

Управление образования администрации Нижегородского района
МБУ ДО ДДТ Нижегородского района
Детско-юношеский экологический клуб «Зеленый парус»

**Исследование фотофизических свойств новых
потенциальных агентов для фотодинамической
терапии на основе порфиразинов**

Работу выполнил:

Сургучев Артём Сергеевич,
ученик 11 класса школы №24

Научная руководительница:

Шестакова Лидия Николаевна,
аспирант ННГУ имени Н. И. Лобачевского

Нижний Новгород

2023

Содержание

Введение.....	3
Глава I. Фотодинамическая терапия	5
1.1 Сферы применения ФДТ.....	5
1.2. Фотодинамический эффект.....	5
1.3. Этапы ФДТ	6
Глава II. Исследование потенциальных агентов для ФДТ	8
2.1. Приготовление растворов	8
2.2. Определение спектров поглощения и флуоресценции	9
2.3. Обработка полученных данных.....	10
Заключение	14
Глоссарий.....	15
Литература	16

Введение

Актуальность:

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод лечения заболеваний, заключающийся в введении красителя-фотосенсибилизатора (ФС), его избирательном накоплении в патологически изменённых тканях и световом воздействии на них определённой длины волны. ФДТ применяется во многих сферах медицины, особенно широко в онкологии. Впервые фотодинамический эффект был описан О. Раабом в лаборатории Г. фон Таппейнера в 1900 году. Первое успешное фотодинамическое лечение онкологического заболевания было проведено Г. фон Таппейнером вместе с А. Джезиоником уже в 1903 году. На данный момент существует 3 поколения фотосенсибилизаторов, продолжают поиски ФС с меньшим временем выведения из организма, большей избирательностью накопления, дешёвой производством. Кроме того, в последнее время разрабатываются методы персонализации терапии, в частности на основе использования агентов со свойствами молекулярных роторов.

Молекулярные роторы – это соединения, молекулы которых состоят из нескольких фрагментов (ротора и статора), способных к вращению друг относительно друга. Для данной группы соединений характерна зависимость флуоресцентных свойств от вязкости окружающей среды. Процесс фотоиндуцированной гибели клеток сопровождается локальным увеличением внутриклеточной вязкости [2]. Потенциально фотосенсибилизаторы со свойствами молекулярных роторов могут быть использованы как флуоресцентные вязкостные сенсоры для оценки эффективности проведённой ФДТ.

Проблема: в настоящий момент остаются нерешёнными задачи персонализации ФДТ, а также не обнаружен фотосенсибилизатор, который соответствовал бы всем требованиям, предъявляемым к “идеальному” фотосенсибилизатору.

Цель исследования: анализ фотофизических свойств тетра(бифенил)тетра(циано)порфиразина и его железоккомплекса.

Объект исследования: Тетра(бифенил)тетра(циано)порфиразин и его железоккомплекс.

Предмет исследования: Фотофизические свойства потенциальных агентов для фотодинамической терапии.

Задачи:

- 1) Получить спектры поглощения и флуоресценции тетра(бифенил)тетра(циано)порфиразина и его железоккомплекса в различных средах;
- 2) Провести анализ полученных спектров, определить максимумы поглощения и флуоресценции исследуемых соединений;
- 3) Провести оценку принадлежности исследуемых соединений к классу флуоресцентных молекулярных роторов.

Методы исследования:

- 1) Спектрофотометрия для получения спектров поглощения исследуемого соединения;
- 2) Спектрофлуориметрия для получения спектров флуоресценции исследуемого соединения;
- 3) Программная обработка полученных результатов в программах Excel и GraphPad Prism.

Значимость работы: В результате проведённого исследования нами получены данные о фотофизических свойствах новых соединений порфиразиновой природы. Установлена их принадлежность к классу молекулярных роторов, что предположительно позволит использовать данные соединения в качестве агентов для персонализированной фотодинамической терапии.

Глава I. Фотодинамическая терапия

1.1 Сферы применения ФДТ.

В онкологии фотодинамическая терапия применяется для лечения рака кожи, головного мозга, полых внутренних органов и органов малого таза [6, с. 16]. Противопоказаниями к данному методу являются проблемы с функционированием печени или почек, так как их дисфункция затрудняет метаболизм и выведение из организма фотосенсибилизатора и продуктов фотодинамических реакций.

