

На правах рукописи



Дадеко Антонина Владимировна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДИМЕГИНА
КАК ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ
ТЕРАПИИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

01.04.05 – Оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в АО «Государственный оптический институт имени С.И. Вавилова»

Научный руководитель: доктор физико-математических наук

Киселев Валерий Михайлович

Официальные оппоненты: **Васютинский Олег Святославович**

доктор физико-математических наук,
профессор, член-корреспондент РАН, ведущий
научный сотрудник лаборатории
газодинамических явлений Физико-технического
института им. А.Ф. Иоффе РАН

Бутурлимова Марина Валерьевна

кандидат физико-математических наук,
доцент кафедры молекулярной спектроскопии
Санкт-Петербургского государственного
университета

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный
электротехнический университет «ЛЭТИ»

Защита состоится 7 ноября 2018 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 999.022.02 при АО «Государственный оптический институт имени С.И. Вавилова» и АО «НПО Государственный оптический институт имени С.И. Вавилова» по адресу: 199053, Санкт-Петербург, Кадетская линия В.О., дом 5, корпус 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке АО «Государственный оптический институт им. С.И. Вавилова» по адресу: 199053, Санкт-Петербург, Кадетская линия, д.5, корп.2 и на сайте <http://www.npkgoi.ru/>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 999.022.02,
кандидат физико-математических наук



Журенков А.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Актуальным на сегодняшний день является поиск и изучение лекарственных препаратов и методов их применения, обеспечивающих избирательность воздействия, минимизацию хирургического вмешательства и хороший косметический эффект при лечении онкологических заболеваний разной степени тяжести, а также различных инфекционных заболеваний. Все эти характеристики присущи фотодинамической терапии – методу лечения, основанного на окислительном стрессе патологических клеток под действием активных форм кислорода, образующихся при взаимодействии с введенным в организм фотосенсибилизатором, активируемым светом определенной длины волны.

Хотя возможность применения фотодинамической терапии как способа борьбы с онкологическими заболеваниями известна уже давно, на сегодняшний день данная терапия все еще не получила широкого распространения и зачастую является побочным методом лечения, применяемым либо для подготовки к хирургическому лечению, либо после него в виде поддерживающей процедуры. Одним из основных препятствий, сдерживающих широкое распространение фотодинамической терапии, является недостаточная эффективность и высокая стоимость используемых в ней лекарственных препаратов – фотосенсибилизаторов, сложное химическое производство которых не только ведет к повышению себестоимости, но также и влияет на токсичность, степень связывания с неопластическими клетками и простоту выведения из организма. Сегодня количество запатентованных фотосенсибилизаторов измеряется десятками, но лишь единицы введены в медицинскую практику. Данный феномен объясняется высокой стоимостью проведения доклинических и клинических испытаний фотосенсибилизаторов, большинство из которых оказывается не готовыми к внедрению в медицинскую практику. Именно поэтому представляется крайне важным проводить исследования и отбраковку фотосенсибилизаторов до этапа испытаний на животных, что поможет не только снизить итоговую стоимость препарата, но и использовать меньшее число животных в испытаниях. Для создания наиболее полной картины об эффективности конкретного фотосенсибилизатора необходимо проведение фотофизических исследований, стоимость которых в сотни раз ниже исследований на животных, однако результаты могут выявить наиболее перспективные и конкурентоспособные фотосенсибилизаторы.

Цели и задачи исследования. Цель настоящей работы заключается в изучении фотофизических свойств фотосенсибилизатора порфириновой природы димегина (динатриевая соль 2,4-ди (α -метоксиэтил)-дейтеропорфирина-IX) и сравнении их со свойствами фотодитазина (N-метил-D-глюкаминная соль хлорина е6) и радахлорина (тринатриевая соль хлорина е6) – фотосенсибилизаторов, уже применяемых в медицинской практике, а также в проведении фотоцитотоксических испытаний димегина для определения его эффективности *in vitro*.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести сравнительное исследование эффективности генерации синглетного кислорода, интенсивности флуоресценции и фотостабильности димегина, фотодитазина и радахлорина;
2. Измерить квантовые выходы генерации синглетного кислорода и константы тушения синглетного кислорода для димегина и фотодитазина;
3. Определить квантовый выход флуоресценции, а также коэффициент фоторазрушения (фотообесцвечивания) фотосенсибилизатора димегина;
4. Исследовать эффективность генерации синглетного кислорода, флуоресценцию и фотостабильность димегина и фотодитазина в составе комплексов с альбумином и плюронином F-127;
5. Провести сравнительное исследование димегина и фотодитазина при моделировании процесса фотодинамической терапии на культурах опухолевых клеток;
6. Выполнить анализ темновой токсичности и фотоцитотоксичности димегина на раковых клетках животных и человека;
7. Изучить флуоресцентные свойства димегина и определить сайты его накопления в опухолевых клетках для определения механизма разрушения опухоли.

Научная новизна

1. Проведен анализ эффективности генерации синглетного кислорода, флуоресценции и фотостабильности димегина в сравнении с фотодитазином и радахлорином;
2. Показано, что облучение димегина светом с длиной волны 395-405 нм (пик Core) обеспечивает долговременную эффективную генерацию синглетного кислорода, активно разрушающего патологические клетки;
3. Определены квантовые выходы генерации синглетного кислорода и константы тушения синглетного кислорода для димегина и фотодитазина, а также определен квантовый выход флуоресценции и коэффициент фотообесцвечивания димегина;
4. На основе полученных экспериментальных данных по измерению спектров поглощения и флуоресценции растворов димегина представлена схема его энергетических уровней;
5. Установлено, что комплексообразование димегина и фотодитазина с белком крови альбумином и поверхностно-активным веществом плюронином F-127 незначительно влияет на эффективность генерации синглетного кислорода и флуоресценцию фотосенсибилизаторов, но образование комплекса с альбумином заметно ухудшает фотостабильность фотосенсибилизаторов;
6. Выполнено исследование темновой токсичности и фотоцитотоксичности димегина на культурах опухолевых клеток, а также проведено изучение цитостатичности и цитотоксичности димегина в сравнении с фотодитазином на клетках нормальных фибробластов кожи и опухолевых клетках человека;

7. Методами флуоресцентной микроскопии определены сайты накопления димегина в опухолевых клетках, что позволило сделать выводы о доминирующем механизме разрушения патологических образований с применением этого фотосенсибилизатора.

