

УДК 544.52

І.В. Березовська, О.М. Білаш, М.М. Рожицький

Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕРАЦІЇ СИНГЛЕТНОГО КИСНЮ З ВИКОРИСТАННЯМ ХІМІЧНИХ ПАСТОК В МЕТОДІ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ

В роботі розглянуті фотодинамічні процеси, які виникають в методі фотодинамічної терапії з використанням напівпровідникових наноматеріалів, а саме квантово-розмірних квантових точок в якості фотосенсибілізаторів. Проведено експериментальне дослідження напівпровідникових квантових точок (CdTe з покриттям оболонкою TGA), отримані їх спектральні характеристики, а також досліджена кінетика процесів з участю синглетного кисню – активного компоненту метода фотодинамічної терапії. Отримана інформаційна система для виявлення ефективності ФС для метода фотодинамічної терапії.

Ключові слова: квантові точки, синглетний кисень, фотодинамічна терапія, фотосенсибілізатор, хімічні пастки.

Вступ

Стрімко йде розвиток у галузі напівпровідникових наноматеріалів, таких як квантові точки (КТ). Завдяки їх відмінним якостям, а саме оптичним, головний інтерес в їх дослідженні спрямований на використання в фотодетекторних та світловипромінювальних пристроях, біології, біологічних сенсорах [1]. Актуальним являється використання КТ в якості матеріалів для терапії пухлинних захворювань методом фотодинамічної терапії (ФДТ), що є метою даної роботи.

Метод фотодинамічної терапії

Для терапії пухлинних захворювань використовують традиційні методи, такі як хірургія, променева терапія, хіміотерапія, а також фотодинамічна терапія. З наведених методів терапії, ФДТ є найбільш перспективною та діючою. Традиційні методи терапії мають ряд недоліків – негативний вплив на оточуючі пухлину тканини, в тому числі із-за радіоактивного опромінення тканин, різноманітні системні ускладнення після терапії. В порівнянні з відомими методами, ФДТ являється малоінвазивним методом, також може поєднуватися з традиційними методами терапії пухлинних захворювань з метою підвищення ефективності терапії.

Сутність методу фотодинамічної терапії базується на використанні фотосенсибілізатора (ФС), що збуджується світлом певної довжини хвилі в присутності кисню. Фотосенсибілізатор селективно накопичується в пухлинних тканинах. При збудженні фотосенсибілізатора в системі проходять фотодинамічні процеси. Фотодинамічний ефект, що виникає при цьому, може призводити до пошкодження вірусів, найпростіших одноклітинних, викликаючи дефекти мембран, порушення обміну речовин [2]. Виділяють 2 типи процесів у методі ФДТ. До першого типу можна віднести реакції, основані на фотовідновленні сенсибілізатора за допомогою окислюючих агентів, з пода-

льшим утворенням вільних радикалів, що відбувається внаслідок відриву атома водню або переносу електрона. Ці радикали можуть реагувати з молекулярним киснем, продуктом реакції є активні форми кисню, такі, як супероксид-аніон-радикал.

Механізм другого типу заснований на резонансному переносі енергії між молекулярним киснем та фотосенсибілізатором у триплетному стані з утворенням синглетного кисню.

Процес ФДТ починається з поглинання фотона фотосенсибілізатором, що знаходиться в синглетному основному стані S_0 , з переходом у перший збуджений синглетний стан S_1 (рис. 1). У результаті інтеркомбінаційної конверсії фотосенсибілізатор переходить з збудженого синглетного стану в більш довготривалий триплетний (T_1) збуджений стан [3]. У основний стан S_0 із триплетного стану ФС повертається в результаті триплетної рекомбінації з киснем у триплетному стані 3O_2 . Цей процес призводить до переходу кисню з триплетного у синглетний (1O_2) стан, що являється деструктивним для пухлинних кліток. Кисень являється складовою частиною і обов'язковим компонентом фотодинамічної реакції. Утворений в результаті фотодинамічної реакції синглетний кисень являється одним з головних складових терапевтичного ефекту метода.

Використання традиційних ФС (органічних барвників) в методі ускладнює його розвиток та вдосконалення. Напівпровідникові квантові точки характеризуються рядом переваг у порівнянні з органічними барвниками-сенсибілізаторами: вузький спектр випромінювання, який залежить від розмірів наноматеріала; широкий спектр поглинання; стійкість до фотознебарвлення; майже повна відсутність проявлення токсичних властивостей. Ефективність використання нових фотосенсибілізаторів (КТ) в методі фотодинамічної терапії можна обґрунтувати за допомогою досліджень, пов'язаних з детектуванням генерації синглетного кисню, а також спектральних властивостей фотосенсибілізаторів, що досліджуються.