Фотосенсибилизатор – вещество, вызывающее у биологических тканей повышенную чувствительность к свету. Важнейшими свойствами фотосенсибилизатора для ФДТ являются отсутствие темновой токсичности, высокое поглощение красного света, большой квантовый выход синглетного кислорода, селективное накопление опухолями и быстрое выведение из организма после операции. Оценить способность фотосенсибилизатора поглощать световое излучение можно с помощью величины оптической плотности (D) – десятичного логарифма отношения потока излучения, падающего на ФС, к потоку излучения, прошедшего через него.

1.2. Фотодинамический эффект

Фотодинамический эффект, или фотосенсибилизация, – действие света на клетки в присутствии фотосенсибилизатора и кислорода. Поглощая квант света, ФС переходит в короткоживущее (10^{-9} – 10^{-8} с) возбуждённое состояние. Затем он может безызлучательно перейти в более долгоживущее (10^{-4} – 10^{-2} с) триплетное состояние, передать энергию молекуле кислорода или вернуться в основное состояние, излучив квант флуоресценции.

Триплетный фотосенсибилизатор вступает в окислительно-восстановительные реакции с переносом электронов или протонов и образованием радикалов, которые затем взаимодействуют с кислородом

(реакции I типа). При передаче же энергии молекуле кислорода образуется его высокоактивная синглетная форма, окисляющая все основные компоненты клеток (реакции II типа). Фотодинамические реакции I типа легче протекают в цитозоле, а II типа – в липидной фазе биомембран. Несмотря на то что реакции II типа доминируют в повреждающем действии большинства ФС, к клеточной смерти приводит совокупность реакций обоих типов. [6, с. 6-11].

Излучение кванта света возбуждённым фотосенсибилизатором также используется в медицине, а именно во флуоресцентной диагностике. При этом из-за Стоксова сдвига – разницы между пиками длин волн спектра флуоресценции и спектра поглощения – флуоресценция происходит с большей длиной волны. Флуоресцентные свойства фотосенсибилизатора количественно оцениваются с помощью интенсивности флуоресценции и её квантового выхода. Интенсивность флуоресценции (F) – величина, пропорциональная количеству фотонов, которые достигают детектора в течение единицы времени. Квантовый выход флуоресценции (ϕ) – отношение количества испущенных фотонов к количеству поглощённых.

Вернувшись в стабильное состояние, молекула фотосенсибилизатора может поглотить новый квант света, и весь цикл будет запущен заново. После нескольких циклов поглощения ФС может деградировать и потерять способность запускать фотодинамическую реакцию. Этот эффект называется фотобликинг (фотовыгорание)[5]

1.3. Этапы ФДТ

1. Введение пациенту раствора фотосенсибилизатора (внутривенно или локально в виде аппликаций). Гидрофильные ФС локализуются преимущественно в кровеносных сосудах, а гидрофобные – в опухолевой ткани. Через определённое время устанавливаются контрастирующие концентрации фотосенсибилизатора в опухоли и окружающих тканях.

2. Доставка света к опухоли и её облучение. В качестве источника света обычно используется лазер, излучающий красный или ближний инфракрасный свет в области 600-800 нм. В этой спектральной области, называемой “терапевтическим окном прозрачности”, собственное поглощение тканей минимально и свет проникает глубже. Инфракрасное излучение с длиной волны больше 800 нм, несмотря на хорошее проникновение в биоткани, оказывается неэффективным из-за неспособности низкоэнергетических фотонов генерировать синглетный кислород. Глубина проникновения света не превышает 1 см, поэтому наиболее эффективно повреждаются небольшие и плоские опухоли. Однако возможно послойное разрушение более крупных опухолей и вставка в опухолевую ткань нескольких световодов, доставляющих излучение на большую глубину.

3. Поглощение света, развитие цитотоксических каскадов, смерть клеток. Высвобождаются продукты распада, стимулирующие как гибель соседних клеток, так и фагоцитоз клеточных обломков соседними клетками и лейкоцитами крови. Происходит заживление раны. Фотосенсибилизатор выводится из организма до нескольких месяцев. [6, с.11-14]

Глава II. Исследование потенциальных агентов для ФДТ

Практическую часть нашей работы можно разделить на несколько этапов: приготовление растворов исследуемых веществ, определение их спектров поглощения и флуоресценции, обработка полученных данных.