Практическая значимость работы

Практической значимостью данной работы является получение новых сведений о фотофизических характеристиках фотосенсибилизатора порфириновой природы димегина, в том числе, в сравнении с характеристиками других фотосенсибилизаторов, также изученных в рамках данного исследования. Результаты фотоцитотоксического исследования димегина можно рассматривать в качестве основы для проведения доклинических исследований изучаемого фотосенсибилизатора.

Поскольку в рамках проведенного исследования было показано значительное преимущество димегина над фотосенсибилизаторами, применяемыми в настоящее время (фотодитазином и радахлорином), можно полагать, что результаты, полученные в диссертации, будут способствовать внедрению димегина в медицинскую практику.

Методология и методы исследования

Эффективность генерации синглетного кислорода определялась методом «химических ловушек» и методом прямой регистрации люминесценции синглетного кислорода на длине волны 1270 нм. Данные методы также применялись при определении квантового выхода генерации синглетного кислорода. Все квантовые выходы были определены относительно известных фотосенсибилизаторов, выступающих в качестве образцов сравнения.

Для изучения фотофизических свойств фотосенсибилизаторов в данной работе применялись флуоресцентный и спектрофотометрический методы. Источниками облучения служили светодиодные матрицы с различными длинами волн излучения. Измерение времени жизни и констант тушения синглетного кислорода фотосенсибилизаторами выполнялось с применением импульсных источников возбуждения.

Определение цитотоксического действия фотосенсибилизаторов было реализовано двумя методами: с применением МТТ-теста и с использованием индикатора выживаемости клеток PrestoBlue.

Прижизненное наблюдение за клетками, содержащими фотосенсибилизатор, осуществлялось с применением методов флуоресцентной микроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. Показано, что димегин, обладающий высоким квантовым выходом генерации синглетного кислорода (0.65 ± 0.06) и флуоресценции (0.11 ± 0.01), низким коэффициентом фоторазрушения и относительно низкой константой тушения синглетного кислорода, является эффективным фотосенсибилизатором для применения в фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностике;

2. Установлена прямая зависимость фотостабильности димегина от его концентрации, на базе чего сделано предположение о том, что более высокий показатель фотостабильности димегина по сравнению с фотодитазином и радахлорином обусловлен наличием в растворе высокой концентрации агрегатов, способствующих восстановлению исходной концентрации молекул фотосенсибилизатора в процессе его облучения;

3. Показано, что образование комплексов димегина и фотодитазина с основным белком крови – альбумином и транспортной добавкой плуроником F-127 несущественно влияет на эффективность генерации синглетного кислорода и на интенсивность флуоресценции, при этом отмечено ухудшение фотостабильности фотосенсибилизаторов в комплексе с альбумином вследствие эффективной разагрегации препаратов;

4. Доказана низкая темновая токсичность и высокая фотоцитотоксичность димегина по отношению к применяемым в исследовании опухолевым клеткам;

5. Методами флуоресцентной микроскопии определено, что в опухолевых клетках димегин накапливается преимущественно в митохондриях, определяя тем самым основной механизм разрушения опухолевых клеток при фотодинамической терапии.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертации докладывались на конференциях Университета ИТМО, научно-технических советах и конференциях «АО ГОИ им. С.И. Вавилова» и на следующих международных конференциях:

1. XXV Международная конференция «Лазеры в науке, технике, медицине», 2014 (Россия, п. Небуг Туапсинского р-на);

2. Международная медико-биологическая научная конференция молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (XVIII Всероссийская конференция «Человек и его здоровье»), 2015 (Россия, Санкт – Петербург);

3. IV Всероссийская конференция «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (с международным участием), 2015 (РФ, Санкт – Петербург);

4. PIERS-2015 (Progress In Electromagnetics Research Symposium) (Чехия, Прага);

5. Laser Optics 2016 и 2018 (Россия, Санкт – Петербург).

Материалы диссертации опубликованы в 6 печатных работах, из них 4 статьи в журналах, индексируемых Scopus и Web of Science и 2 публикации тезисов (Scopus, Web of Science) в сборниках трудов конференций.

Личный вклад соискателя

Постановка задач и поиск путей их решения осуществлялась автором совместно с научным руководителем. Все эксперименты и расчеты, проведенные в рамках данной работы, выполнялись при активном участии автора работы. Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизаторов осуществлялось на оборудовании АО «ГОИ им. С.И. Вавилова», а также на базе Института цитологии РАН и в Университете Торонто в Канаде. Подготовка к публикации

результатов исследований проводилась автором лично, при активном участии в обсуждении полученных результатов с соавторами публикаций.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка условных обозначений и терминов и списка литературы. Диссертация изложена на 135 страницах, включая 65 рисунков, 5 таблиц и список литературы из 232 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении изложена актуальность работы, определены основные цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическое значение работы, а также положения и результаты, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный исследованию фотофизических свойств фотосенсибилизаторов порфириновой природы, предназначенных для решения задач фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики. Представлен обзор основных типов фотосенсибилизаторов, находящихся на этапе исследований и применяемых в медицинской практике. Отмечены их достоинства и недостатки. На базе выполненного обзора выбраны основные объекты для исследования в данной работе и определены направления и методы исследования основных фотофизических свойств выбранных фотосенсибилизаторов, включая исследования на клеточных культурах человека и животных.

Во второй главе приведено описание исследуемых материалов, выбранных методик исследований и основных схем экспериментальных установок для проведения измерений фотофизических и оптических свойств исследуемых фотосенсибилизаторов, а также эффективности их воздействия на клеточные культуры.

В третьей главе диссертации, состоящей из трех разделов, дано описание результатов исследований основных фотофизических свойств выбранных фотосенсибилизаторов: радахлорина, фотодитазина и димегина, среди которых димегин выступает в качестве основного объекта исследования, чьи фотофизические свойства изучаются в одинаковых условиях эксперимента по сравнению со свойствами фотодитазина и радахлорина, уже применяемых в клинической практике.

