

DOI: <https://doi.org/10.30898/1684-1719.2025.11.38>

УДК: 577:61

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ И СТЕНДА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ИССЛЕДОВАНИЙ ДВУХФОТОННОЙ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОРФИРИНОВ

И.П. Шилов¹, Г.Л. Даниелян²

¹Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
Фрязинский филиал,
141190, Фрязино МО, пл. Введенского, 1

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 38

Статья поступила в редакцию 16 сентября 2025 г.

Аннотация. Представлены результаты разработки методики и малогабаритного стенда для экспресс-исследований двухфотонной люминесценции порфиринов. В состав стенда вошел полупроводниковый лазер на длине волны 810 нм для возбуждения двухфотонной люминесценции (ДФЛ) порфиринов в спектральном диапазоне 600-750 нм. При этом интенсивность световой волны в кювете с раствором порфирина (~1 мл) достигала значений 106 Вт/см². Для приема малого сигнала ДФЛ использовался малогабаритный миниспектрометр типа FSD-10 с максимальной чувствительностью в спектральном диапазоне 500-800 нм. Проведена апробация стенда при исследовании спектра ДФЛ 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX. Разработанный стенд обеспечивает проведение достаточно многочисленных экспресс-исследований ДФЛ образцов порфиринов чисто качественного порядка для оценки их применения в процессах биомедицинской фотоники. При этом осуществляются сравнительные оценки спектров ДФЛ порфиринов до и после проведения различных

модификаций их структуры, с целью выбора оптимального варианта для дальнейшего использования порфирина в различных задачах биомедицинской фотоники, включая фотодинамическую терапию и фотодиагностику.

Ключевые слова: 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирин IX, двухфотонное поглощение, фотодинамическая терапия, двухфотонная люминесцентная, фотодиагностика.

Финансирование: Работа выполнена в рамках госзадания ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН №FFWZ-2025-0013.

Автор для переписки: Шилов Игорь Петрович, laserlabi@ms.ire.rssi.ru

Введение

Большой интерес к соединениям порфиринового ряда обусловлен их принадлежностью к двум природным жизненно необходимым соединениям – гему и хлорофиллу, без которых невозможно существование и развитие фауны и флоры на Земле. Сравнительно недавно была обнаружена способность порфиринов накапливаться в злокачественных опухолях, что привело к использованию этих соединений для фотодинамической терапии (ФДТ) и фотодиагностики (ФД) рака.

Ранее было установлено, что одним из наиболее перспективных соединений для однофотонной ИК-люминесцентной фотодиагностики опухолей является дикалиевая соль Yb-комплекса 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (Yb-ДМДП IX), который также относится к группе производных гематопорфирина и обладает поэтому малой токсичностью [1]. В однофотонной ФДТ находит применение и безметалльный комплекс ДМДП IX, являющийся основной субстанцией для таких фотосенсибилизаторов как «Фотогем» (Россия) и «Фотофрин-II (США). Следует также отметить, что однофотонные ФДТ и ФД, как известно, могут применяться только к ограниченному числу заболеваний из-за лимитированной глубины проникновения света в биологические ткани. В силу этих причин увеличение глубины фотодинамического воздействия рассматривается как один из важнейших факторов увеличения эффективности данных методов в клинической практике. По этой причине применение

двухфотонного возбуждения представляет собой альтернативную возможность решения проблемы [2].

Двухфотонное поглощение (ДФП) – это нелинейно-оптическое явление, при котором два фотона поглощаются одновременно, так что разность энергий конечного и начального электронных состояний (энергия оптического перехода) равна сумме энергий поглощенных фотонов $E = h\nu_1 + h\nu_2$ (если оба фотона одинаковы, $E = 2h\nu_1$). При этом сечение двухфотонного перехода пропорционально интенсивности $\sigma_2 I$, а величина σ_2 носит название сечения двухфотонного поглощения. Известно, что для многих органических молекул типичные значения сечения ДФП $\sigma_2 \sim 10^{-48} - 10^{-52} \text{ см}^4 \times \text{сек} \times \text{фотон}^{-1}$. В честь пионерских теоретических работ Марии Гепперт-Майер, в которых была показана возможность одновременного поглощения нескольких фотонов, величина сечения ДФП, равная $1 \times 10^{-59} \text{ см}^4 \times \text{сек} \times \text{фотон}^{-1}$, получила название 1 Гепперт-Майер (1 ГМ). Из-за малости величины сечения ДФП однофотонные процессы, как правило, доминируют.

