

# ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СИММЕТРИЧНЫХ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ПОЛИМЕРАМИ

К.Н. Каплевский, Д.Г. Мельников, А.П. Луговский, Л.С. Ляшенко,  
М.П. Самцов, Е.С. Воропай

НИИ ПФП им. А.Н.Севченко БГУ, г. Минск

Индотрикарбоцианиновые красители способны эффективно поглощать свет в области "фототерапевтического окна" – от 600 до 1000 нм. В этом заключаются их определенные преимущества перед существующими фотосенсибилизаторами (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей [1-4]. В тоже время, аккумуляирование ФС в опухолях определяется совокупностью факторов, зависящих как от особенностей опухоли, так и от физико-химической структуры молекул ФС. Известно, что данный процесс в условиях *in vivo* в значительной степени зависит от природы носителей. В этой связи представляют значительный интерес фотосенсибилизаторы, связанные с полимерами.

Целью работы являлось изучение физических механизмов распределения полиметиновых красителей в растворах органических полимеров.

Объект исследования – симметричный индотрикарбоцианиновый краситель (рис.1) в растворах с сывороточным альбумином человека (САЧ) или быка (САБ), кремофором (stomphor) и производными поливинилпирролидона (ПВП). Исследованный краситель синтезирован в лаборатории спектроскопии НИИ ПФП им. А.Н. Севченко.

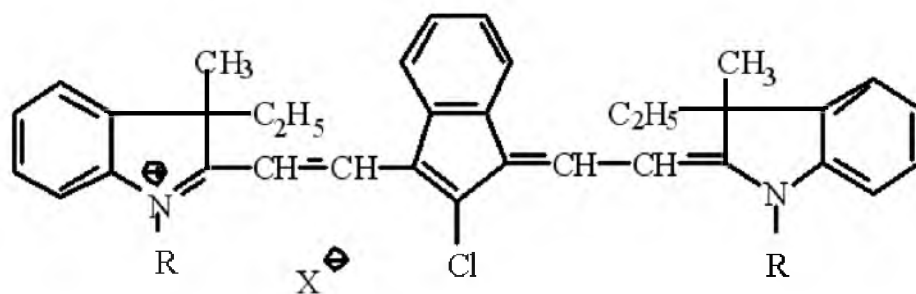


Рис. 1. Структурная формула индотрикарбоцианинового красителя.  
X=Br, R – заместитель

Результаты. Обнаружено, что увеличение концентрации ПВП в водном растворе сопровождается ростом оптической плотности в области максимума поглощения красителя, что, вероятно, является следствием процесса комплексообразования молекул красителя с полимерной структурой (рис. 2). При этом наблюдается сдвиг положения максимума спектра поглощения на 7 нм по сравнению с водным раствором красителя.

