

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК мТГФХ В РАСТВОРАХ, БЕЛКАХ И НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛАХ

И. В. Яковец, И. В. Янковский

ВВЕДЕНИЕ

Хлорины обладают оптимальными фотофизическими параметрами для применения в клинической практике в качестве фотодинамически активных соединений: высокий квантовый выход образования длительно живущего триплетного состояния, что обеспечивает эффективную генерацию синглетного кислорода, а также высокий коэффициент экстинкции в спектральном диапазоне, наиболее прозрачном для тканей. Одним из наиболее эффективных сенсibilizаторов для целей фотодинамической терапии является 5,10,15,20-Тетра-(*мета*-гидроксибензил)хлорин (мТГФХ), который по своей фотодинамической активности значительно превосходит большинство фотосенсibilizаторов второго поколения. Однако мТГФХ плохо растворяется в воде, что требует использования для введения в организм различных систем, например в смеси растворителей, полимеров, униламелярных липидных везикул (УЛВ). Для клинического использования важны методы контроля распределения мТГФХ между системами такого рода и биологическими структурами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали м-ТГФХ предоставленный Biolitec (Йена, Германия), эмбриональную сыворотку телят (ЭСТ), метил- β -циклодекстрин (м- β -ЦД) (Acros Organics, США). Липосомы готовили из дипальмитоилфосфатидилхолина методом экструзии.

Спектры возбуждения и флуоресценции исследовались на спектрофлуориметре Solar CM-2203 (Минск, РБ). Спектры поглощения регистрировались с использованием спектрофотометра SOLAR PV 1251A (Минск, Беларусь).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Спектрально-флуоресцентные характеристики мТГФХ определяются его принадлежностью к хлориновому ряду. В этанольных растворах наиболее интенсивная полоса поглощения располагается в области 416 нм (полоса Соре), в диапазоне 480-680 нм имеются еще 4 полосы поглощения, т.н. Q-полосы. Наибольшей интенсивностью поглощения характеризуется длинноволновая Q-полоса с максимумом 650 нм. В зависимости от типа микроокружения в растворе, положение полос претерпевает небольшие изменения (сдвиг 1-7 нм относительно этанольного раствора). Квантовый выход в органических растворителях мТГФХ составляет около 10%. В водной среде мТГФХ образует агрегаты, что сопровождается уширением полос поглощения и резким снижением квантового выхода флуоресценции. Добавление сывороточных белков (ЭСТ), нейтральных детергентов (Triton X-100), метил- β -циклодекстрина (м- β -ЦД) приводит к мономеризации и восстановлению его спектрально-флуоресцентных характеристик. Предотвращение агрегации пигмента в водных средах возможно введением мТГФХ в составе УЛВ.

Характерной особенностью спектральных характеристик мТГФХ в исследованных системах является вариабельность формы полосы Соре (рис. 1), которая выражается в изменении формы. Полоса Соре мТГФХ имеет разрешенную структуру с двумя максимумами ($\lambda_1=(405-407)$ нм, $\lambda_2=(416-423)$ нм), соотношение интенсивностей между которыми изменяется в различных растворах. Если в случае этанола, при исследовании спектров возбуждения флуоресценции отношение между этими пиками равно 0,87, то уже в растворе тетрагидрофурана (ТГФ) оно увеличивается до 0,91. Включение мТГФХ в состав УЛВ или его связывание с сывороточными белками приводит к значительному изменению формы полосы Соре, отношения интенсивностей полос в этом случае имеют близкие значения 0,73 и 0,75 соответственно. Связывание с м- β -ЦД не приводит к заметным изменениям формы полосы Соре.

При интерпретации спектров порфиринов и его производных обычно применяется четырёхорбитальная модель Гоутермана, в рамках которой описываются В-полоса (Соре) и Q-полосы. Исходя из этой модели, полоса Соре (В-полоса) соответствует разрешённому π - π^* переходу из основного состояния S_0 во второе возбужденное состояние S_2 . Этот переход является вырожденным для симметричных порфиринов и расщеплённым по энергии в случае хромофора с нарушенной симметрией, как в случае мТГФХ. Дипольные моменты V_x - и V_y -переходов, ориентированы перпендикулярно друг другу в плоскости тетрапиррольного кольца [1]. Также в спектре поглощения имеют место электронные переходы на более высокие возбуждённые состояния, известные как N, L и т.д. полосы, которые соответству-

ют более слабому поглощению. Часто эти полосы включают в группу Core, но на самом деле они являются отдельными полосами [2]. В соответствии с данной моделью, мы аппроксимировали спектр мТГФХ в диапазоне 350-450 нм тремя отдельными полосами - V_x , V_y и N (рис. 2).