Существенной величины ДФП достигнет только при достаточно высоких значениях плотности мощности световой волны. Заметное ослабление падающего светового пучка после прохождения через среду, способную к ДФП, достигается при интенсивностях $10^6 - 10^8 \text{ Вт/см}^2$ [3]. Такое малое поглощение измерить прямыми методами трудно, поэтому чаще используются не прямые методы, которые обладают большей чувствительностью. Самый распространенный из них – люминесцентный метод, когда детектируется люминесценция молекулярной системы (флуоресценция либо фосфоресценция) при двухфотонном возбуждении. В этом случае для наблюдения двухфотонных процессов достаточны интенсивности $1 - 10^2 \text{ Вт/см}^2$ [3]. При этом следует отметить, что интенсивность ДФЛ пропорциональна σ_2 и квадрату интенсивности возбуждающего излучения. В настоящее время для исследования двухфотонной люминесценции, в том числе и порфиринов, используются устройства двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии [4], использующие фемтосекундный Ti-сапфировый лазер. Лазерный луч проходил через микроскоп

(фирмы «Карл Цейс»), и флуоресцентный сигнал от образца порфирина собирался объективом микроскопа и передавался далее на монохроматор [5]. С помощью таких оптических систем можно в дальнейшем рассчитывать значение сечения ДФП исследуемого порфирина. Это можно сделать путем сравнения интенсивности флуоресценции исследуемого порфирина и «Родамина-6-G» (R-6-G) при одинаковых условиях возбуждения. Поскольку σ_2 «Родамина» известна и равна 12 ГМ (на длине волны 1060 нм) можно по соответствующим уравнениям вычислить σ_2 изучаемого порфирина. Однако рассматриваемые двухфотонные люминесцентные микроскопы достаточно сложные, громоздкие и дорогие. При этом иногда требуется проведение достаточно многочисленных экспресс-исследований ДФЛ образцов порфиринов чисто качественного порядка для оценки их применения в процессах биомедицинской фотоники.

В связи с чем целью данной работы была разработка метода и макетного варианта стенда для экспресс-исследований ДФЛ порфиринов для использования их в процессах биомедицинской фотоники.

1. Материалы и методы

В качестве образца для исследования ДФЛ нами использовался 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирин IX (ДМДП), Это природный порфирин, использующийся в процессах однофотонной ФДТ. Синтез ДМДП проводили по схеме, описанной в работе [6]. Для разработки стенда необходимо было выбрать компактный и недорогой лазер для двухфотонного возбуждения. Известно, что полосы поглощения в спектрах ДФП порфиринов в видимой области спектра соответствуют полосам в спектрах однофотонного поглощения, хотя они несколько уширены и сдвинуты батохромно (рис. 1) [7]. Сплошной линией показаны однофотонные спектры поглощения, а пунктиром отмечены двухфотонные спектры поглощения.