В первом разделе главы 3 приведены результаты по измерению спектров оптического поглощения исследуемых фотосенсибилизаторов, эффективности генерации синглетного кислорода, интенсивности флуоресценции и фотостабильности, являющихся основными фотофизическими свойствами фотосенсибилизаторов.

Спектры оптического поглощения исследуемых фотосенсибилизаторов, растворы которых для димегина и фотодитазина получены с использованием лиофильно высушенных порошков, а для радахлорина с применением лекарственной формы, представлены на рисунке 1. Как видно из этого рисунка, максимумы поглощения в пике Sore для димегина и фотодитазина практически

не отличаются, а для радахлорина поглощение в максимуме несколько ниже, что объясняется его лекарственной формой с ее нестабильностью состава.

Эти результаты неплохо коррелируют с данными, приведенными в работе [1], в которой при одинаковой концентрации димегина и фотодитазина их поглощение в максимуме пика Соре также будет примерно одинаковым.

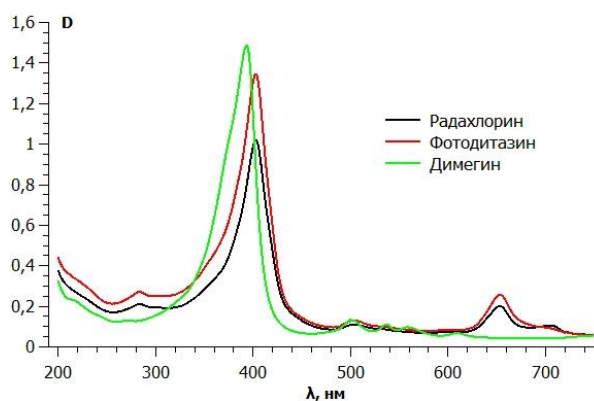


Рисунок 1 - Спектры поглощения растворов димегина, фотодитазина и радахлорина в фосфатном буфере с рН 7.0. Концентрация фотосенсибилизаторов – 10^{-5} М

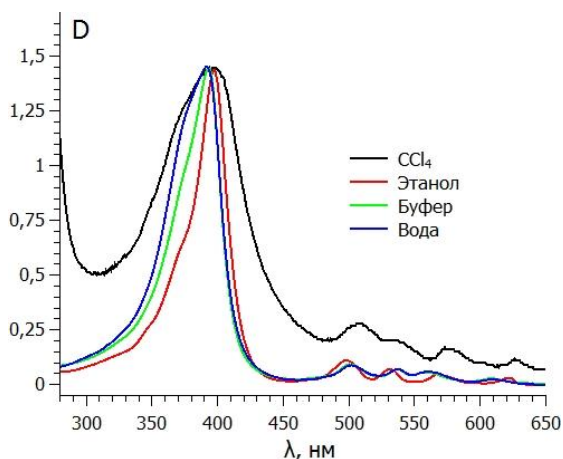


Рисунок 2 – Спектры поглощения димегина в разных растворителях, концентрация димегина в воде, буфере и в этаноле 10^{-5} М, в тетрахлорметане 10^{-6} М

Еще большее уширение профиля поглощения, как видно из таблицы 1, имеет место для раствора фотодитазина в тетрахлорметане, который также располагается на крыле поглощения растворителя CCl_4 .

Таблица 1. Положение и полуширина максимума оптического поглощения (пик Соре) для растворов димегина и фотодитазина

	Димегин		Фотодитазин	
	λ_m , нм	$\Delta\lambda_{0.5}$, нм	λ_m , нм	$\Delta\lambda_{0.5}$, нм
Вода дистиллированная, рН 6.0	391.8	45.0	405.0	34.2
Фосфатный буфер, рН 7.0	393.5	38.8	402.8	41.0
Этанол, рН 7.6	397.5	30.0	401.7	32.0
Тетрахлорметан (CCl_4)	397.5	86.0	416.4	107.3

При анализе измеренных спектров поглощения растворов фотосенсибилизаторов следует отметить заметное влияние растворителей на положение максимума в пике Соре и ширину спектрального профиля для каждого фотосенсибилизатора (см. рисунок 2 и таблицу 1).

Для удобства сравнения этих спектральных профилей они приведены к одинаковому значению максимума в пике Соре. Для димегина в тетрахлорметане значение максимума в пике Соре умножено на 10.

Наибольшее уширение профиля поглощения на рисунке 2 наблюдается для раствора димегина в тетрахлорметане. Характерный общий подъем этого профиля по отношению к другим кривым объясняется наложением на него крыла поглощения тетрахлорметана (CCl_4), максимум которого расположен в УФ области спектра на $\lambda_m=254$ нм [2].

Эффективность генерации синглетного кислорода, нарабатываемого в водных растворах при передаче фотовозбуждения от фотосенсибилизатора кислороду, определялась методом «химических ловушек» и методом прямой регистрации люминесценции синглетного кислорода на длине волны 1270 нм. При применении метода «химических ловушек» в качестве ловушки синглетного кислорода был использован триптофан, по изменению концентрации которого в растворе должна была определяться наработка синглетного кислорода.

Однако для исследуемых фотосенсибилизаторов при применении метода «химических ловушек», как показал эксперимент, следует учитывать наряду с понижением концентрации триптофана и эффективное понижение максимума поглощения в пике Соре фотосенсибилизатора, связанное с уменьшением концентрации фотосенсибилизатора (ФС) в процессе его облучения. Это понижение концентрации ФС более заметно для раствора фотодитазина и особенно радахлорина. По этой причине эффективность наработки синглетного кислорода также должна уменьшаться и выходить на насыщение, что и демонстрирует рисунок 3, на котором показана зависимость эффективности наработки концентрации синглетного кислорода (СК) в процессе облучения исследуемых растворов фотосенсибилизаторов.

