

Химические ловушки синглетного кислорода как метод исследования механизмов фотодинамической терапии

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

Харьковский национальный университет радиоэлектроники, пр. Ленина, 14, 61166 Харьков, Украина

(Получено 07.04.2013; опубликовано online 17.10.2013)

В работе рассматриваются процессы при фотодинамической терапии с использованием полупроводниковых наноматериалов, а именно квантовых точек в качестве фотосенсибилизаторов. Экспериментально исследованы спектральные характеристики полупроводниковых квантовых точек (CdTe с покрытием TGA), а также кинетика процессов с участием синглетного кислорода – активного компонента метода фотодинамической терапии.

Ключевые слова: Квантовые точки, Синглетный кислород, Фотодинамическая терапия, Фотосенсибилизатор, Химические ловушки.

PACS number: 82.39. – k

1. ВВЕДЕНИЕ

Исследования в области полупроводниковых наноматериалов, известных как квантовые точки (КТ), с каждым годом стремительно увеличиваются. Основной интерес исследований направлен на оптические свойства КТ, которые являются существенными для широкого ряда применений, а именно в фотодетекторных и светоизлучающих устройствах, фотовольтаике, биологии, в биологических сенсорах [1]. Весьма актуальным является использование КТ как материалов для терапии опухолевых заболеваний методом фотодинамической терапии (ФДТ), что является целью данной работы.

2. МЕТОД ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Среди основных методов терапии опухолевых заболеваний выделяют следующие: хирургия, лучевая терапия, химиотерапия, а также фотодинамическая терапия. Метод ФДТ еще не имеет столь большую распространенность, но его перспективность не оставляет сомнений. Традиционные методы терапии обладают рядом недостатков – негативное воздействие на окружающие опухоль ткани, в том числе из-за радиоактивного облучения тканей, различные системные осложнения после терапии. В сравнении с известными метод ФДТ является малоинвазивным и его можно совмещать с традиционными методами с целью повышения эффективности терапии.

Метод фотодинамической терапии основан на использовании фотосенсибилизатора (ФС), возбуждаемого светом соответствующей длины волны в присутствии кислорода. Фотосенсибилизатор селективно накапливается в опухолевых тканях. При возбуждении фотосенсибилизатора в системе проходят фотодинамические процессы. Возникающий при этом фотодинамический эффект может приводить к повреждению вирусов, простейших одноклеточных, вызывая дефекты мембран, нарушению обмена веществ [2].

В методе ФДТ процессы делятся на 2 типа. К первому типу можно отнести реакции, основанные на фотовосстановлении сенсибилизатора при помощи окисляющих агентов, с последующим образованием свободных радикалов, происходящем вследствие отрыва атома водорода или переноса электрона. Эти радика-

лы могут реагировать с молекулярным кислородом, продуктом реакций являются активные формы кислорода, такие, как супероксид-анион-радикал.

Механизм второго типа включает процессы, протекающие в методе ФДТ, он основан на резонансном переносе энергии между молекулярным кислородом и фотосенсибилизатором в триплетном состоянии с образованием синглетного кислорода.

Процесс ФДТ начинается с поглощения фотона фотосенсибилизатором, находящимся в синглетном основном состоянии S_0 , с переходом в первое возбужденное синглетное состояние S_1 (рис. 1). В результате интеркомбинационной конверсии фотосенсибилизатор переходит из возбужденного синглетного состояния в более долгоживущее триплетное (T_1) возбужденное состояние [3]. Из триплетного состояния ФС может возвращаться в первоначальное состояние в результате переноса энергии кислороду в триплетном состоянии (3O_2). Данный процесс приводит к переходу кислорода из триплетной в синглетную (1O_2) форму, что является деструктивным для опухолевых клеток. Кислород является составной частью и обязательным компонентом фотодинамической реакции. Образованный в результате фотодинамической реакции синглетный кислород является одним из главных составляющих терапевтического эффекта метода.

Использование традиционных ФС (органических красителей) в методе затрудняет его развитие и усовершенствование. Полупроводниковые квантовые точки обладают рядом преимуществ в сравнении с органическими красителями-сенсибилизаторами: узкий спектр излучения, зависящий от размеров наноматериала; широкий спектр поглощения; стойкость к фотообесцвечиванию; практически полное отсутствие проявлений токсических свойств. Эффективность применения новых фотосенсибилизаторов (КТ) в методе фотодинамической терапии можно обосновать с помощью исследований, связанных с детектированием генерации синглетного кислорода, а также спектральных свойств исследуемых фотосенсибилизаторов.

Для регистрации генерации синглетного кислорода используют разные методы – химический, люминесцентный и др. методы. [4]

В данной работе для регистрации генерации синглетного кислорода использовался метод химических ловушек в водных растворах.