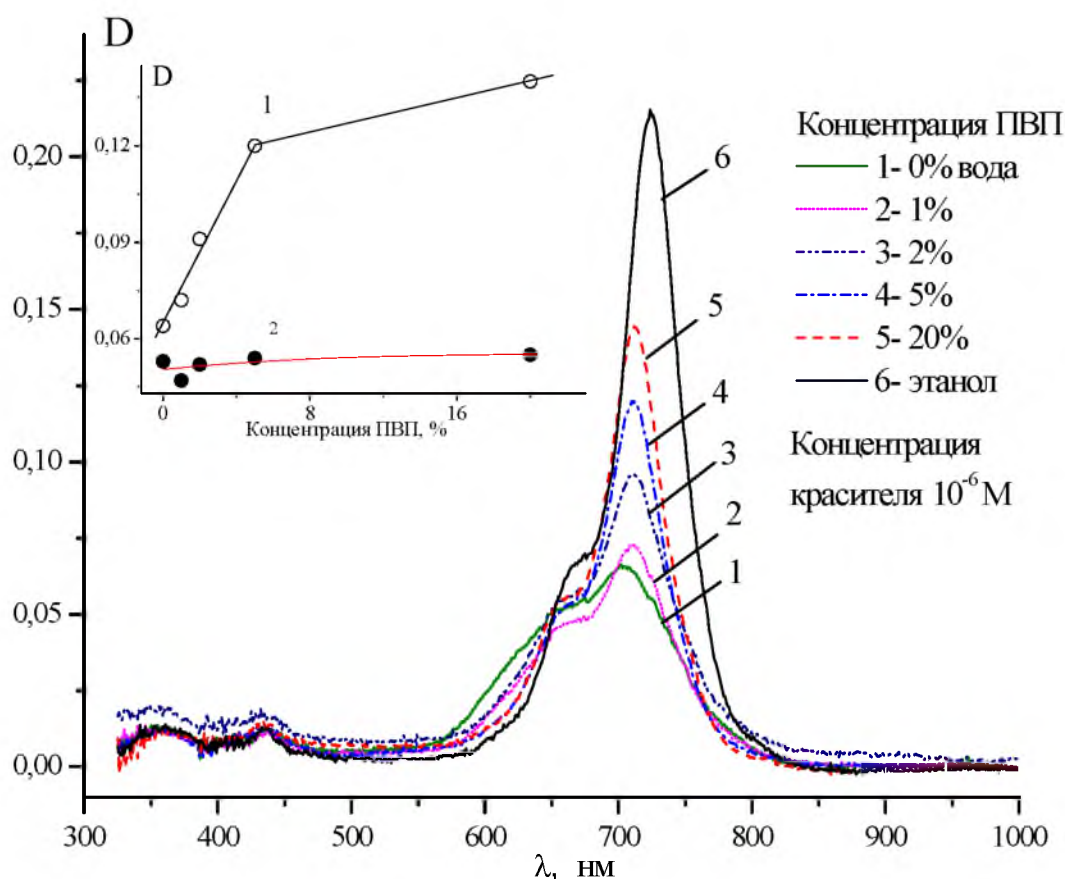
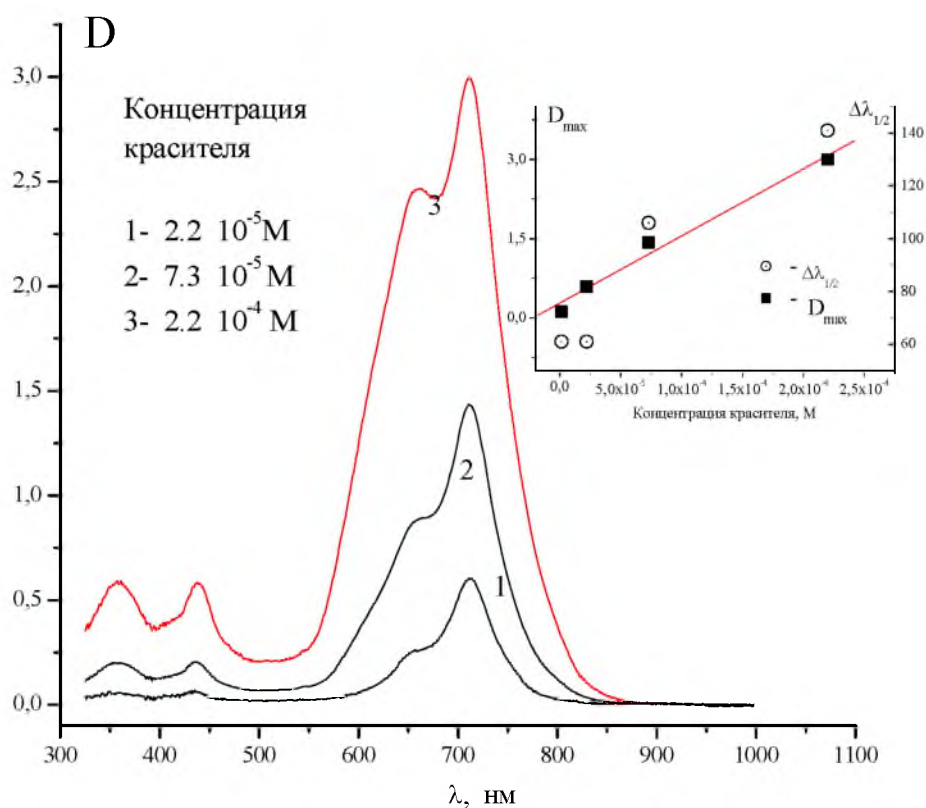