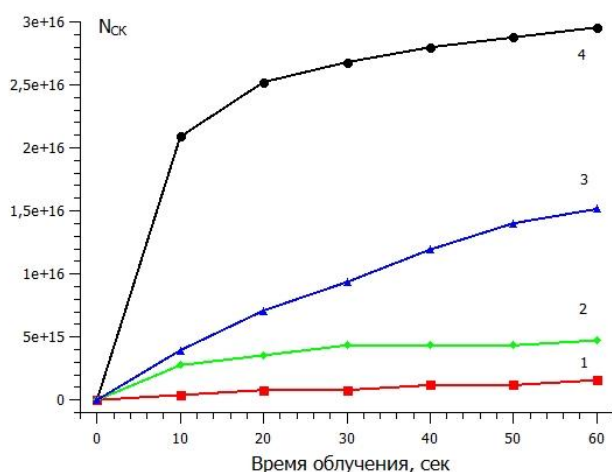


Рисунок 3 – Зависимость наработки концентрации синглетного кислорода от времени облучения растворов радахлорина (1), фотодитазина (2,4) и димегина (3) при концентрации фотосенсибилизаторов 10^{-6} М (1,2,3) и 10^{-5} М (4).

Как видно из приведенного рисунка, наработка концентрации СК, расходуемого на образование эндоперекиси триптофана, для радахлорина минимальная, что связано с низким поглощением в пике Соре, а для фотодитазина и димегина на начальном участке облучения примерно одинаковая, однако, далее кривые расходятся из-за более быстрого уменьшения концентрации фотодитазина в растворе по сравнению с димегином. Выход на насыщение наработки СК наблюдается для фотодитазина и с более высокой исходной концентрацией 10^{-5} М.

Эффективность генерации синглетного кислорода димегином, фотодитазинном и радахлорином при облучении их светодиодными матрицами с различными длинами волн излучения представлена в виде числа молекул синглетного кислорода, образующихся при взаимодействии с возбужденной молекулой фотосенсибилизатора, в таблице 2. При оценке учитывались оба канала расходования СК: на окисление как триптофана, так и самого фотосенсибилизатора. При этом первое значение по наработке синглетного кислорода, приведенное в таблице, относится к окислению триптофана, а второе

значение, приведенное в скобках, соответствует суммарной наработке синглетного кислорода, вычисленной с учетом обоих каналов его расходования.

Таблица 2. Генерация синглетного кислорода фотосенсибилизаторами, $\cdot 10^{13}$ молекул/см³с.

Источник облучения Фотосенсибилизатор	$\lambda \approx 395 \sim 405$ нм	$\lambda = 465$ нм	$\lambda = 525$ нм	$\lambda = 625$ нм
Димегин	39.2 (39.8)	1.1 (1.17)	2.3 (2.37)	0.5 (0.53)
Фотодитазин	27.6 (32.6)	1.0 (1.1)	2.2 (2.4)	3.6 (4.1)
Радахлорин	3.9 (5.9)	~ 0 (0.1)	~ 0 (~ 0)	0.6 (0.8)

Эффективность генерации синглетного кислорода с применением прямого метода регистрации наработки синглетного кислорода путем измерения его люминесценции на $\lambda = 1270$ нм представлена на рисунке 4 при облучении растворов димегина и фотодитазина в дистиллированной воде и в фосфатном буфере с рН 7.4. Следует заметить, что фосфатный буфер с рН 7.4 соответствует рН крови, поэтому люминесценция синглетного кислорода в этом растворе близка к той, которая наблюдается в реальной биоткани. Спектры люминесценции синглетного кислорода в водных растворах регистрировались с применением монохроматора М266 с временем экспозиции 12 секунд. Оптическая накачка растворов (25 мл в стеклянной колбе) выполнялась с помощью светодиодной матрицы на $\lambda = 405$ нм с плотностью мощности излучения 0.89 Вт/см².

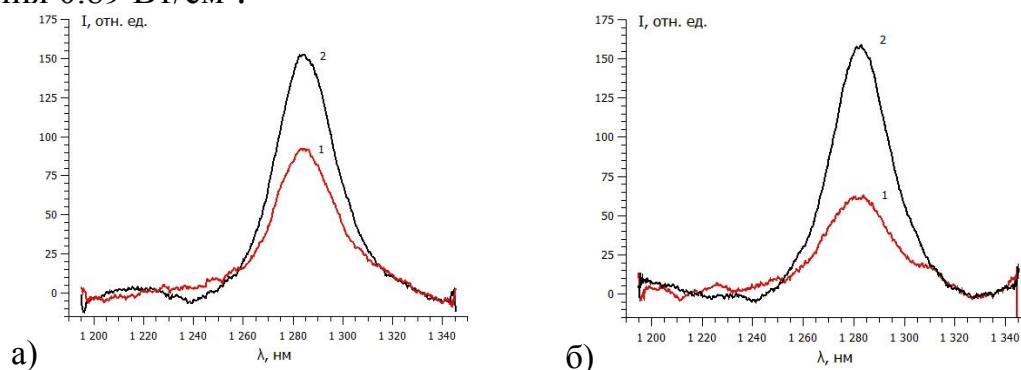


Рисунок 4 – Люминесценция синглетного кислорода в растворах фотодитазина (1) и димегина (2) в дистиллированной воде (а) и в фосфатном буфере (б); концентрация растворов 10^{-5} М.

Более низкая интенсивность люминесценции синглетного кислорода в растворе фотодитазина связана с уже отмеченным выше заметным уменьшением концентрации фотосенсибилизатора в процессе облучения раствора на временном интервале 10-12 секунд и с еще более заметным убыванием концентрации фотосенсибилизатора в фосфатном буфере.

Это различие в интенсивности люминесценции синглетного кислорода в растворах димегина и фотодитазина практически отсутствует при использовании в качестве растворителей этанола или тетрахлорметана (CCl_4), где время экспозиции при регистрации спектров люминесценции, в данном случае с применением ИК-спектрометра SDH-IV, намного меньше (на порядок для этанола и более, чем на два порядка, для растворов в CCl_4).

Применимость фотосенсибилизаторов во флуоресцентной диагностике, основанной на способности фотосенсибилизаторов флуоресцировать при облучении светом, тем самым обозначая границы и размеры патологического образования, была оценена определением интенсивности флуоресценции изучаемых фотосенсибилизаторов. При одинаковой концентрации димегин, фотодитазин и радахлорин имеют примерно одинаковую флуоресценцию.