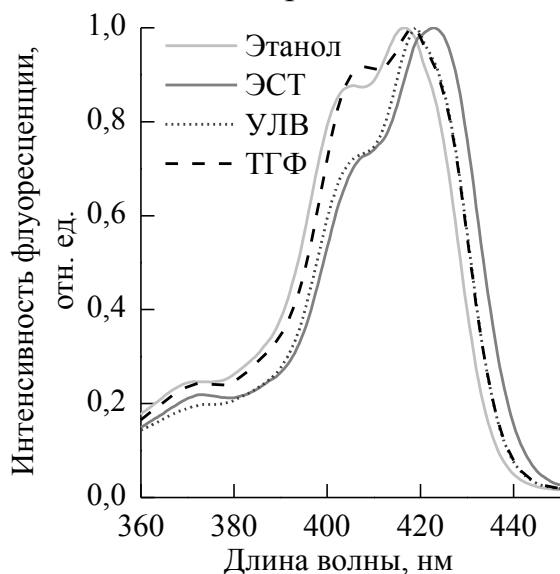


Рис. 1. Нормированные спектры возбуждения флуоресценции мТГФХ в различных растворах

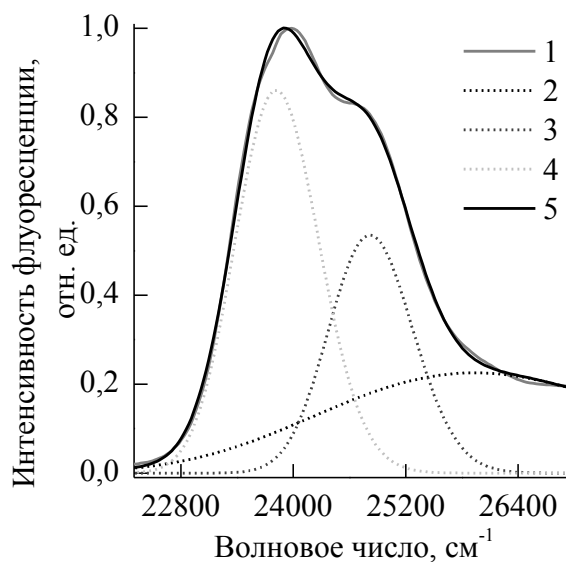


Рис. 2. Разложение полосы Core мТГФХ в этанольном растворе

1 – полоса Core, 2 – N-полоса, 3 – V_y -полоса, 4 – V_x -полоса, 5 – сумма V_x , V_y , N полос

В таблице представлены результаты исследования относительного веса отдельных полос в составе различных систем.

Табл.

Относительный вес составляющих полосы Core

Компонента	Этанол	м-β-ЦД	УЛВ	ТГФ	ЭСТ
N	0,39	0,35	0,35	0,39	0,37
V_y	0,23	0,32	0,19	0,27	0,19
V_x	0,38	0,33	0,46	0,34	0,44
V_y/V_x	0,61	0,97	0,43	0,79	0,41

Вклад N-полосы слабо изменяется в различных системах, а основной вклад в изменение формы полосы Core вносит изменение интенсивностей полос V_x и V_y . В случае этанола и тетрагидрофурана (ТГФ), отношение V_y/V_x равно 0,61 и 0,79 соответственно. Когда мТГФХ входит состав УЛВ или связывается с сывороточными белками отношение уменьшается до 0,41 - 0,43. При добавлении в водный раствор с мТГФХ нейтрального де-

тергента данный параметр равен 0,52. В комплексах с ЦД значение отношения относительных весов полос V_y/V_x достигает 0,97.