Рис. 2. Спектры поглощения индотрикарбацианинового красителя при различной концентрации ПВП в воде. На вставке зависимости оптической плотности на длине волны 712 нм (1) и 660 нм (2) от концентрации ПВП в растворе.

На основании того, что процессу связывания красителя с полимерной матрицей сопутствует изменение полярности микроокружения его молекул, и, тем самым, на абсорбционную способность красителя, показателем комплексообразования может служить зависимость положения максимума спектра поглощения от концентрации полимера в растворе.

В связи с тем, что рабочие концентрации ПВП, применяемые в клинической практике, не превышают 6%, исследованы процессы связывания при разной концентрации красителя. Оказалось, что изменение концентрации красителя на порядок практически не влияет на форму спектра (рис. 3.). При этом оптическая плотность в максимуме поглощения изменяется линейно, а полуширина возрастает при увеличении концентрации красителя в растворе с ПВП.

Максимум флуоресценции индотрикарбацианинового красителя при связывании с ПВП расположен в области 735 нм, и, в сравнении с этанолом, сдвинут на 10-15 нм в сторону меньших длин волн.



*Рис. 3.* Спектры поглощения в 6 % растворе поливинилпирролидона при различных концентрациях красителя. На вставке зависимость оптической плотности и полуширины спектров поглощения в 6 % растворе поливинилпирролидона от концентрации красителя. Измерения проведены в кюветах различной толщины. Спектры приведены к оптической толщине 1 см.

Расчеты квантового выхода ( $\phi$ ) флуоресценции индотрикарбоцианинового красителя в растворе с ПВП показывают, что, при возбуждении в длинноволновую полосу поглощения, значение  $\phi$  в 1,2 раза выше, чем в этаноле, а степень поляризации при этом возрастает до 37 %. Увеличение степени поляризации может быть связано как с ростом микровязкости вокруг молекул красителя, так и со снижением их подвижности вследствие сорбции на коллоидных частицах ПВП.

Таким образом, на основании приведенных результатов можно заключить, что структуры поливинилпирролидона в водной среде способны связывать молекулы полиметинового красителя, на основании чего можно высказать предположение о возможности создания сухого водорастворимого комплекса краситель-полимер.

Для этого связывание индотрикарбоцианинового красителя при высоких концентрациях 5 мг/мл с ПВП осуществляли в этаноле, в условиях, при которых процессы агрегации красителя отсутствуют. Затем, в этанольный раствор, содержащий заданное количество ПВП, вводили воду

для получения характерного для коллоидов ПВП раствора. Смещение максимума спектра поглощения на 670 нм свидетельствует о развитии процессов агрегации красителя в условиях его высокой концентрации в водно-спиртовом растворе. Характерное для мономеров красителя в составе ПВП положение максимума соответствует длине волны 740 нм. Наблюдаемые различия могут быть обусловлены особенностями сорбции красителя полимерными структурами, включая такие процессы как, образование сольватных оболочек красителя из молекул этанола в составе полимерной структуры, а также связывание агрегатов красителей полимерными структурами.

В результате лиофильной вакуумной сушки водно-спиртового раствора красителя и ПВП получено сухое вещество темно-зеленого цвета, со структурой, характерной для исходного полимера. Помещение комплекса Кр-ПВП в воду приводит к образованию раствора комплекса. Спектр поглощения водного раствора комплекса Кр-ПВП по форме аналогичный спектру исходного, до сушки. Поглощение комплекса при 670 нм, характерное для агрегатов, несколько преобладает над поглощением мономеров при 740 нм.