При измерении флуоресценции исследуемых фотосенсибилизаторов показано, что спектры флуоресценции имеют две характерные полосы [3], зеркально симметричные двум наиболее длинноволновым полосам поглощения. Для димегина на рисунке 5 это показано очень отчетливо, а для фотодитазина, как и для радахлорина, второй максимум представлен только в виде небольшого подъема на крыле основного, более высокого максимума. Для удобства сравнения максимумы кривых на рисунке 5 приведены к примерно одинаковым амплитудам.

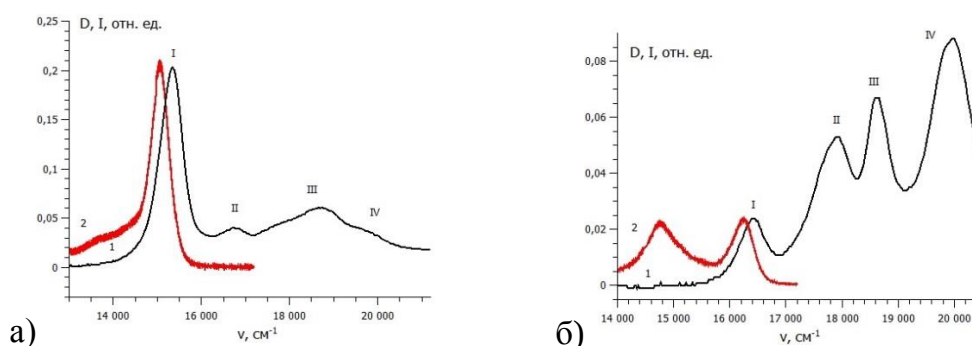


Рисунок 5 – Зеркальная симметрия спектров поглощения (1) и флуоресценции (2) для растворов фотодитазина (а) и димегина (б) в дистиллированной воде при облучении светодиодной матрицей с $\lambda_m=405$ нм, концентрация фотосенсибилизаторов – 10^{-5} М.

С использованием полос поглощения и флуоресценции, представленных на рисунке 5, с их размещением не по длинам волн, а в частотном или в энергетическом масштабе, была построена схема энергетических уровней димегина (рисунок 6), у которого, в отличие от фотодитазина, структура полос поглощения выражена более отчетливо.

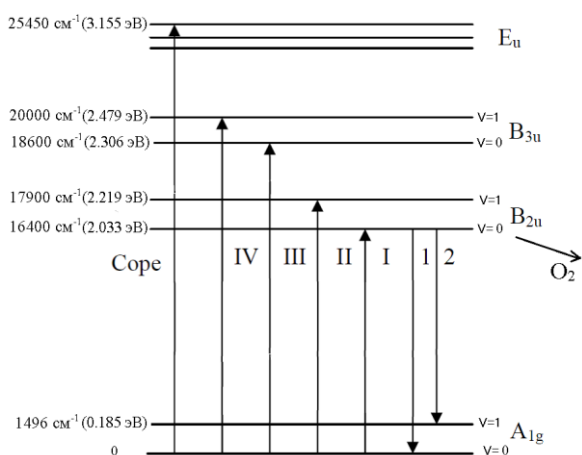


Рисунок 6 – Схема энергетических уровней димегина

Как видно на рисунке, полосы поглощения (I,II) и флуоресценции (1,2) в спектре димегина принадлежат колебательной структуре одного электронного перехода. Аналогично полосы III и IV также принадлежат колебательной структуре одного электронного перехода. Частотный интервал между полосами поглощения I и II, равный 1500 см^{-1} , что характерно для порфиринов [3], в пределах погрешности эксперимента совпадает с частотным интервалом между полосами флуоресценции (1496 см^{-1}).

В заключительной части *первого раздела* главы 3 рассматривается фотостабильность фотосенсибилизаторов, т.е. их устойчивость к облучению. Данное свойство играет важную роль для применения их в фотодинамической терапии. На рисунке 7 представлены соответствующие изменения концентрации димегина, фотодитазина и радахлорина в растворе фосфатного буфера при их облучении.

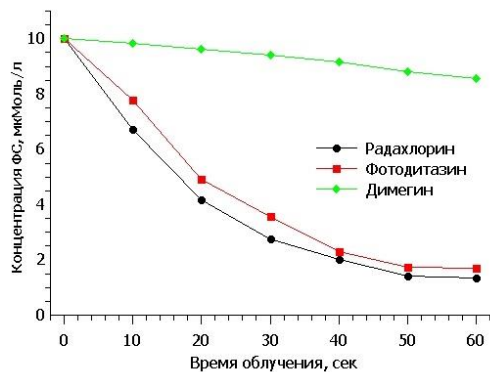


Рисунок 7 – Изменение концентрации фотосенсибилизаторов в растворе фосфатного буфера (рН 7.0) при облучении светодиодной матрицей ($\lambda_m \approx 395 \sim 405$ нм).

причиной относительной устойчивости порфиринового ядра фотосенсибилизатора к воздействию синглетного кислорода. В свою очередь, фотодитазин и радахлорин являются хлоринами – производными порфиринов, у которых симметрия порфиринового кольца нарушена за счет гидрирования одной углерод-углеродной двойной связи, что приводит к нарушению электронного облака молекулы. Данный факт определяет снижение сопротивляемости молекул хлоринов к внешним воздействиям, в частности, к окислению синглетным кислородом и радикалами.

Дополнительным свойством димегина как порфиринового ФС является его повышенная способность к агрегации, определяемая особенностью взаимодействия тетрапиррольных макроциклов порфиринов. Данное явление приводит не только к уменьшению растворимости порфиринов, но и к изменению их фотофизических и оптических свойств, а кроме того, в данном случае способствует восстановлению концентрации молекул димегина в растворе в процессе его облучения. А это также определяет более высокую фотостабильность димегина по сравнению с хлоринами, что и было подтверждено результатами данной работы.

Во втором разделе главы 3 для димегина и фотодитазина были измерены квантовые выходы генерации синглетного кислорода, для димегина – квантовый выход флуоресценции, а также коэффициент фоторазрушения.