2.1. Приготовление растворов

Мы исследовали два вещества: тетра(бифенил)тетра(циано)порфиразин (pzViPh) и его железокомплекс (FerzViPh) (Рис. 1). Соединения синтезированы в ИМХ РАН, г. Нижний Новгород, под руководством Клапшиной Л.Г.

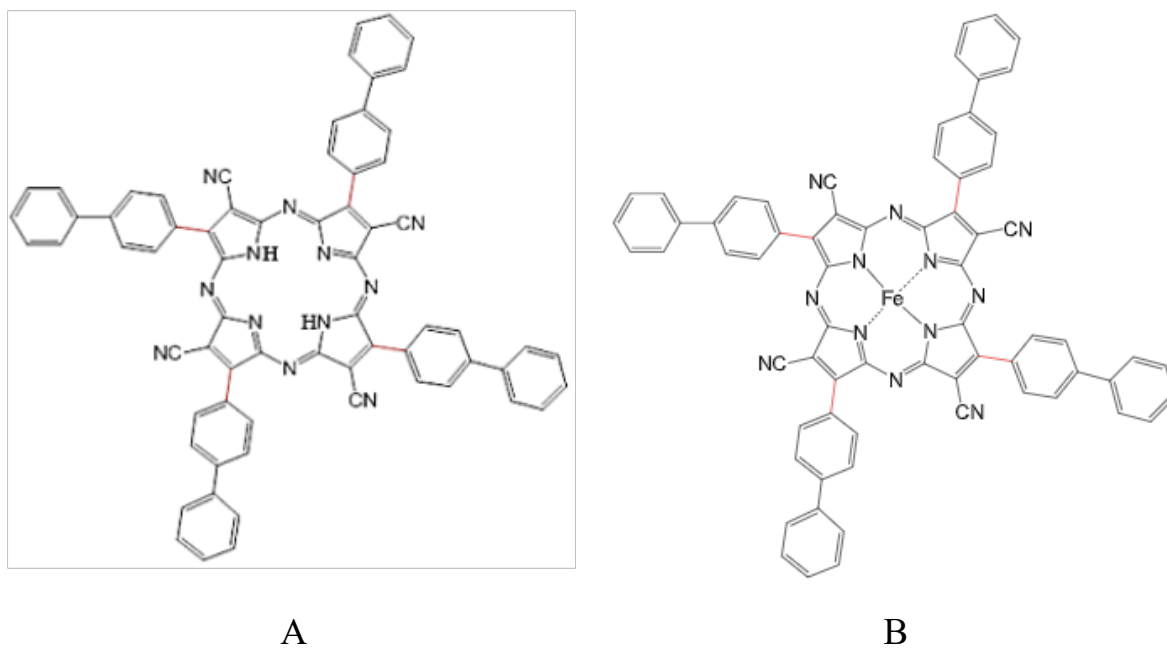


Рис. 1. Структурные формулы А)pzViPh и В)FerzViPh

В ходе экспериментов мы использовали растворы данных соединений в концентрации 5 мкМ. В качестве растворителей использовали: сверхчистую воду (H₂O) (система очистки воды Simplicity, Millipore, Германия), химически чистый этанол (96%), глицерин, 25-50-75% смеси глицерина и этанола, культуральную среду DMEM (“ПанЭко”, Россия) с 10% содержанием эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, Fetal Bovine Serum).

Для приготовления спирто-глицериновых растворов пользовались следующим протоколом: в пробирку-фалькон объёмом 15 мл (Corning® CentriStar™, США) механическим дозатором на 1000 мкл (все дозаторы от “Brand”, Германия) набирали от 1 до 3 мл глицерина, к которому затем добавляли от 3 до 1 мл спирта соответственно. После чего данные смеси перемешивали до однородного состояния на специальном оборудовании Microspin FV-2400 (“Biosan”, Латвия).