Важным условием применимости лекарственного препарата на практике является длительность хранения готового раствора. В этой связи обнаружено, что инкубирование раствора приводит к снижению оптической плотности, с сохранением формы спектра (рис. 4). За время хранения раствора 1 сутки поглощение снижается в 1,5 раза, что является очевидным следствием агрегации частиц. За время, характерное для работы с раствором около 1 часа, оптические характеристики меняются незначительно.

При добавлении в водный раствор комплекса (2 мг/мл) сывороточного альбумина (САБ) наблюдается существенное изменение спектра поглощения красителя. В присутствии белка спектр соответствует мономерным молекулам красителя с максимумом 735 нм. Увеличение коэффициента поглощения красителя указывает на процессы связывания его с белковой глобулой вследствие перераспределения между коллоидными частицами на белок.

Проведена оценка скорости перераспределения красителя в смешанном растворе комплекса Кр-ПВП и САБ (при условии избыточного количества белка). На основании анализа кинетики перераспределения показано, что половинное количество красителя, перераспредевшегося с полимерных структур на белковые глобулы, составляет время 30-40 мин. (рис.5)

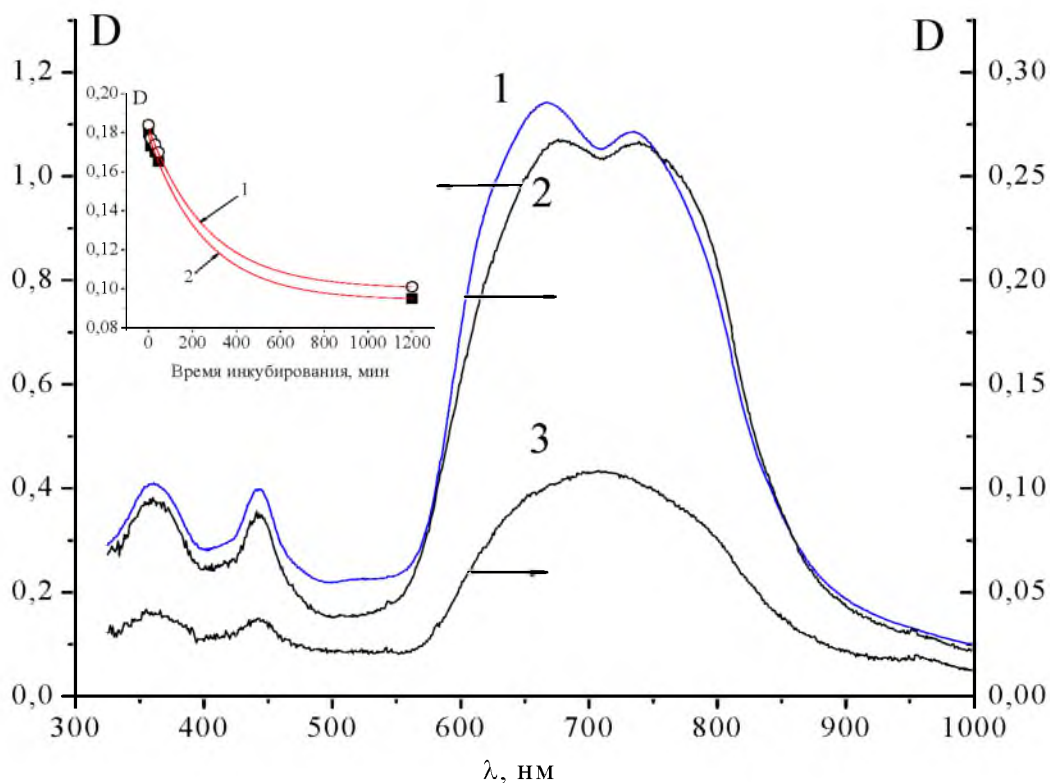