Квантовые выходы синглетного кислорода для димегина и фотодитазина были получены с применением двух методов: метода химической ловушки (триптофана) и метода прямой регистрации люминесценции синглетного кислорода. Для определения квантового выхода генерации синглетного

кислорода методом химической ловушки в качестве фотосенсибилизатора сравнения был использован краситель метиленовый синий, а методом прямой регистрации люминесценции синглетного кислорода – фуллерен C₆₀. Поскольку разницу между квантовыми выходами генерации синглетного кислорода метиленового синего и димегина можно представить как разницу в расходе ловушки синглетного кислорода – триптофана, в данном эксперименте применялась формула [4].

$$\Phi_{PS} = \frac{(c_0 - c_t) * N_A * V_R}{(1 - 10^{-D}) * A * I * t}, \quad (1)$$

где c_0 и c_t – концентрации триптофана в растворе до и после облучения, соответственно, N_A – число Авагадро, V_R – реакционный объем раствора, D – оптическая плотность раствора на длине волны облучения, A – площадь облучения, I – интенсивность облучения и t – время облучения.

Записывая данную формулу для димегина и метиленового синего и взяв их отношение с одновременным сокращением параметров, одинаковых для двух фотосенсибилизаторов в данном исследовании, получим формулу

$$\Phi_{\Delta D} = \Phi_{\Delta MB} * \frac{(c_{0D} - c_{tD})}{(c_{0MB} - c_{tMB})} \quad (2)$$

по которой был определен квантовый выход генерации СК димегина и фотодитазина, которые составили 0.65 ± 0.06 и 0.56 ± 0.05 , соответственно.

При определении квантового выхода генерации синглетного кислорода путем прямого измерения люминесценции синглетного кислорода выполнялось измерение генерируемой стационарной люминесценции синглетного кислорода в районе длины волны 1270 нм для двух фотосенсибилизаторов: исследуемого и базового. При этом интенсивность сигнала люминесценции синглетного кислорода может быть описана следующим образом [4]:

$$I = \gamma * k_r * \tau * \Phi * (1 - 10^{-D}) * I_{ex}, \quad (3)$$

где k_r – константа скорости излучательного перехода на длине волны 1270 нм, I_{ex} – интенсивность оптического возбуждения, γ – постоянный коэффициент, определяемый оборудованием, τ – время жизни синглетного кислорода в растворе, D – оптическая плотность раствора на длине волны возбуждения, а Φ – квантовый выход генерации синглетного кислорода.

Записав аналогичные выражения для сигнала люминесценции синглетного кислорода для базового и исследуемого фотосенсибилизаторов и взяв их отношение, получим соответствующее выражение для вычисления квантового выхода генерации синглетного кислорода для исследуемого фотосенсибилизатора:

$$\Phi_s = \Phi_b * \left(\frac{I_s}{I_b} \right) * \frac{\tau_b}{\tau_s} * \frac{(1 - 10^{-D_b})}{(1 - 10^{-D_s})} * \frac{I_{exb}}{I_{exs}}, \quad (3)$$

где индекс b соответствует базовому фотосенсибилизатору, а индекс s – исследуемому.

В соответствии с этим выражением для вычисления квантового выхода генерации синглетного кислорода для исследуемого фотосенсибилизатора были

получены значения интенсивности оптического возбуждения, интенсивности люминесценции, оптической плотности растворов на длине волны возбуждения и времени жизни синглетного кислорода для базового и исследуемого фотосенсибилизаторов. В результате были получены квантовые выходы генерации синглетного кислорода для димегина и фотодитазина – 0.66 ± 0.06 и 0.58 ± 0.05 , коррелирующие со значениями, полученными методом химических ловушек, а также с результатами работы [5]. В процессе эксперимента были также определены константы тушения возбужденного состояния кислорода в растворе, которая для димегина равна $2.2 \cdot 10^7$ л моль⁻¹ с⁻¹, а для фотодитазина равна $2.5 \cdot 10^7$ л моль⁻¹ с⁻¹.

Квантовый выход флуоресценции димегина определялся также с применением фотосенсибилизатора-сравнения, в качестве которого выступал «Протопорфирин IX». Спектры флуоресценции для димегина, растворенного в фосфатном буфере pH 7.4, и «Протопорфирина IX», растворенного в диметилсульфоксиде, возбуждаемых на длине волны $\lambda_m = 404$ нм, были получены на флуоресцентном спектрометре Shimadzu RF-5301PC. Квантовый выход флуоресценции димегина был рассчитан с применением выражения:

$$\Phi_{fD} = \Phi_{fPPIX} \frac{S_D \cdot n_D^2}{S_{PPIX} \cdot n_{PPIX}^2}, \quad (4)$$

где S_D и S_{MB} – интегралы площадей под кривыми спектров флуоресценции димегина и «Протопорфирина IX», n_D и n_{PPIX} – показатели преломления растворителей, а Φ_{fD} и $\Phi_{fMB} = 0.16$ – квантовые выходы флуоресценции димегина и «Протопорфирина IX». Значение квантового выхода флуоресценции димегина получилось равным 0.11 ± 0.01 .

Коэффициент фотообесцвечивания димегина был определен из формулы (1), в которой изменение концентрации ловушки в растворе было заменено на изменение концентрации фотосенсибилизатора в растворе. Для димегина коэффициенты фотообесцвечивания составили $16 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-5}$ для растворов ФС в буфере pH 7.4 ($2 \cdot 10^{-6}$ Моль/л), в питательной клеточной среде DMEM pH 7.4 ($2 \cdot 10^{-6}$ Моль/л) и в буфере pH 7.0 (10^{-5} Моль/л), соответственно.