Следует отметить, что физико-химические свойства растворителей практически не влияют на форму полосы *Sore*, поэтому маловероятно, что наблюдаемые изменения интенсивностей полос связаны с влиянием полярности микроокружения. Причиной изменения относительной интенсивности полос V_x и V_y могут быть изменения конформации молекулы мТГФХ при связывании с биологическими структурами. Согласно кристаллографическим данным [3], две пары фенильных колец в мезо положениях располагаются под углами 61° и 76° относительно тетрапиррольного кольца. Включение мТГФХ в липидный бислой или в состав белковой глобулы в такой конформации маловероятно без значительных изменений структуры липидного бислоя или белка. На основании этого можно заключить, что при связывании мТГФХ происходят изменения конформации его молекулы, а именно уменьшение угла поворота фенильных групп по отношению к плоскости тетрапиррольного кольца. Эти конформационные изменения приводят к изменению состояния электронной оболочки мТГФХ и соответственно к спектрально-флуоресцентным изменениям, в том числе изменению формы полосы *Sore*. Поэтому вариабельность формы полосы *Sore* может использоваться для контроля за перераспределением мТГФХ между такими биологическими системами как белки сыворотки и молекулы м- β -ЦД.

ВЫВОДЫ

Установлено, что характерной особенностью спектральных характеристик мТГФХ в исследованных системах является вариабельность формы полосы *Sore*. Предполагается, что изменение формы полосы *Sore* связано в первую очередь с конформационными изменениями молекулы мТГФХ при встраивании в мембранные структуры, либо при связывании с белками.

Показано, что вариабельность формы полосы *Sore* может использоваться для контроля перераспределения молекул мТГФХ между биологическими структурами.

Литература

1. *Serano-Andres, L.* [et al.]. Theoretical study of the electronic spectrum of magnesium-porphyrin // *J. Phys. Chem.*, 1998. № 110. P. 7202 -7209
2. *Wheng-Li Cai*, [et al.]. Density Functional Theory for Charge Transfer: The Nature of the N-Bands of Porphyrins and Chlorophylls Revealed through CAM-B3LYP, CASPT2, and SAC-CI Calculations // *J. Phys. Chem. B.* 2006. № 110. P. 15624-15632.

3. Demore, D. [et al.]. Enhancement of 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)chlorin Fluorescence Emission by Inclusion in Natural and Modified Cyclodextrins // Applied spectroscopy. 1999. № 53. P. 523-528.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЯЕНИЯ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В КЛЕТКАХ

М. А. Яковлева, Е. Н. Голубева, М. В. Шуба

ВВЕДЕНИЕ

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой полые цилиндры, состоящие из одного или нескольких свернутых листов графена. УНТ рассматриваются в качестве перспективных материалов для нано- и молекулярной электроники, фотоники и медицины. Уникальные механические, оптические и электронные свойства УНТ определяют самые различные сферы их применения: в области полевых транзисторов, полимерных композитов, прозрачных проводников микроэлектромеханических систем нового поколения, средств адресной доставки лекарств и нуклеиновых кислот, визуализации опухолей, для оценки точности попадания препарата в органы и ткани.

Наиболее популярным и надежным методом диагностики является спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света, которая известна как быстрый и неразрушающий способ определения структурных параметров различного рода наноструктур [1].

КОМБИНАЦИОННОЕ РАССЕЯНИЕ ДЛЯ УНТ

Спектроскопия КР наиболее чувствительна к высокосимметричным ковалентным связям с малыми или отсутствующими дипольными моментами. Углерод-углеродные связи полностью соответствуют этому критерию, поэтому спектроскопия КР способна обнаруживать мельчайшие изменения в структуре материала, что делает ее чрезвычайно ценным методом исследования [2].

Высокая интенсивность сигнала комбинационного рассеяния углеродной нанотрубки обусловлена резонансным характером взаимодействия УНТ с возбуждающим излучением. Спектр КР УНТ имеет несколько характерных и уникальных черт. Первой особенностью является G-полоса, $\sim 1590 \text{ cm}^{-1}$, связанная с оптическими колебаниями двух смежных атомов углерода в решетке нанотрубки. Второй важной особенностью спектров