

СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ТРИКАРБОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В РАСТВОРАХ

Т. И. Ермилова, Д. С. Тарасов

ВВЕДЕНИЕ

Фотосенсибилизацией называется явление повышения чувствительности биологических объектов к действию света при накоплении в них определенных веществ – фотосенсибилизаторов (далее ФС). На этом эффекте основан метод фотодинамической терапии (ФДТ), которая является одним из способов лечения онкологических заболеваний. Успех метода во многом определяют свойства ФС [1], которые должны удовлетворять ряду требований [2]. Перспективным для создания ФС может быть ряд соединений на основе трикарбоцианиновых красителей (далее ТЦК) [3-5]. Однако большинство ТЦК нерастворимы в воде, что является существенной проблемой при введении препарата пациенту.

Ряд водорастворимых соединений на основе ТЦК был синтезирован в НИИ ПФП им. А.Н. Севченко.

Цель данной работы – сравнительный анализ влияния растворителей различной природы и температуры на спектро-физические свойства нового водорастворимого ТЦК и проверка стабильности соединения при нагревании. Полученные результаты предполагается использовать для разработки методики внутривенного введения ФС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является симметричный ТЦК, ковалентно связанный с полиэтиленгликолем (далее ТЦК 212-4, согласно присвоенному лабораторному шифру). Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре SM 2203 (SOLAR, Беларусь) в средах: этанол, дистиллированная вода, 5, 10 и 40% растворы глюкозы для инфузий (Фармлэнд, Беларусь-Голландия). При измерениях в растворах для инфузий маточный раствор готовили в растворе 5% глюкозы ($6.38 \cdot 10^{-4}$ М), в водном растворе – в дистиллированной воде ($1.40 \cdot 10^{-3}$ М). Регистрация спектров осуществлялась при температурах 20, 25, 30, 37 и 42°C, длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции равны 630 нм и 800 нм соответственно.

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТЦК 212-4

Спектр поглощения ТЦК 212-4 в этаноле содержит интенсивную полосу с максимумом $\lambda=724$ нм и плечом на коротковолновом крае спектра. При нагревании от 20 до 42°C коэффициент молярного поглощения ϵ в максимуме снижается на 9% от исходного значения $2.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, в области плеча спектры не меняются. Максимум спектра флуоресценции приходится на 751 нм, полуширина 51 нм при 20°C. При нагревании происходит уширение спектров поглощения и флуоресценции.

В дистиллированной воде ϵ на длине волны максимума $\lambda=710$ равен $7.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 20°C (рис. 1а). Форма спектров поглощения и возбуждения флуоресценции не совпадают, что свидетельствует о присутствии нефлуоресцирующей компоненты, предположительно димеров. При нагревании наблюдается падение ϵ во всей длинноволновой полосе, изменение составляет 25% от исходного значения и является необратимым (рис. 1б). Спектры поглощения при этом сужаются, вероятно, вследствие диссоциации димеров. Максимум спектра флуоресценции приходится на $\lambda=737$ нм, полуширина 59 нм при 20°C и возрастает при нагревании.

В 5% растворе глюкозы (рис. 1в) максимум спектра поглощения приходится на $\lambda=711$ нм, полуширина 59 нм при 20°C. Форма спектров поглощения и возбуждения флуоресценции не совпадают, что свидетельствует об ассоциации красителя. Коэффициент ϵ в максимуме равен $9.1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и уменьшается при нагревании на 9%, спектры при этом сужаются (рис. 1г). Стоксов сдвиг спектра флуоресценции составляет 28 нм, полуширина равна 59 нм при 20°C и возрастает с температурой.