Рис. 4. Спектры поглощения индотрикарбоцианинового красителя в смешанном растворе ПВП-этанол-вода (1) (отношение молярных концентраций 1:2,5 (ПК:ПВП)), в растворе сухого комплекса Кр-ПВП в воде (2, 3), 3 - спектр, полученный при разведении образца 2 в 10 раз. На вставке. Зависимость поглощения комплекса Кр-ПВП от времени собственного инкубирования без перемешивания, 1, 2 - изменения на длине волны 680 нм и 750 нм, соответственно.

Спектры поглощения красителя связанного с кремофором и САЧ, ведут себя аналогично спектрам поглощения красителя с поливинилпирролидоном.

Исследовано влияние температуры на спектрально люминесцентные свойства индотрикарбоцианинового красителя в кремофоре. При рассмотрении спектров поглощения характерным является то, что с увеличением температуры растёт полуширина спектра поглощения и уменьшается оптическая плотность в максимуме спектра, причём, при охлаждении раствора, полуширина принимает исходное значение. В результате увеличения температуры уменьшается квантовый выход, причём, при охлаждении раствора, величина квантового выхода восстанавливается. Другими словами, это ещё раз подтверждает тот факт, что под воздействием температуры не происходит необратимых процессов с раствором, которые бы изменяли его спектральные характеристики.

В растворе с САЧ, при больших концентрациях красителя, наблюдается обратная зависимость, т.е. увеличение квантового выхода с увели-

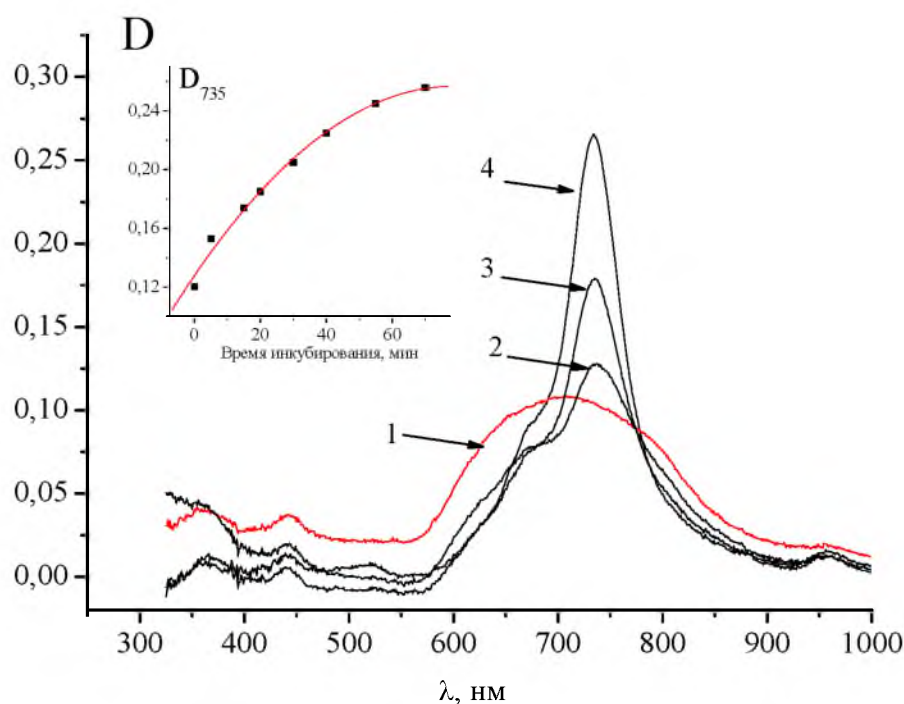


Рис. 5. Спектры поглощения раствора комплекса Кр-ПВП в воде в присутствии САБ, 1 - исходный раствор комплекса, 2, 3, 4 - инкубирование раствора комплекса в присутствии 2 мг/мл САБ 1, 15 и 70 мин, соответственно.