Исходная концентрация соединений составляла 10^{-3} М, для проведения экспериментов использовали концентрацию 5 мкМ. Растворы с исследуемыми веществами готовили схожим образом: в пробирку-эппендорф объёмом 2000 мкл (“Greiner Bio-One”, Германия) механическим дозатором на 1000 мкл набирали 995 мкл растворителя, затем другим механическим дозатором на 20 мкл в растворитель добавляли 5 мкл pzViPh или FerzViPh. Полученные растворы доводили до однородного состояния на том же оборудовании, что и спирто-глицериновые растворы.

2.2. Определение спектров поглощения и флуоресценции

Для определения спектров поглощения и флуоресценции использовали 96-луночный планшет (Corning®, США; “Eppendorf”, Германия), в который с помощью механического дозатора на 200 мкл вносили каждый раствор в три лунки, по 200 мкл. Также на планшете были отдельные лунки с растворителями без исследуемых веществ (“бланки”) для дальнейшей обработки данных.

Когда же на планшет были нанесены все растворы и “бланки”, он вводился в планшетный спектрофотометр-спектрофлуориметр Synergy Mx (“BioTek”, США). Настройки съёмки для эксперимента проводились в специальном программном обеспечении Gen5. В первом эксперименте – с H₂O, DMEM, DMEM+10%FBS и 96%-спиртом – получали спектр поглощения в диапазоне от 300 до 800 нм и флуоресценции в диапазоне от 600 до 800 нм.

Во втором эксперименте проводили съёмку спектров поглощения и флуоресценции в серии спирто-глицериновых растворов для изучения зависимости фотофизических свойств от вязкости среды. По предварительным результатам первого эксперимента диапазон длин волн поглощения был изменён на 300-700 нм, а считываемый диапазон длин волн флуоресценции расширен до 570-800 нм. Флуоресценцию возбуждали на 20 нм левее начала оси, то есть в первом эксперименте – на 580 нм, во втором – на 550 нм. Все измерения проводились с шагом в 2 нм – компромисс между детальностью получаемых данных и их достоверностью: при более частом шаге предполагается фотовыгорание исследуемого вещества.

2.3. Обработка полученных данных

Для обработки мы переносили полученные результаты в таблицу Excel. Там рассчитывали средние арифметические значения по каждому трём лункам. Затем из среднего арифметического в каждом растворе вычитали среднее арифметическое по соответствующему “бланку”. По конечным значениям в программе GraphPad Prism строили спектры поглощения и флуоресценции. Важно отметить, что при построении спектров флуоресценции “бланк” не вычитался, так как использованные растворители не демонстрируют флуоресцентных свойств, при этом поглощение у них присутствует.

Результаты первого эксперимента представлены на рис. 2-3. Хорошо видно, что исследуемые соединения имеют два пика поглощения в коротковолновой (300-400 нм) и более длинноволновой (550-650 нм) областях спектров. Максимумы поглощения сдвигаются в зависимости от используемого растворителя, для pzViPh максимумы поглощения от 550 до 630 нм, для FerzViPh 560-640 нм. При этом максимум флуоресценции для обоих соединений наблюдается на длине волны 650 нм, интенсивность флуоресценции возрастает в среде DMEM с 10% содержанием FBS. Мы предположили, что это связано с большей вязкостью данного растворителя

по отношению к двум другим. Также следует отметить значительную разницу в оптической плотности и интенсивности флуоресценции для pzViPh и FerzViPh. Для FerzViPh оптическая плотность и интенсивность флуоресценции ниже, чем для pzViPh. Порфиразиновые свободные основания и их железокомплексы поглощают и флуоресцируют в диапазоне оптического окна прозрачности биологических тканей (580-700 нм), что позволяет рассматривать их в качестве фотосенсибилизаторов для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