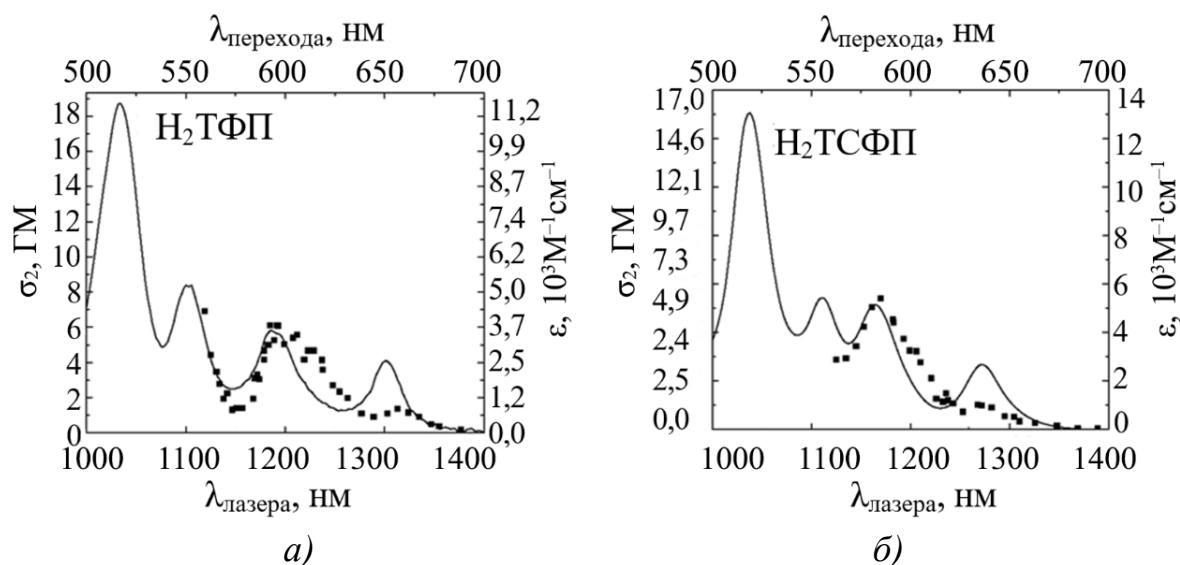


Рис. 1. Спектры двухфотонного поглощения (▪) мезо-тетраарилзамещенных порфиринов в видимой области: *а* – $H_2TФП$ (свободное основание тетрафенилпорфина), *б* – $H_2ТСФП$ (свободное основание тетрасульфопенилпорфина).

Характер же спектров ДФП порфиринов в ближней УФ-области несколько иной (рис. 2*а*). Полоса в спектре ДФП не имеет аналога в спектре однофотонного поглощения [7].

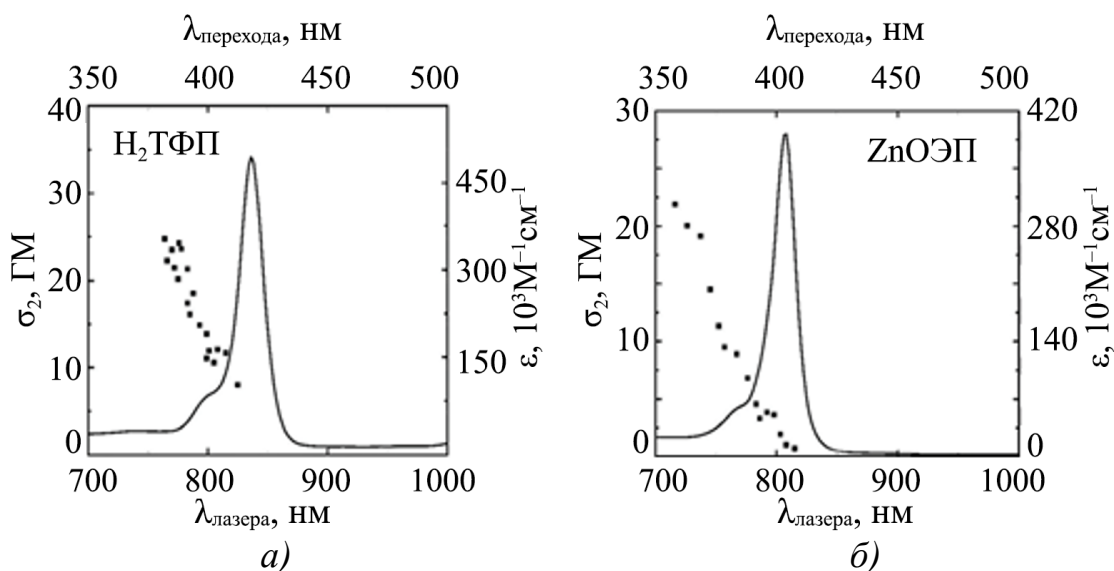


Рис. 2. Спектры двухфотонного поглощения (▪) в УФ-области:
а – $H_2TФП$ (свободное основание тетрафенилпорфина),
б – $H_2ТСФП$ (свободное основание тетрасульфопенилпорфина).
 σ_2 , ГМ ϵ , $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

И тем не менее при длине волны лазерного возбуждения в области 750-820 нм, где биоткань имеет окно прозрачности, наблюдается максимальное значение сечения ДФП порфиринов (рис. 2а). По этой причине нами в качестве источника лазерного возбуждения был выбран лазер на длине волны 810 нм. При этом ширина импульса лазерного возбуждения составляла от 10 мкс, частота посылок импульсов 10-100 Гц. Одним из основных элементов разрабатываемого стенда для проведения экспресс-исследований ДФЛ является мини-спектрометр типа FSD-10 [8]. Данный тип мини-спектрометра обладает малыми габаритами и оснащен высокоскоростным портом обмена информацией USB. В отличие от спектрометров ведущих западных фирм, в оптических схемах которых используется либо плоская решетка с коллимирующим и фокусирующим зеркалами, либо вогнутая решетка с искривленными не равноотстоящими штрихами, в настоящем приборе без потери качества спектрального изображения удалось ограничиться единственным простым в изготовлении оптическим элементом – вогнутой классической решеткой. Достоинством данной схемы является отсутствие меридиональной комы и составляющих aberrаций 2-го порядка по высоте щели.