чением температуры. Главным образом квантовый выход возрастает при возбуждении в полосу 550 нм, которая вызвана наличием ассоциатов, при возбуждении флуоресценции в максимум поглощения 720 нм, изменение квантового выхода с увеличением температуры не столь значительно. Как видно из рисунка, при нагревании происходит уменьшение поглощения в спектральной области 680 – 590 нм с изобестической точкой на 683 нм и его увеличение в максимуме. При этом наблюдается рост интенсивности флуоресценции при возбуждении на 720 нм. Такие температурные закономерности свидетельствуют о том, что поглощение в спектральной области 665 нм обусловлено наличием двух центров, один из которых практически не флуоресцирует, т.е. нефлуоресцирующих ассоциатов молекул красителя. При повышении температуры ассоциаты разрушаются, вследствие чего увеличивается концентрация мономерных молекул. Вследствие того, что мономерные молекулы обладают достаточно высоким квантовым выходом флуоресценции и при повышении температуры увеличивается их концентрация, в результате наблюдается разгорание флуоресценции. Такой вывод подтверждается данными, полученными при сравнении спектров поглощения и возбуждения флуо-

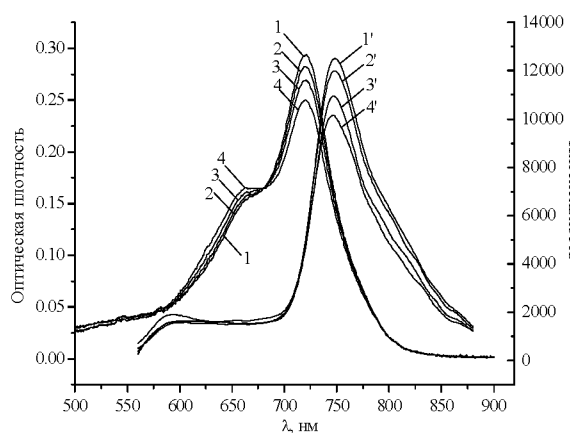


Рис. 6. Спектры поглощения (1,2,3,4) и флуоресценции при  $\lambda_{\text{возб}} = 550$  нм (1',2',3',4') водного раствора индотрикарбоцианинового красителя связанного с САЧ при температуре: 35 (1, 1'), 30 (2, 2'), 25 (3, 3'), 15 °С (4, 4').

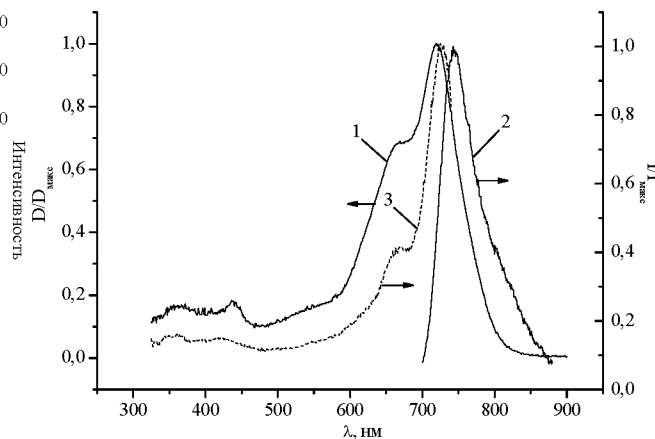


Рис. 7. Спектр поглощения (1), флуоресценции (2) и возбуждения флуоресценции (3) водного раствора индотрикарбоцианинового красителя связанного с САЧ

ресценции. Как видно из рис. 7, спектры возбуждения флуоресценции отличаются от спектров поглощения. Наибольшие отличия наблюдаются на коротковолновом крае спектра поглощения, именно в той спектральной области, где падает поглощение при нагревании. Такая согласован-

Спектрально-люминесцентные характеристики индотрикарбоцианинового красителя.