В третьем разделе главы 3 выполнено изучение влияния транспортных добавок (альбумин и плуроник F-127) на фотофизические свойства димегина и фотодитазина: эффективность генерации синглетного кислорода, флуоресценцию и фотостабильность. В процессе эксперимента образование комплексов фотосенсибилизаторов с альбумином и плуроником определяли по изменению спектра поглощения. Было установлено, что комплексообразование димегина и фотодитазина с белком крови альбумином и поверхностно-активным веществом плуроником F-127 незначительно влияет на эффективность генерации синглетного кислорода и флуоресценцию фотосенсибилизаторов, но образование комплекса с альбумином заметно ухудшает фотостабильность фотосенсибилизаторов. Вероятно, мицеллы, образуемые плуроником, включают в себя и слипшиеся молекулы фотосенсибилизаторов, т.е. не слишком эффективно способствуют разагрегации, в то время как сайты на молекуле альбумина очень активно комбинируются с отдельными молекулами

фотосенсибилизатора, тем самым «растаскивая» агрегаты и образуя комплексы с другими свойствами. Как уже показано выше, высокая фотостабильность димегина при применяемой в данном эксперименте концентрации 10^{-5} Моль/л, объясняется большим количеством агрегатов в растворе, и отмечено, что уменьшение концентрации димегина приводит к его разагрегации и снижению фотостабильности. Таким же образом, разагрегация димегина альбумином приводит к значительному снижению его фотостабильности. При этом для димегина она остается все же более высокой по сравнению с фотодитазином, по-видимому, вследствие отмеченного ранее различия химической структуры между порфириновыми соединениями и хлоринами.

В четвертой главе с целью подтверждения полученных данных о фотофизических и оптических свойствах фотосенсибилизаторов была смоделирована процедура фотодинамической терапии на четырех линиях опухолевых клеток *U87* – первичная глиобластома человека, *RG2* – глиома крыс, *HT1372* – рак мочевого пузыря человека и *AY27* – карцинома мочевого пузыря крыс, на которых дополнительно была изучена темновая токсичность димегина. Также с применением МТТ-теста было проведено исследование цитотоксических и цитостатических свойств димегина в сравнении с фотодитазином на клетках нормальных фибробластов кожи человека и опухолевых культурах карциномы шейки матки человека *HeLa*.

Результаты исследования фотоцитотоксичности димегина показали его низкую «темновую токсичность». Димегин в концентрациях 2,5 мкг/мл и 5 мкг/мл оказал значительно лучший токсический эффект на опухолевые клетки линии *HeLa* нежели фотодитазин в тех же концентрациях, что свидетельствует о возможности использования меньшего количества димегина для достижения схожего фотодинамического эффекта при проведении фотодинамической терапии. Для сравнения с другими фотосенсибилизаторами была составлена таблица 3, описывающая полулетальную дозу концентрации димегина в микромолях на литр раствора. Для сравнения в таблице приведены данные по полулетальной дозе АЛК-индуцированного «Протопорфирина IX» [7].

Таблица 3. Полулетальные дозы концентрации димегина (LD_{50}) для различных клеточных линий.

Фотосенсибилизатор	Димегин		«Протопорфирин IX»
Длина волны облучения Клеточные линии	$\lambda=530\text{нм}$, плотность мощности 250 мВт/см ²	$\lambda=625\text{ нм}$, плотность мощности 227 мВт/см ²	$\lambda=635\text{ нм}$, плотность мощности 156 мВт/см ²
<i>AY27</i>	2.5 мкМоль/л	1.8 мкМоль/л	
<i>RG2</i>	2.8 мкМоль/л	2 мкМоль/л	535 мкМоль/л
<i>HT1376</i>	4.5 мкМоль/л	5 мкМоль/л	
<i>U87</i>	2.8 мкМоль/л	2.4 мкМоль/л	533 мкМоль/л

Полулетальные дозы (LD_{50}) концентрации димегина для четырех линий опухолевых культур по сравнению с «Протопорфирином IX», оказались весьма

небольшими, что доказывает, что димегин даже в незначительных концентрациях способен вызвать хороший терапевтический эффект.

Изучение флуоресцентных свойств димегина было проведено при моделировании процедуры флуоресцентной диагностики на линиях опухолевых клеток AY27, HT1372, U87 и RG2, одновременно с которым были определены сайты накопления димегина в изучаемых клетках.

Преимущественное свечение вокруг ядер клеток указало на то, что мишенями для димегина являются клеточные органеллы, преимущественно митохондрии. Избирательное накопление димегина в митохондриях также было подтверждено в исследовании [4]. Совокупность литературных данных и полученных результатов позволяют заключить, что преимущественным механизмом клеточной гибели при фотодинамической терапии с димегином является апоптоз, что положительно скажется на эффективности лечения.

В заключении представлены основные результаты, полученные в работе.

Проведено исследование фотофизических свойств димегина в сравнении со свойствами уже применяемых в медицинской практике фотосенсибилизаторов порфириновой природы – фотодитазина и радахлорина.

Выявлена зависимость фотофизических и оптических свойств исследуемых фотосенсибилизаторов от спектров их поглощения, поскольку данный аспект весьма важен при выборе источников облучения как для фотодинамической терапии, так и флуоресцентной диагностики.

Выполнено сравнительное исследование эффективности генерации синглетного кислорода, интенсивности флуоресценции и фотостабильности димегина, фотодитазина и радахлорина. Образование синглетного кислорода регистрировалось с применением метода химических ловушек и по наблюдению его ИК-люминесценции $\lambda=1270$ нм на переходе $O_2(^1\Delta_g, v'=0) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g, v''=0)$.

Результаты показали, что димегин обладает более высокой эффективностью генерации синглетного кислорода, особенно при облучении источником света с длиной волны 395-405 нм. При этом у димегина отмечена и достаточно высокая интенсивность флуоресценции.

На основе полученных экспериментальных данных по измерению спектров поглощения и флуоресценции растворов димегина представлена схема его энергетических уровней.

Установлена прямая зависимость фотостабильности димегина от его концентрации, на базе чего сделано предположение о том, что более высокий показатель фотостабильности димегина по сравнению с фотодитазином и радахлорином обусловлен наличием в растворе высокой концентрации агрегатов, способствующих восстановлению исходной концентрации молекул фотосенсибилизатора в процессе его облучения.

Измерены квантовые выходы генерации синглетного кислорода для димегина (0.65 ± 0.06) и фотодитазина (0.56 ± 0.05) и константы тушения синглетного кислорода димегином ($2.2 \cdot 10^7$ л моль⁻¹ с⁻¹) и фотодитазином ($2.5 \cdot 10^7$ л моль⁻¹ с⁻¹). Определен квантовый выход флуоресценции для димегина (0.11 ± 0.01), а также коэффициенты фоторазрушения (фотообесцвечивания)

димегина, которые составили $16 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-5}$ для растворов ФС в буфере pH 7.4 ($2 \cdot 10^{-6}$ Моль/л) и в буфере pH 7.0 (10^{-5} Моль/л), соответственно.