В фокальной плоскости установлен оптический датчик с линейно расположенными светочувствительными элементами (пикселями).

Приемником спектрометра служит CCD-линейка, плоскость которой с целью минимизации дефокусировки наклонена на угол, равный углу падения лучей на дифракционную решетку $\alpha = \varphi$ (рис. 3). В сагиттальной плоскости входное волокно и CCD-линейка разнесены на расстояние $l = 10$ мм и развернуты таким образом, чтобы торец волокна и плоскости приемника были перпендикулярны главному лучу, проходящему через вершину решетки.

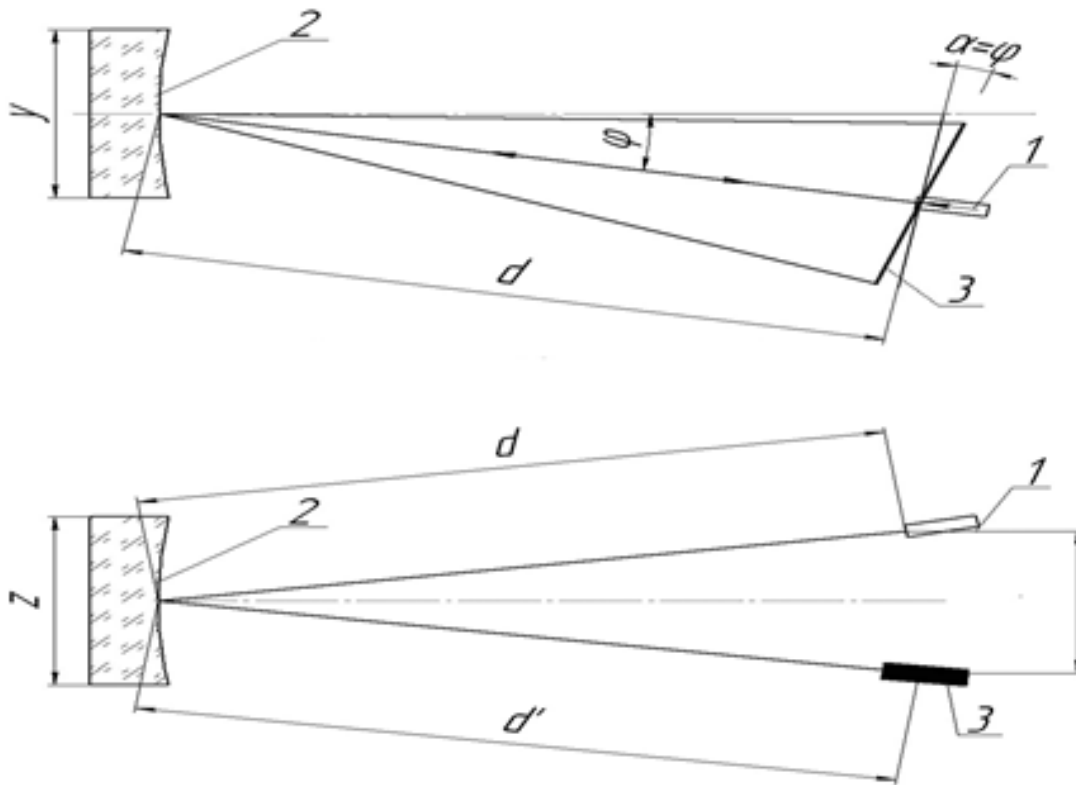


Рис. 3. Вид сечения сверху и сбоку выбранной оптической схемы мини спектрометра: 1 – входная щель (микрощель 0.04×0.3 на полированном торце волоконного световода), 2 – нарезная вогнутая ($R = d = 50$ мм) сферическая решетка, 3 – приемник спектрометра CCD-линейка с размером пикселей 0.008×0.2 мм, φ – угол положения центральной длины волны спектра, α – угол оптимального размещения плоскости CCD-линейки.

Параметры CCD-линейки следующие: TCD1304DJ (фирма «Toshiba»), с числом пикселей 3648, размер пикселя – 0.008×0.2 мм. Время экспозиции: 100 мкс – 10 с. Время преобразования АЦП: 5 мкс. Максимум спектральной чувствительности CCD-линейки Toshiba 1304DG приходится на диапазон 500-800 нм, что соответствует максимумам эмиссионных полос наиболее перспективных порфиринов для двухфотонной ФДТ рака.