№	Раствор	$\lambda_{\text{max}}^{\text{ab}}$ нм	$\Delta\lambda^{\text{ab}}$ нм	$\varepsilon_{\text{max}} \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{f}}$ нм	$\varphi_f, \%$ (20°C)	$P, \%$ (20°C)	$\tau$ нс
1.	Кр+Этанол	724	50	3,0	750	13,4	24,9	0,9
2.	Кр+Вода	705	126	1,6	738	2	—	—
3.	Кр+Вода+ПВП	712	—	—	735	16,1	37,0	—
4.	Кр-ПВП + вода	670 740	—	—	740	—	37,0	—
6.	Кр+ДХБ	742	64	1,5	764	13,6	16,0	
7.	Кр+САЧ	731	63	—	744	25,0	40	2,1
8.	Кр+Кремофор	732	—	—	756	3,9	—	0,9

ность спектров поглощения, возбуждения флуоресценции и температурные изменения свидетельствуют о проявлении именно нефлуоресцирующих ассоциатов молекул на коротковолновом крае спектра поглощения.

Полученные данные о сравнительно высоких значениях степени поляризации и квантового выхода, и времени жизни свидетельствуют о том, что молекулы красителя в растворе сывороточного альбумина человека не контактируют с водой и неподвижны, т.е. локализованы в области с высокой вязкостью среды.

В экспериментах *in vivo* достаточно высококонцентрированные рас-

творы красителя с САЧ внутривенно вводили подопытным животным. На рис. 8 представлены данные по накоплению красителя в опухоли М-1 и мышечных тканях бедра крыс в зависимости от времени после введения. Накопление красителя в ткани регистрировалось по его изменению интенсивности флуоресценции *in vivo*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что максимальное содержание фотосенсибилизатора в опухоли М-1 наблюдается через 3–7 ч после введения красителя с САЧ и через 1,5–2 ч после введения без САЧ. Контрастность накопления ТК