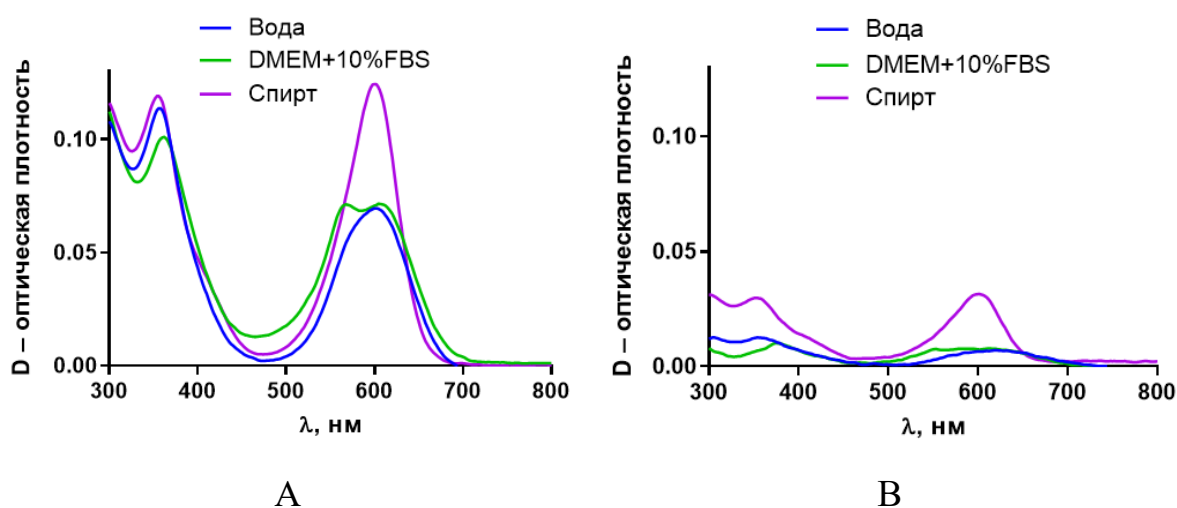


Рис. 2. Спектры поглощения А)pzViPh и В)FerzViPh

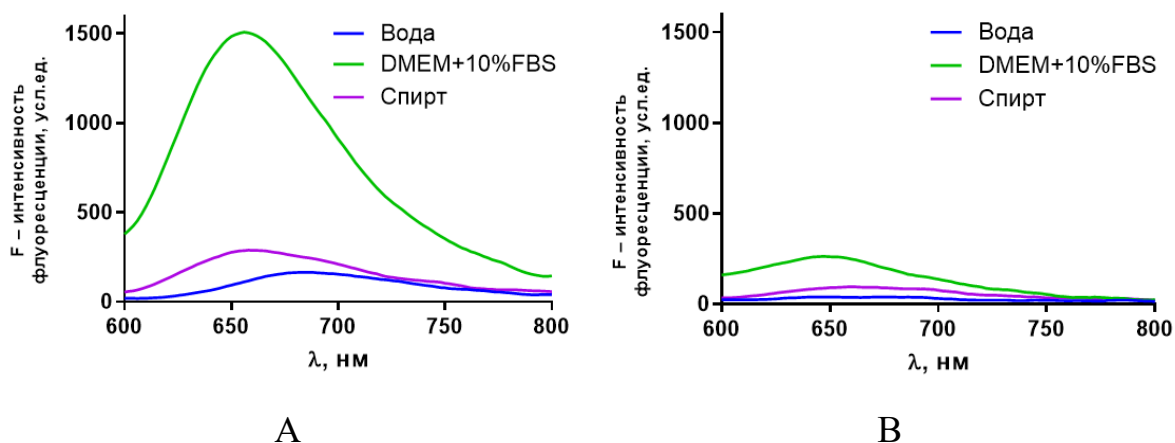


Рис. 3. Спектры флуоресценции А)pzViPh и В)FerzViPh

Результаты второго эксперимента представлены на рис. 4. Хорошо видна зависимость интенсивности флуоресценции от вязкости среды. При повышении процентного содержания глицерина (повышении вязкости) интенсивность флуоресценции значительно возрастает для обоих исследуемых соединений, что может свидетельствовать о принадлежности соединений к классу молекулярных роторов. Для FerzBiPh интенсивность флуоресценции ниже, чем для pzBiPh.