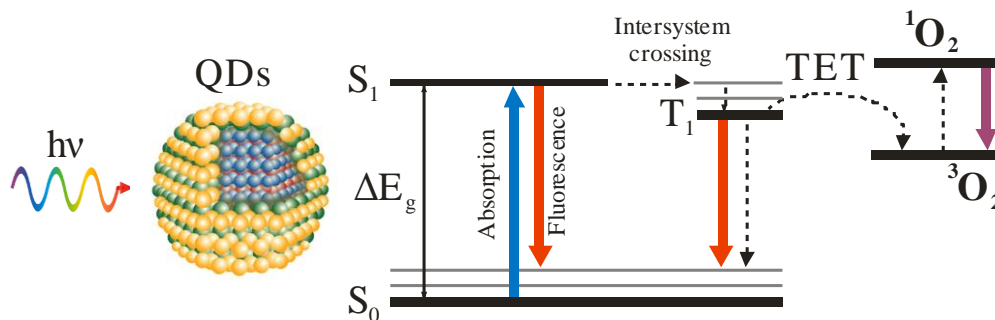


Рис. 1 – Схема фотодинамического процесса второго типа с генерацией синглетного кислорода. S_0 , S_1 , T_1 , – синглетное основное, возбужденное и триплетное состояния ФС, соответственно, 1O_2 , 3O_2 – синглетный и молекулярный кислород, соответственно, TET – триплет-триплетный перенос энергии, QDs – квантовые точки

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментальной части работы использовали р-нитрозодиметиланилин (RNO) фирмы Sigma Aldrich, бенгальский розовый, гистидин, бидистиллят, квантовые точки CdTe с покрытием тиогликолевая кислота (TGA). Для регистрации спектров поглощения, а также для исследования систем с синглетным кислородом использовали спектрофотометр Ocean Optics QE 65000.

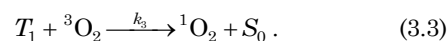
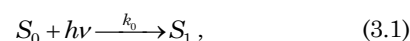
При выборе химической ловушки необходимо учитывать определенные критерии: ловушка должна быть специфичной по отношению к синглетному кислороду, в результате реакции не должно быть побочных компонентов, усложняющих реакцию, а так же ловушка не должна участвовать в процессе генерации синглетного кислорода.

Нашей задачей было определить, обусловлено ли обесцвечивание RNO результатом генерации синглетного кислорода и его взаимодействия с гистидином.

С этой целью проведено спектральное исследование раствора №1 50 мкМ RNO в фосфатном буфере. Как показано на рис. 2а, процесс обесцвечивания RNO не начинается в случае отсутствия ФС, на что указывает неизменность спектра поглощения раствора даже при длительном облучении лазером ($\lambda = 532$ нм). При этом не происходит генерация синглетного кислорода, следовательно, не образуются тарсанулярные перекиси, и как результат не происходит обесцвечивание RNO.

Дальнейшей задачей было зарегистрировать генерацию синглетного кислорода посредством регистрации спектра поглощения RNO методом, описанным ниже. В раствор (№2) 47 мкМ RNO в фосфатном буфере (pH 6.98) добавляли 10 мМ гистидина, как селективного акцептора синглетного кислорода, в качестве фотосенсибилизатора добавляли 9.83 мкМ бенгальского розового. Принцип метода химических ловушек для регистрации генерации синглетного кислорода заключается в следующем: образец раствора (гистидин, ФС, р-нитрозодиметиланилин) был помещен в кювету ($1 \times 1 \times 5$ см). ФС, находящийся в растворе, возбуждали лазерным излучением на длине волны 532 нм. После облучения, длительность которого варьировали, лазер выключаем, а спектр поглощения регистрировали спектрофотометром при облучении тестового раствора светом дейтериевой и галогеновой ламп. В результате лазерного облучения ФС переходит из возбужденное синглетного в

триплетное состояние, с последующей генерацией синглетного кислорода.



Гистидин, вступая в реакцию с синглетным кислородом, образует тарсанулярные перекиси, которые приводят к обесцвечиванию RNO на длине волны 440 нм. Обесцвечивание RNO регистрировалось по изменению спектра поглощения.

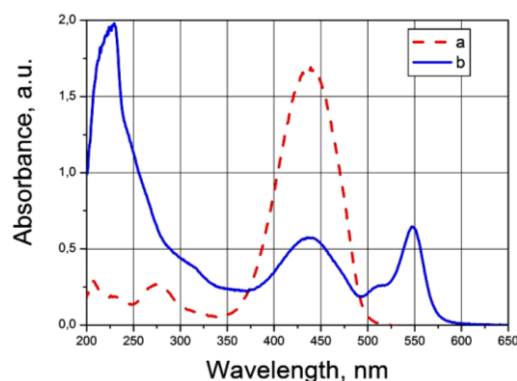
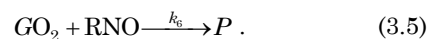
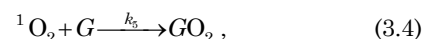


Рис. 2 – Спектр поглощения RNO после облучения лазером в течении 60 мин.: а – без ФС; б – с ФС

При облучении образца (раствор № 2) лазером в течении 30 минут (рис. 3) обесцвечивание RNO происходило медленно, вследствие чего была увеличена мощность лазерного излучения. Как видно из спектров поглощения (рис. 3, кривые 4-6) после увеличения мощности скорость обесцвечивания RNO возросла – количество синглетного кислорода увеличилось, т.е. образовалось больше тарсанулярных перекисей; также возросло расходование гистидина.