Высокие квантовые выходы генерации синглетного кислорода и флуоресценции являются для димегина показателем возможности успешного использования его в фотодинамической терапии и во флуоресцентной диагностике.

Исследованы эффективность генерации синглетного кислорода, флуоресценция и фотостабильность для димегина и фотодитазина в составе комплексов с альбумином и плуроником F-127. Показано, что образование комплексов димегина и фотодитазина с основным белком крови – альбумином и транспортной добавкой плуроником F-127 несущественно влияет на эффективность генерации синглетного кислорода и интенсивность флуоресценции. При этом отмечено заметное ухудшение фотостабильности фотосенсибилизаторов в комплексе с альбумином вследствие эффективной агрегации препаратов.

С целью подтверждения полученных данных о фотофизических и оптических свойствах исследуемых фотосенсибилизаторов в работе были проведены также исследования прикладного характера по определению свойств димегина и фотодитазина в условиях смоделированной процедуры фотодинамической терапии на реальных культурах опухолевых клеток. В соответствии с этим выполнено исследование темновой токсичности и фотоцитотоксичности димегина на культурах опухолевых клеток, а также проведено изучение цитостатичности и цитотоксичности димегина в сравнении с фотодитазином на клетках нормальных фибробластов кожи и опухолевых клетках человека. Продемонстрирована низкая темновая токсичность и высокая фотоцитотоксичность димегина по отношению к опухолевым клеткам человека и животных.

Методами флуоресцентной микроскопии определены сайты накопления димегина в опухолевых клетках, что позволило сделать выводы о доминирующем механизме разрушения патологических образований с применением этого фотосенсибилизатора.

Практической значимостью данной работы является получение новых сведений о фотофизических и оптических характеристиках фотосенсибилизаторов порфириновой природы: димегина, фотодитазина и радахлорина.

Цитируемая литература

1. Zarubaev V.V., Kris'ko T.K., Kriukova E.V., Muraviova T.D. Effect of albumin on the fluorescence quantum yield of porphyrin –based agents for fluorescent diagnostics//Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2017. – V. 20. – P.137.
2. Hanf A., Läuter A., Volpp H.-R. Absolute chlorine atom quantum yield measurements in the UV and VUV gas-phase laser photolysis of CCl_4 // Chem. Phys. Lett. – 2003. – V. 368. – P. 445.
3. Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьев К.Н. Спектроскопия порфиринов // Успехи физических наук. – 1963. – Т. 79. – №2. – С. 173.

4. Spiller W., Kliesch H., Wöhrle D., Hackbarth S., Röder B. Schnurpfeil G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions // *Journal of porphyrins and phthalocyanines*. – 1998. – V. 2. – P. 145.
5. Красновский А.А. мл., Егоров С.Ю., Назарова О.В., Ярцев Е.И., Пономарев Г.В. Фотогенерация синглетного молекулярного кислорода водорастворимыми порфиринами // *Биофизика*. – 1987. – Т. 32. – №.6. – С. 982.
6. Fickweiler S., Szeimies R.-M., Abels C., Ponomarev G.V., Hofstädter F., Wolfbeis O.S., Landthaler M.. Photosensitization of skin-derived cell lines by Dimegin [2,4-di-(α -methoxyethyl)-deuteroporphyrin IX] in vitro // *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. – 1998. – V. 14. – № 3-4. – P. 125.
7. Kongshaug M. The distribution of porphyrins with different tumor localizing ability among human plasma protein. // *British J. of cancer*. – 1989. – V. 59. – P. 184.

Публикации по теме диссертации в рецензируемых журналах (ВАК)

1. Дадеко А.В., Муравьева Т.Д., Стародубцев А.М., Горелов С.И., Добрун М.В., Багров И.В., Белоусова И.М., Пономарев Г.В. Фотофизические свойства фотосенсибилизаторов порфириновой природы // *Оптика и спектр*. – 2015. – Т. 119. – № 4. – С. 617.
2. Дадеко А.В., Муравьева Т.Д., Стародубцев А.М., Белоусова И.М. Изучение фотофизических свойств водорастворимого фотосенсибилизатора порфириновой природы – димегина // *Оптический журнал*. 2016. – Т. 83. – № 3. – С. 71.
3. Дадеко А.В. Влияние альбумина на фотофизические свойства фотосенсибилизатора димегина // *Оптика и спектр*. 2016. – Т. 121. – № 6. – С. 45.
4. Дадеко А.В., Багров И.В., Белоусова И.М., Крисько Т.К., Крюкова Е.В., Мартыненко И.В., Савченко М.Р.. Оптические и фотофизические свойства фотосенсибилизатора хлориновой природы фотолон в водных растворах разной кислотности // *Оптика и спектр*. – 2017. – Т. 123. – № 3 – С. 364.

Публикации в других изданиях

1. Дадеко А.В., Муравьева Т.Д., Стародубцев А.М., Горелов С.И., Добрун М.В., Белоусова И.М., Багров И.В., Пономарев Г.В. Фотофизические свойства фотосенсибилизаторов порфириновой природы // *Лазеры в науке, технике, медицине: XXV. Сборник научных трудов*. – 2014. – Т. 25. – С. 161-164.
2. Дадеко А.В., Муравьева Т.Д., Стародубцев А.М., Белоусова И.М. Изучение фотофизических свойств нового фотосенсибилизатора порфириновой природы // *Сборник трудов III конференции "Будущее оптики" для молодых специалистов, кандидатов наук, аспирантов и студентов оптической отрасли и смежных дисциплин*. – 2015. – С. 38-41
3. Dadeko A.V., Murav'eva T.D., Belousova I.M. Photophysical Properties of Porphyrin Photosensitizers // *International Conference Laser Optics, LO 2016*. – 2016. – P. S254.
4. Дадеко А.В. Тезисы XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, посвященной двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ // *Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье*. – 2015. – С. 154-155.