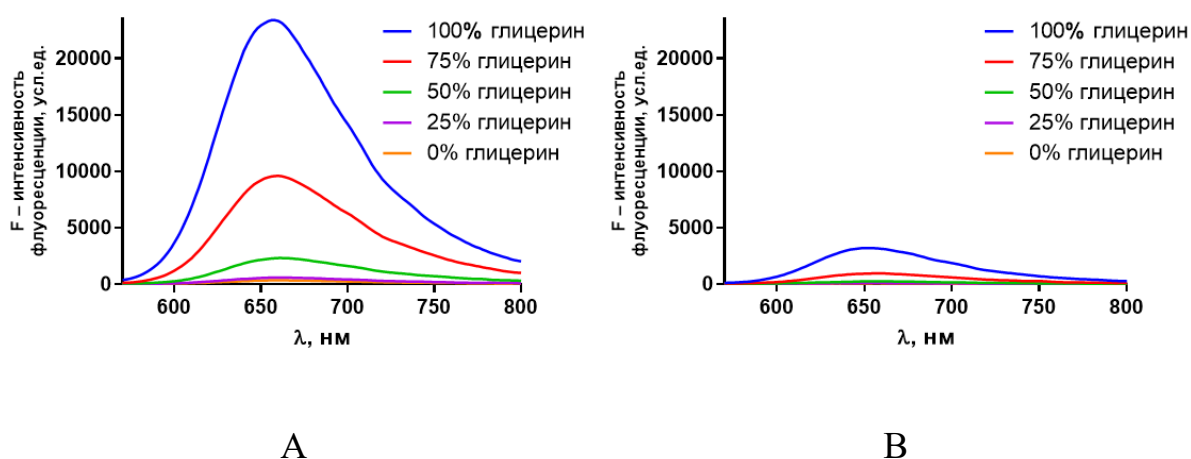


Рис. 4. Спектры флуоресценции А) pzBiPh и В) FerzBiPh

Для подтверждения принадлежности соединений к классу молекулярных роторов нами были построены прямые зависимости квантового выхода флуоресценции от вязкости среды. Для определения квантового выхода флуоресценции исследуемых соединений использовали формулу:

$$\varphi_1 = \frac{\varphi_2 F_1 D_2}{F_2 D_1},$$

где φ_1 — квантовый выход исследуемого красителя, F_1 и D_1 интенсивность флуоресценции и оптическая плотность исследуемого красителя соответственно, φ_2 — квантовый выход контрольного вещества, F_2 и D_2 интенсивность флуоресценции и оптическая плотность контрольного вещества соответственно. В качестве контрольного вещества использовали

Родамин В в этаноле

($\phi = 0.7$, <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/009.html>).

Значения вязкости спирто-глицериновых растворителей были выведены с помощью калибровочной кривой, полученной в научном коллективе. Полученные прямые представлены на рис. 5. Исходя из рассчитанных уравнений прямых нами были установлены коэффициенты α для pzViPh и FerzViPh. Они составили 0.63 и 0.53 соответственно. Из литературных данных нам известно, что для молекулярных роторов коэффициент α уравнения прямой равен, по разным источникам 0.5-0.75 [1][3] или 0.37-0.67 [4]. Таким образом, мы можем говорить о том, что оба исследуемых вещества являются молекулярными роторами.