2. Результаты и их обсуждение

Структурная схема разработанного стенда представлена на рис. 4.

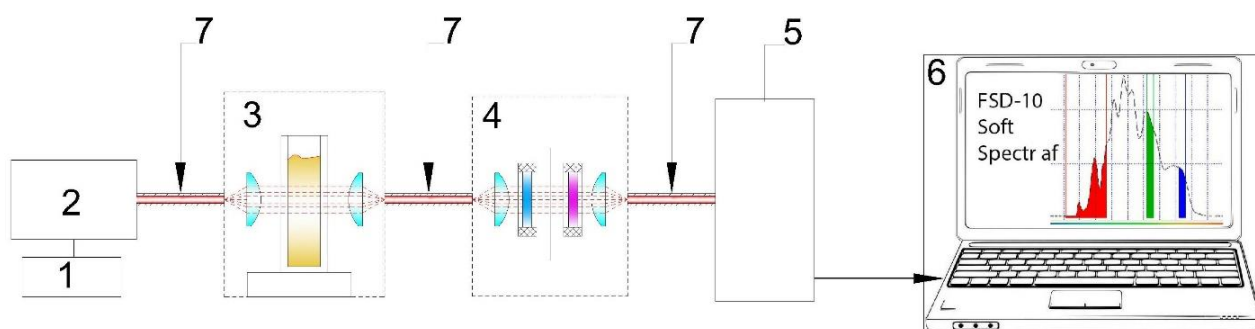


Рис. 4. Структурная схема стенда: 1 – драйвер управления импульсным режимом лазера; 2 – 810 нм-лазер для возбуждения ДФЛ; 3 – блок кюветы с фокусирующими линзами из оптического кварца и раствором исследуемого образца порфирина. Блок располагается на юстировочном столике (на рис. 4 не показан); 4 – рефокусатор с двойной системой селективных оптических фильтров; 5 – миниспектрометр типа FSD-10; 6 – ноутбук с разработанной программой обработки и сохранения спектров FSD Soft v.6.2; 7 – многомодовые волоконные световоды – оптические кабели со стандартными коннекторами.

Первичный прием малого сигнала люминесценции осуществляет рефокусатор (поз. 4, рис. 4), в корпусе которого размещены короткофокусные линзы, фокусирующие полезный сигнал люминесценции на торце световода 7, соединенного с оптическим входом миниспектрометра 5, а также специальные интерференционные полосовые фильтры, обеспечивающие выделение сигнала в спектральном диапазоне 600-750 нм. В данном спектральном диапазоне и возбуждается ДФЛ порфиринов.

Общий вид рефокусатора представлен на рис. 5. Как видно из рисунка, между линзами рефокусатора смонтированы две ячейки со сменными интерференционными фильтрами. Их оптическое пропускание в оптическом диапазоне 600-750 нм достигает значений вплоть до 80 %. При этом степень подавления возбуждающего излучения составляет около 10^{-6} %. Слева к корпусу рефокусатора через SMA-905-разъем крепятся подводящий люминесценцию световод 7.

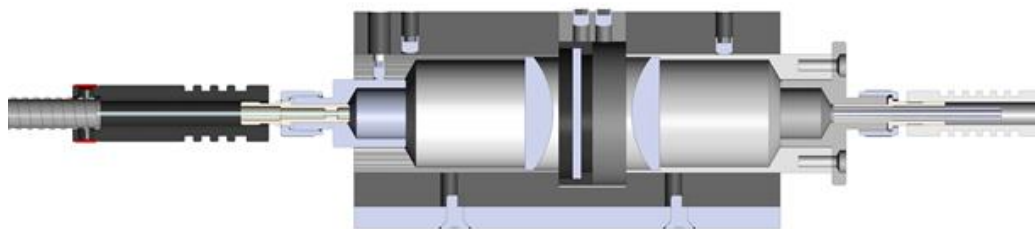
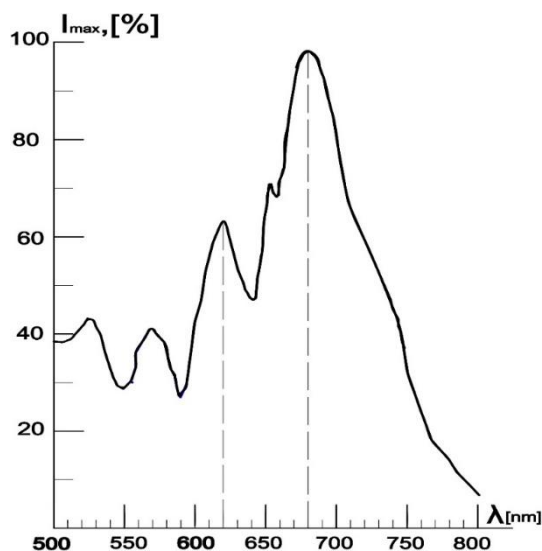