Для проведения подобных экспериментов с КТ были получены спектральные характеристики поглощения КТ типа CdTe (TGA). Спектры регистрировались для квантовых точек различного диаметра,

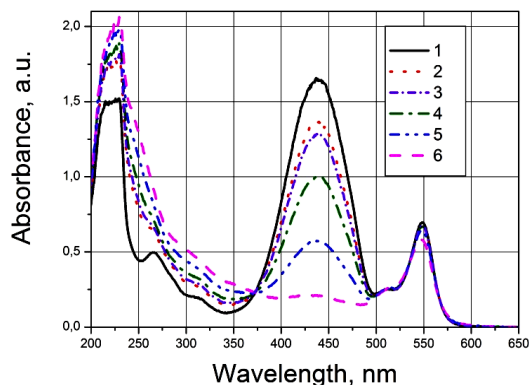


Рис. 3 – Обесцвечивание RNO, в результате генерации синглетного кислорода. 1 – до облучения лазером; 2 ÷ 6 – длительность облучения лазером 20, 30, 40, 60, 80 мин., соответственно

рис. 4, где видна зависимость длины волны поглощения от диаметра, что позволяет подбирать квантовые точки с необходимой длиной волны для проведения терапевтических либо диагностических манипуляций.

Использованный метод химических ловушек позволил зафиксировать генерацию синглетного кислорода при лазерном возбуждении. Это позволяет прийти к заключению об адекватности модельных экспериментов для выявления эффективности

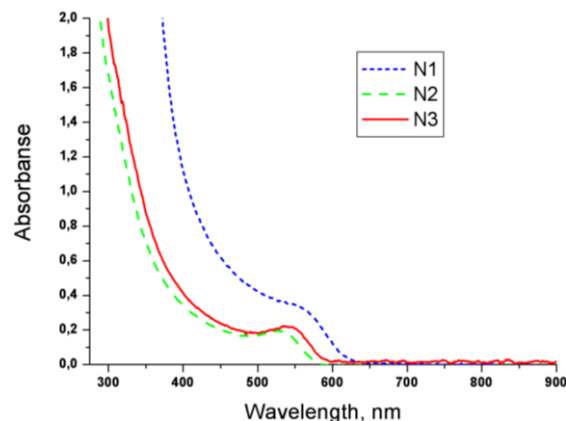


Рис. 4 – Спектры поглощения водного раствора КТ CdTe/TGA N1 – образец с $d = 3.21$ нм; N2 – образец с $d = 3.1$ нм; N3 – образец с $d = 3.2$ нм

использования полупроводниковых квантовых точек генерировать синглетный кислород в методе ФДТ.

Применение наноматериалов квантовых точек для фотодинамической терапии можно отнести к одному из перспективных направлений для исследований. С целью отработки процедур излечения онкозаболеваний.

Работа выполнена при поддержке проекта УНТЦ №5067 (руководитель – проф. Н.Н. Рожицкий).

Хімічні пастки синглетного кисню як метод дослідження механізмів фотодинамічної терапії

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

Харківський національний університет радіоелектроніки, пр. Леніна, 14, 61166 Харків, Україна

В роботі розглядаються процеси при фотодинамічній терапії з використанням напівпровідникових наноматеріалів, а саме квантових точок в якості фотосенсибілізаторів. Експериментально досліджені спектральні характеристики напівпровідникових квантових точок (CdTe з покриттям TGA), також досліджені процеси які дозволяють досліджувати синглетний кисень – активний компонент метода фотодинамічної терапії.

Ключові слова: Квантові точки, Синглетний кисень, Фотодинамічна терапія, Фотосенсибілізатор, Хімічні пастки.

Chemical Traps of Singlet Oxygen as Investigation Method of Mechanisms of Photo-Dynamic Therapy

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

Kharkiv National University of Radio Electronics, 14, Lenin Ave, 61166 Kharkiv, Ukraine

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 which is the active component of the method of photodynamic therapy, were investigated.

Keywords: Chemical traps, Photodynamic therapy, Photosensitizer, Singlet oxygen, Quantum dots.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pooock, Mo Imani, A.M. Seifalian, *Biomaterials* **28**, 4717 (2007).
2. Н.В. Шинкаренко, В.Б. Алесковський, *Успехи химии* **51**, 713 (1982) (N.V. Shinkarenko, V.B. Aleskovskii, *Russ. Chem. Rev.* **51** No5, 407 (1982)).
3. Buhong Li, Huiyun Lin, Defu Chen, Min Wang, Shusen Xie, *Chinese Opt. Lett.* **8**, 86 (2010).
4. Н.В. Шинкаренко, В.Б. Алесковський, *Успехи химии* **50**, 406 (1981) (N.V. Shinkarenko, V.B. Aleskovskii, *Russ. Chem. Rev.* **50** No3, 220 (1981)).