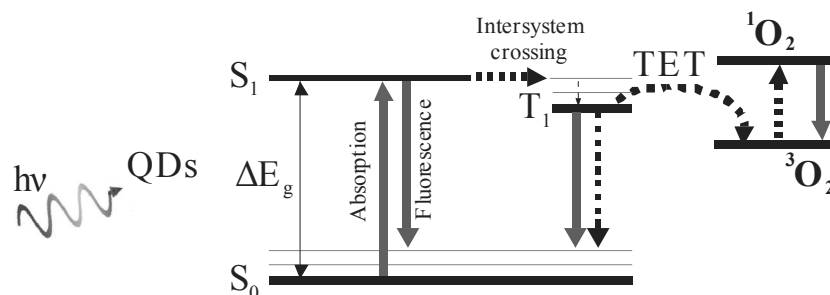


Рис. 1. Схема фотодинамічного процесу другого типу з генерацією синглетного кисню. S_0 , S_1 , T_1 , – синглетний основний, збуджений та триплетний стан ФС, відповідно, 1O_2 , 3O_2 – синглетний і молекулярний кисень, відповідно, TET – триплет-триплетний перенос енергії, QDs – квантові точки

Для реєстрації генерації синглетного кисню використовують різні методи – хімічні, фізичні та ін. методи [4].

В даній роботі для реєстрації генерації синглетного кисню використовувався метод хімічних пасток у водних розчинах. Метод хімічних пасток являється високочутливим фотохімічним методом для реєстрації синглетного кисню.

Матеріали та методи

Для проведення експериментальної роботи використовували наступні складові: р-нітрозодиметиланілін (RNO) фірми Sigma Aldrich, бенгальський рожевий, гістидин, бідистилат, квантові точки CdTe з покриттям тiogліколева кислота (TGA). Для реєстрації спектрів поглинання, а також для дослідження систем з синглетним киснем використовували спектрофотометр Ocean Optics QE 65000.

Під час вибору хімічних пасток необхідно враховувати певні критерії: пастка повинна бути специфічною по відношенню до синглетного кисню, в наслідок реакції не повинно бути побічних компонентів, що ускладнюють реакцію, також пастка не повинна приймати участь в процесі генерації синглетного кисню.

Нашою задачею було визначити, чи обумовлено знебарвлення RNO результатом генерації синглетного кисню та його взаємодії з гістидином.

З цією метою проведено спектральне дослідження розчину №1 50 мкМ RNO в фосфатному буфері. Як показано на рис. 2, а, процес знебарвлення RNO не починається в випадку відсутності ФС, на що вказує незмінність спектру поглинання розчину навіть при тривалому (60 хвилин) опроміненні лазером ($\lambda = 532$ нм). При цьому не спостерігається генерація синглетного кисню, отже, не утворюються трансанулярні перекиси, та, як результат, не відбувається знебарвлення RNO.

Наступною нашою задачею було провести реєстрацію генерації синглетного кисню методом хімічних пасток, що включає в себе реєстрацію спектра поглинання RNO, сутність метода наведена нижче.

В розчин (№2) 47 мкМ RNO в фосфатному буфері (рН 6.98) додавали 10 мМ гістидина, що є селективним акцептором синглетного кисню. В якості фотосен-

сйбілізатора використовували 9.83 мкМ барвник – бенгальський рожевий. Принцип метода хімічних пасток для реєстрації генерації синглетного кисню полягає в наступному: зразок розчину (гістидин, ФС, р-нітрозодиметиланілін) розташовують в кювету ($1 \times 1 \times 5$ см). ФС, що знаходився в розчині, збуджували лазерним опроміненням на довжині хвилі 532 нм. Після опромінення лазером, тривалість опромінення варіювали, лазер вимикали, спектр поглинання реєстрували спектрофотометром при опроміненні тестового розчину світлом дейтерієвої та галогеновою ламп.