В 10% растворе глюкозы форма и положение спектров поглощения и флуоресценции не меняются по сравнению с 5% раствором, имеет место несовпадение формы спектров поглощения и возбуждения флуоресценции. Коэффициент ϵ равен $10.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 20°C; при нагревании наблюдается его падение на 15% от исходного значения. В 40% растворе глюкозы спектры поглощения и флуоресценции батохромно смещены на 4 нм по отношению к спектрам в дистиллированной воде. Данный сдвиг, вероятно, обусловлен уменьшением значения диэлектрической проницаемости среды вследствие влияния неполярных молекул глюкозы. При 20°C $\epsilon = 7.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ на длине волны максимума $\lambda=710$ нм и уменьшается на 15% от первоначального значения при нагревании.

С увеличением температуры в 10 и 40% растворах глюкозы наблюдается сужение спектров поглощения и уширение спектров флуоресценции.

В ходе исследования стабильности ТЦК 212-4 при нагревании в диапазоне температур 20–39°C оптическая плотность в максимуме меняется в пределах 3.7% от максимального значения.

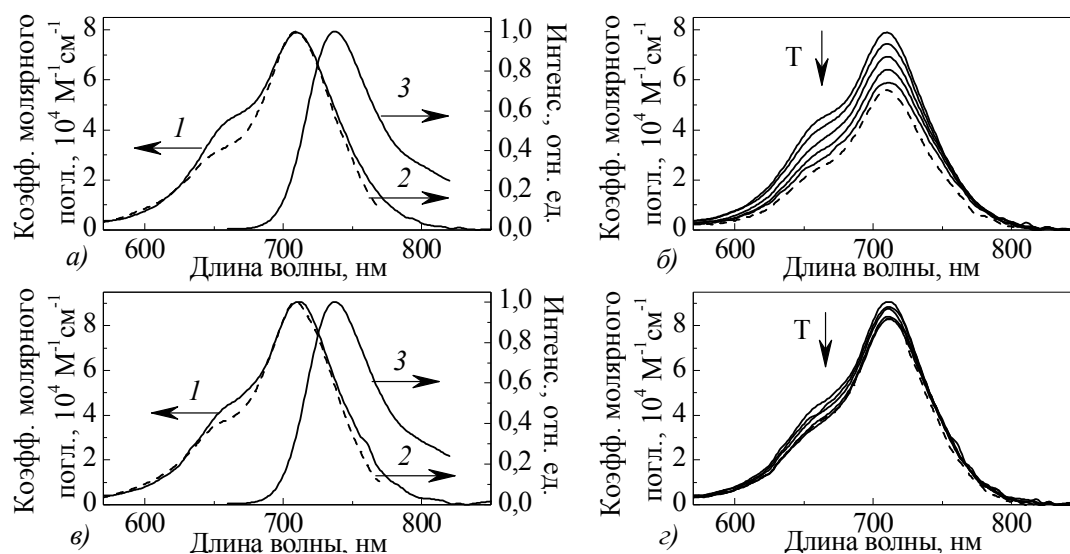


Рис. 1. Спектры ТЦК 212-4: в дистиллированной воде (а, б; $2.32 \cdot 10^{-6}$ М) и 5% растворе глюкозы (в, г; $1.74 \cdot 10^{-6}$ М): а, в) спектры поглощения (1), возбуждения флуоресценции (2) и флуоресценции (3) в дистиллированной воде при 20°C; б, г) спектры поглощения при нагревании от 20 до 42°C, штрих. линия – при охлаждении от 42 до 20°C

Вклад плеча в спектр уменьшается с температурой. Наблюдаемые изменения являются обратимыми в исследованном температурном диапазоне при данной концентрации, что свидетельствует о химической стабильности красителя.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Как можно видеть на рис. 2, увеличение полярности растворителя ведет к гипсохромному смещению спектров. Коэффициент ϵ снижается при переходе от этанола к водному раствору и растворам глюкозы, вклад плеча в спектр поглощения возрастает. Данные изменения могут быть вызваны ассоциацией красителя. Форма спектров флуоресценции в дистиллированной воде и растворах глюкозы полностью совпадает.

