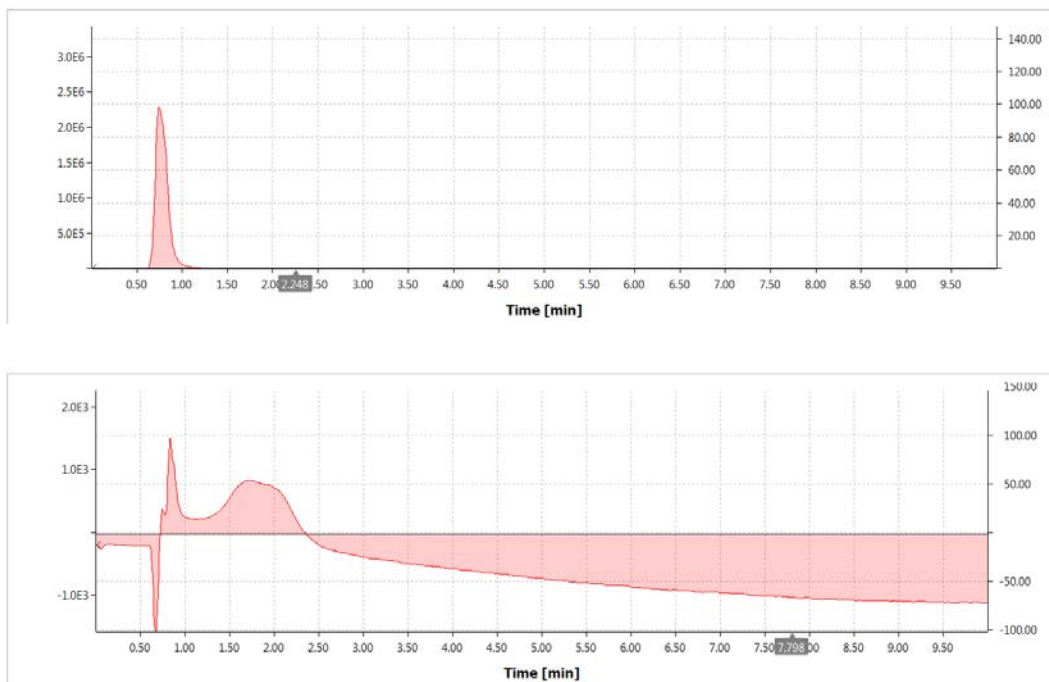
**Рис. 2. Хроматограми зразка 1А: вгорі для $\lambda=270$ нм (активована форма);
внизу 570 нм (неактивована форма).**



**Рис. 3. Хроматограми зразка 2А: вгорі для $\lambda=270$ нм (активована форма);
внизу 570 нм (неактивована форма).**



**Рис. 4. Хроматограми зразка 1В: вгорі для $\lambda=270$ нм (активована форма);
внизу 570 нм (неактивована форма).**



**Рис. 5. Хроматограми зразка 2В: вгорі для $\lambda=270$ нм (активована форма);
внизу 570 нм (неактивована форма).**