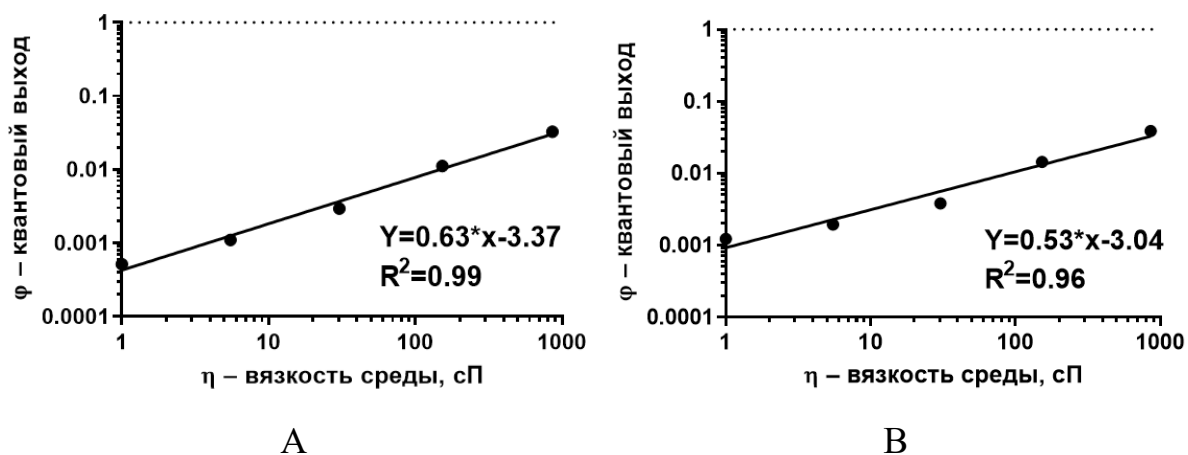


Рис. 5. Зависимость квантового выхода флуоресценции от вязкости среды: А) pzViPh и В) FerzViPh

R^2 – коэффициент детерминации, принимает значения от 0 до 1. Чем ближе значение коэффициента к 1, тем сильнее зависимость. При оценке регрессионных моделей это интерпретируется как соответствие модели данным. Коэффициенты детерминации, равные 0.99 и 0.96, говорят, что полученные прямые, хорошо соответствуют исходным точкам.

Заключение

В ходе проведённого исследования нами установлено, что тетра(бифенил)тетра(циано)порфиразин и его железокомплекс поглощают и флуоресцируют в рамках биологического окна прозрачности; фотофизические свойства pzBiPh выражены сильнее, чем у FerzBiPh ; наблюдается зависимость фотофизических свойств от природы растворителя, в частности, при повышении вязкости среды интенсивность флуоресценции значительно возрастает для обоих соединений. Продемонстрирована принадлежность обоих исследуемых соединений к классу молекулярных роторов. Мы предполагаем, что полученные данные позволят в дальнейшем использовать исследуемые соединения в качестве агентов для персонализированной ФДТ. Планы по продолжению работы: исследование фотовыгорания и квантового выхода синглетного кислорода.

Глоссарий

Квантовый выход флуоресценции – отношение количества испущенных фотонов к количеству поглощённых.

Молекулярный ротор – соединение, молекула которого состоит из нескольких фрагментов (ротора и статора), способных к вращению друг относительно друга.

Оптическая плотность – десятичный логарифм отношения потока излучения, падающего на объект, к потоку излучения, прошедшего через него.

Стоксов сдвиг – разница между пиками длин волн спектра флуоресценции и спектра поглощения. Максимум флуоресценции находится в более длинноволновой области.

Флуоресценция – свечение, возникающее под действием возбуждающего излучения в оптическом или ультрафиолетовом диапазоне длин волн, время жизни возбуждённого состояния 10^{-9} – 10^{-6} с.

Фотовыгорание (фотобликинг) – утрата фотосенсибилизатором возможности к запуску фотодинамической реакции.

Фотодинамическая терапия – метод лечения заболеваний, заключающийся в введении красителя-фотосенсибилизатора, его избирательном накоплении в патологически изменённых тканях и световом воздействии на них определённой длины волны.

Фотосенсибилизатор – вещество, вызывающее у биологических тканей повышенную чувствительность к свету.

Литература

1. Haidekker M.A., Theodorakis E.A. Molecular rotors-fluorescent biosensors for viscosity and flow // *Org Biomol Chem*, 2007. V.5, №11. P. 1669-78
2. Izquierdo M.A., Vysniauskas A., Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I.V., Klapshina L.G. and Kuimova M.K. // *J. Mater. Chem. (B)*. 2015. №3. P. 1089.
3. Jin H., Liang M., Arzhantsev S., Li X., Maroncelli M. Photophysical characterization of benzylidene malononitriles as probes of solvent friction // *J Phys Chem B*, 2010. V.114, №22. P. 7565-78
4. Yoon H.-J., Dakanali M., Lichlyter D., Chang W.M., Nguyen K.A., Nipper M.E., Haidekker M.A., Theodorakis E.A. Synthesis and evaluation of self-calibrating ratiometric viscosity sensors // *Org Biomol Chem*, 2011. V.9, №9. P. 3530-3540.
5. Коршунова О.В., Плехова Н.Г. Фотодинамическая терапия в онкологии: настоящее и будущее // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2020. №4. С. 15–19.
6. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. СПб.: Наука, 2010. 327 с.