В процессе проведения эксперимента установлено, что наличие глюкозы не влияет на растворимость в диапазоне концентраций от $6.38 \cdot 10^{-4}$ М до $1.40 \cdot 10^{-3}$ М и практически не влияет на форму спектров при концентрации порядка $6 \cdot 10^{-4}$ М. При повышении содержания глюкозы в растворе коэффициент ϵ повышается в максимуме, интенсивность флуоресценции возрастает. При высоком содержании глюкозы в растворе возможно уменьшение диэлектрической проницаемости среды, вызывающее bathochromный сдвиг спектров. При повышении температуры наибольшее падение ϵ (25% от исходного значения) обнаружено в дистиллированной воде (концентрация $2.32 \cdot 10^{-6}$ М), наименьшее (9% от исходного значения) – в растворе 5% глюкозы (концентрация $1.74 \cdot 10^{-6}$ М).

Повышение температуры приводит к снижению ϵ и сужению спектров поглощения. При повышении температуры интенсивность флуоресценции уменьшается, полуширина спектров возбуждения флуоресценции и флуоресценции возрастает.

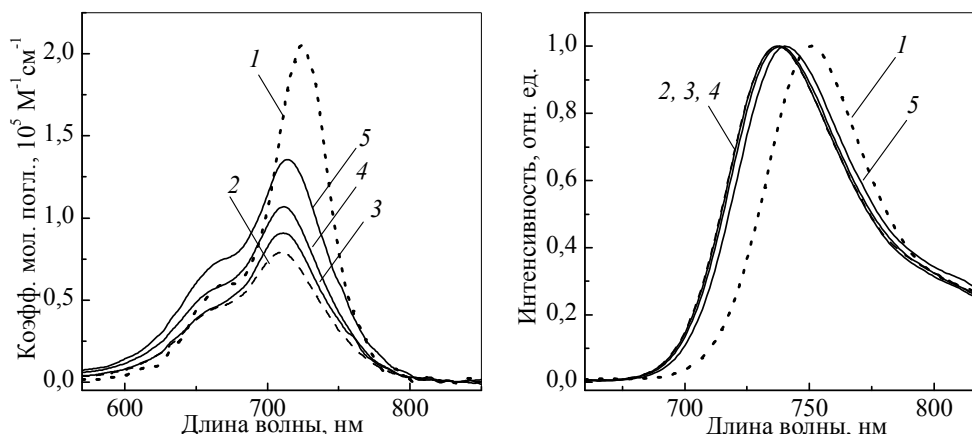


Рис. 2. Сравнение спектров в различных растворителях: спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) ТЦК 212-4 в этаноле (1; $6.53 \cdot 10^{-7}$ М), дистиллированной воде (2; $2.32 \cdot 10^{-6}$ М), 5, 10 и 40% растворах глюкозы (3, 4 и 5 соответственно; $1.74 \cdot 10^{-6}$ М)

ВЫВОДЫ

Установлено, что ТЦК 212-4 присутствует в воде и растворах глюкозы в виде смеси мономеров и ассоциированных форм. Наличие глюкозы в растворе не влияет на растворимость и не оказывает существенного влияния на форму спектров. ТЦК 212-4 химически стабилен в диапазоне температур 20–39°C при концентрации порядка $5 \cdot 10^{-6}$ М.

Литература

1. Huang Z., Xu H., Meyers A. D. et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges // Technol. Cancer Res. Treat. 2008. Vol. 4. № 7. P. 309–320.
2. Wilson B. C., Patterson M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy // Phys. Med. Biol. 2008. Vol. 53. P. R61–R109.
3. Voropay E. S., Samtsov M. P., Lugovsky A. P. et al. Photodynamic laser therapy in the transparency region of biotissues using tricarbo-cyanine dyes as photosensitizers // Proc. SPIE. 2002. Vol. 4749. P. 221–227.
4. Zhang E., Zhang Ch., Su Y. et al. Newly developed strategies for multifunctional mitochondria-targeted agents in cancer therapy // Drug Discovery Today. 2011. Vol. 16. № 3/4. P. 140–146.
5. Wainwright M. Photosensitisers in biomedicine // Liverpool, UK. John Wiley & Sons Ltd., 2011.