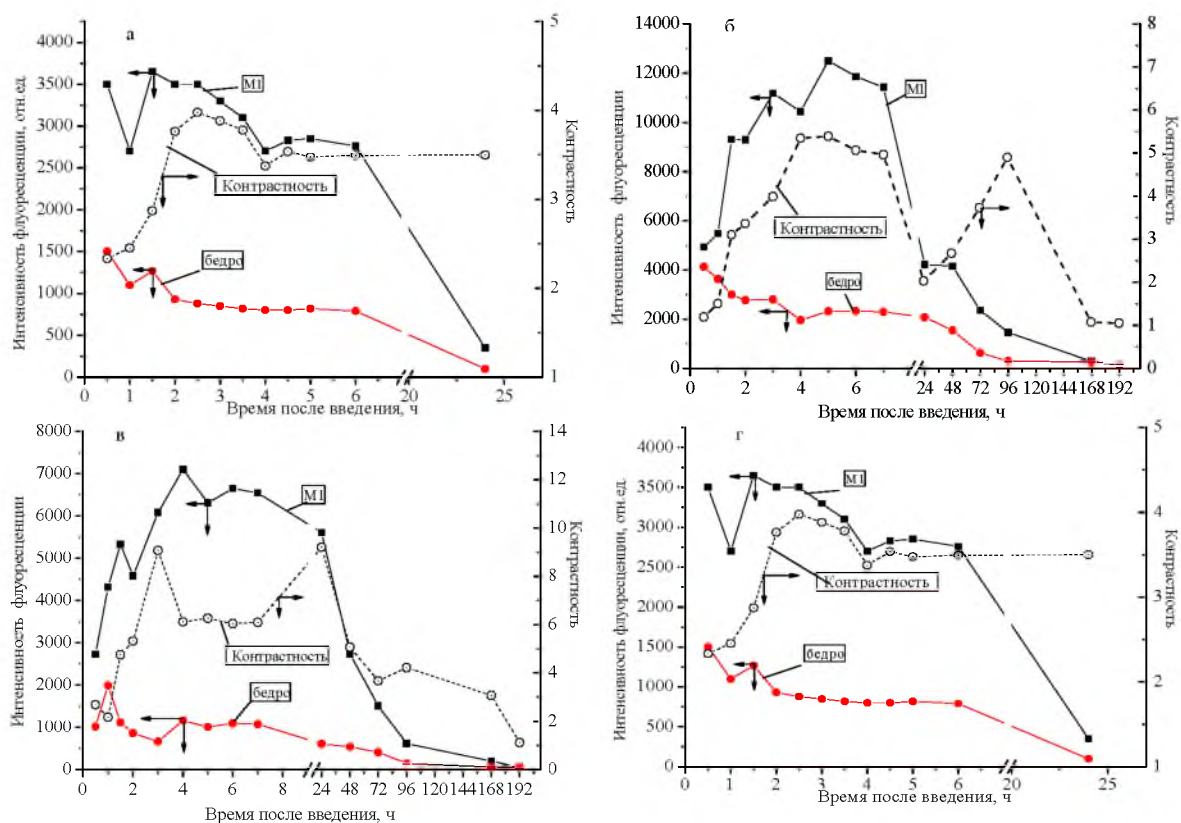


Рис. 8. Кинетика накопления красителя: с САЧ в опухоли М-1 и нормальных тканях бедра крыс после введения при концентрации 5 (а), 2,5 (б), 1,25 (в) мг/кг; с кремофором (г) при концентрации красителя 5 мг/кг.

(отношение интенсивности флуоресценции в опухоли к интенсивности флуоресценции в нормальных тканях бедра) составила 5–9 при введении красителя с САЧ и 3,5–4 без него, что представляет значительный интерес не только при использовании такого красителя для фотодинамической терапии, но и фотодинамической диагностики злокачественных новообразований. Для выяснения адекватности зарегистрированной кинетики интенсивности флуоресценции красителя изменению его концентрации проведены исследования при введении различной концентрации



1,25 мг/кг, 2,5 мг/кг и 5 мг/кг от их массы. После того, как краситель выводился из крови (примерно через час после введения) с поверхности опухолевых узлов и мышечной ткани животных регистрировались спектры флуоресценции красителя при различных концентрациях. В результате установлено, что при изменении концентрации красителя в пределах от 1,25 мг/кг до 5 мг/кг интенсивность флуоресценции пропорциональна введенной концентрации красителя и спектры флуоресценции практически не различаются.

Таким образом, на основании анализа полученных данных было установлено, что структуры поливинилпирролидона, кремофора и САЧ в водной среде способны связывать молекулы полиметинового красителя. Показано, что молекулы исследованного соединения связываются с макромолекулами САЧ как отдельные молекулы красителя, так и в ассоциированном состоянии. Установлено, что введение подопытным животным красителя с САЧ приводит к значительному повышению контрастности накопления фотосенсибилизатора в опухолевой ткани. *In vivo* показано, что в диапазоне концентраций от 1,25 мг/кг до 5 мг/кг интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации красителя.

1. Вороний Е.С., Самцов М.П., Каплевский К.Н. и др. // Вестник БГУ. Разд. 1: Физ., Мат. и Информ. 2000. №2. С. 28-30.
2. Вороний Е.С., Самцов М.П., Чалов В.Н., Жаврид Е. А. // ЖПС. 2001. Т.68. С. 359 – 362.
3. Вороний Е.С., Самцов М.П., Каплевский К.Н., Луговский А.А. // ЖПС. 2004. Т.71. С. 168 – 172.
4. Вороний Е.С., Самцов М.П., Каплевский К.Н. и др. // Известия РАН. Серия физическая. 2007. Т. 71. С. 145–149.