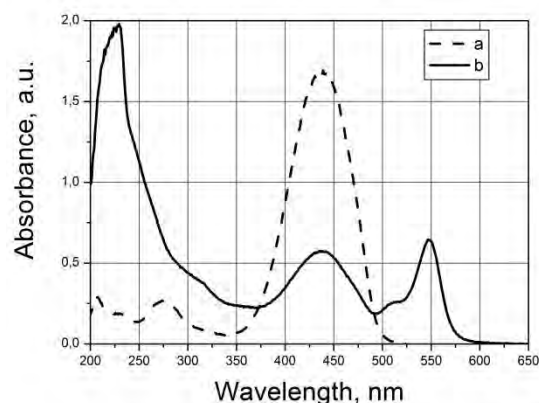
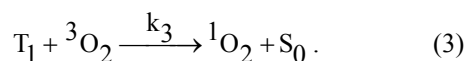
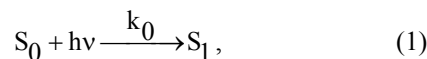
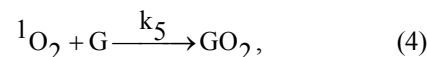


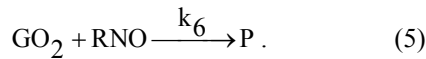
Рис. 2. Спектр поглинання RNO після опромінення лазером ($\lambda=532$ нм) протягом 60 хв.: а – без ФС; б – з ФС

Внаслідок лазерного опромінення ФС переходить зі збудженого синглетного в триплетний стан, з подальшою генерацією синглетного кисню.



Гістидин, вступаючи в реакцію з синглетним киснем, утворює трансанулярні перекиси, які призводять до знебарвлення RNO на довжині хвилі 440 нм. Знебарвлення RNO реєстрували за зміною спектра поглинання.





У рівняннях (1) – (5) S_0 , S_1 , T_1 , – синглетний основний, збуджений та триплетний стан ФС, відповідно; $^1\text{O}_2$, $^3\text{O}_2$ – синглетний і молекулярний кисень, відповідно; GO_2 – трансанулярні перекиси; P – продукт реакції.

При опроміненні зразка (розчин №2) лазером тривалістю 20 хвилин (рис. 3) знебарвлення RNO проходило повільно, внаслідок чого була збільшена потужність лазерного випромінювання.

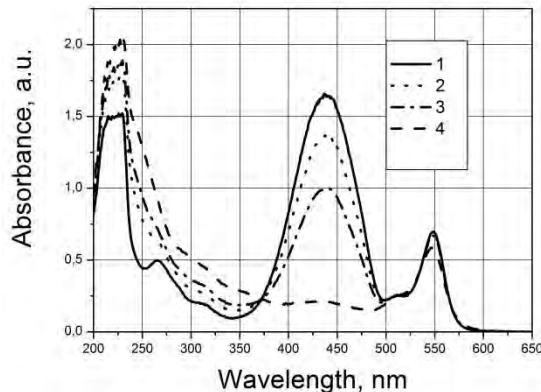


Рис. 3. Знебарвлення RNO в результаті генерації синглетного кисню: 1 – до опромінення лазером; 2 ÷ 4 – тривалість опромінення лазером 20, 40, 80 хв., відповідно

Як видно зі спектрів поглинання (рис. 3, крива 4) після підвищення потужності швидкість знебарвлення RNO зростає – кількість синглетного кисню збільшилась, тобто зросло споживання гістидина, що сприяло утворенню більшої кількості трансанулярних перекисів.

Для метод хімічних пасток, використаного в даній роботі, розроблена інформаційна система для оцінки ефективності фотосенсибілізаторів різного походження, та використання їх для ФДТ ($h\nu c/4$).

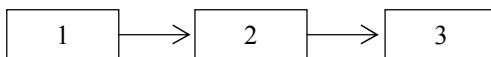


Рис. 4. Інформаційна система для визначення ефективності фотосенсибілізатора: 1 – зразок з дослідним ФС, 2 – система отримання та обробки спектральних характеристик зразка, 3 – аналіз та порівняння з еталонним зразком

Під еталонним зразком мається на увазі ФС, який використовується на практиці в методі ФДТ.

Для проведення подібних експериментів з КТ були отримані спектральні характеристики поглинання КТ типа CdTe (TGA). Спектри реєстрували для квантових точок різних за діаметром, рис. 5. Обробку спектрів проводили з використанням програмного забезпечення Spectra Suite 1.0. системна обробка отриманої інформації включала також процедуру співставлення отриманих даних з даними від еталонного зразка ФС на основі фотодидитазину.

Що є необхідним для визначення ефективності роботи запропонованих ФС. За результатами обробки виявили залежність довжини хвилі поглинання від діаметра, що дозволяє підбирати квантові точки з необхідною довжиною хвилі, яка проходить необхідну для терапевтичного або діагностичного ефекту глибину тканини людини.

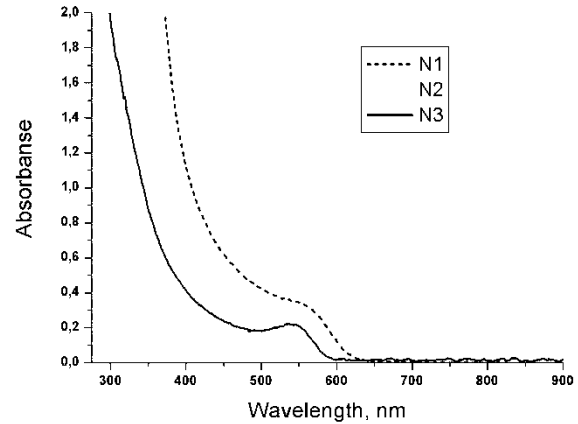


Рис. 5. Спектри поглинання водного розчину КТ CdTe/TGA: N1 – зразок з $d = 3.21$ нм; N2 – зразок з $d = 3.1$ нм; N3 – зразок з $d = 3.2$ нм

Висновки

Використаний метод хімічних пасток дозволив зафіксувати генерацію синглетного кисню використовуючи лазерне опромінення. Це дозволяє зробити висновок стосовно адекватності модельних експериментів для виявлення ефективності використання напівпровідникових квантових точок генерувати синглетний кисень в методі ФДТ.

Використання наноматеріалів – квантових точок для фотодинамічної терапії можна віднести до одного з найперспективніших напрямків дослідження.

Робота виконана за підтримки проекту УНТЦ №5067 (науковий керівник проекту – проф. М.М. Рожицький).

Список літератури

1. Jamieson T. *Biological applications of quantum dots* / T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocsok, Mo Imani, A.M. Seifalian // *Biomaterials*, 28, 4717-4732, (2007).
2. Шинкаренко Н.В. *Химические свойства синглетного кислорода и значение его в биологических системах* / Н.В. Шинкаренко, В.Б. Алесковский // *Успехи химии*, 51, 713 (1982).
3. Buhong Li. *Detection system for singlet oxygen luminescence in photodynamic therapy* / Buhong Li, Huiyun Lin, Defu Chen, Min Wang, Shusen Xie // *Chinese optics letters*, Vol. 8, No. 1, January 10, (2010).
4. Шинкаренко Н.В. *Синглетный кислород, методы получения и обнаружения* / Н.В. Шинкаренко, В.Б. Алесковский // *Успехи химии*, 50, 406 (1981).

Надійшла до редколегії 15.02.2013

Рецензент: д-р техн. наук, проф. І.В. Прасол, Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ХИМИЧЕСКИХ ЛОВУШЕК В МЕТОДЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

И.В. Березовская, Е.М. Белаш, Н.Н. Рожицкий

В работе рассмотрены фотодинамические процессы, которые возникают в методе фотодинамической терапии с использованием полупроводниковых наноматериалов, а именно квантово-размерных квантовых точек в качестве фотосенсибилизаторов. Проведено экспериментальное исследование полупроводниковых квантовых точек (CdTe с покрытием оболочкой TGA), получены их спектральные характеристики, а также исследована кинетика процессов с участием синглетного кислорода – активного компонента метода фотодинамической терапии. Получена информационная система для оценки эффективности ФС для метода фотодинамической терапии.

Ключевые слова: квантовые точки, синглетный кислород, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, химические ловушки.

**RESEARCH GENERATION OF SINGLET OXYGEN WITH USE CHEMICAL TRAPS
IN THE PHOTODYNAMIC THERAPY METHOD**

I.V. Berezovska, O.M. Bilash, N.N. Rozhytskii

The processes in photodynamic therapy using semiconductor nanomaterials, namely quantum dots as photosensitizers were considered. The spectral characteristics of semiconductor quantum dots (CdTe coated by TGA), as well as processes with participation of singlet oxygen the – active component of the method of photodynamic therapy were investigated. The information system to assess the effectiveness of the PS for photodynamic therapy method was received.

Keywords: chemical traps, photodynamic therapy, photosensitizer, singlet oxygen, quantum dots.