Рис. 5. Общий вид рефокусатора.

Малый сигнал ДФЛ после рефокусатора по гибкому световоду – волоконно-оптическому кабелю 7, попадает в миниспектрометр 5, и после его усиления и оцифровки спектр ДФЛ раствора ДМДП в диметилсульфоксиде (ДМСО) отображается на дисплее ноутбука 6. Спектр ДМДП (концентрация – 10^{-4} М) представлен на рис. 6.

Рис. 6. Спектр ДФЛ образца ДМДП в ДМСО (10^{-4} М).

Возбуждение 810 нм-лазером. Спектральная зависимость в кювете с раствором порфирина (~1 мл) – при плотности мощности возбуждающего излучения 10^6 Вт/см².

Из рис. 6 следует, что максимумы интенсивности ДФЛ изучаемого порфирина находятся в окрестности длин волн 620 нм и 680 нм. При этом интенсивность ДФЛ в полосе 680 нм существенно выше. Такой вид спектральной интенсивности ДМДП близок многим порфириновым соединениям, например таким, как протопорфирин IX.

Как отмечалось в [5], сечение ДФП производных гематопорфирина, к которым относится и ДМДП, сравнительно невелико. Для протопорфирина IX

и гематопорфирина IX сечение двухфотонного поглощения в области полосы Core (370-420 нм) не превышает нескольких ГМ [5]. В [7] отмечалось, что значения сечения двухфотонного поглощения должны превышать 100 ГМ, что было бы достаточно для широкого применения двухфотонного фотовозбуждения для ФДТ. Поэтому необходим поиск и синтез порфиринов с модифицированной структурой. С точки зрения структуры потенциальных фотосенсибилизаторов для двухфотонного возбуждения представляется перспективной модификация тетрапиррольного макроцикла путем присоединения одного или нескольких заместителей, которые сами обладают большим сечением двухфотонного поглощения [7]. В этом случае заместители работают как светособирающая антенна. Наиболее обещающим в этом направлении является синтез дендримерных систем, у которых ядром является тетрапиррольный макроцикл, а дендроны представляют собой молекулы с высоким сечением двухфотонного поглощения [9]. Внедрение порфирина в дендримерную оболочку и модификация боковых заместителей (дендронов) может решить проблему растворимости тетрапиррольного сенсибилизатора в водной среде и обеспечить его эффективный транспорт и накопление в опухолевых тканях.

Таким образом при поиске нужного состава порфирина качественная сравнительная оценка его спектров ДФЛ до и после проведения различных модификаций его структуры, может помочь в ее оптимизации для различных задач биомедицинской фотоники, включая ФДТ и ФД.

Заключение

1) Разработана новая версия малогабаритного стенда для экспресс-диагностики /определения уровня двухфотонной люминесценции порфиринов.

Стенд обеспечивает с малой погрешностью возбуждение ДФЛ порфиринов в спектральном диапазоне 600-750 нм и регистрацию данных в ПК. Ширина импульса лазерного излучения фиксировалась с экспозицией от 10 мкс, частота опроса спектров 10-100 Гц.

При этом интенсивность световой волны в кювете с раствором порфирина (~1 мл) достигала значений 10^6 Вт/см².

2) Для приема сигнала ДФЛ использовался малогабаритный миниспектрометр типа FSD-10 с максимальной чувствительностью в спектральном диапазоне 500-800 нм и оснащенный оптической системой рефокусаторов и многомодовых специальных световодов. Разработанный метод и макетный вариант малогабаритного стенда могут обеспечить проведение достаточно многочисленных экспресс-исследований ДФЛ образцов порфиринов чисто качественного порядка для оценки их применения в процессах биомедицинской фотоники. Стенд может быть востребован при поиске нужного состава порфирина путем сравнительной оценки его спектров ДФЛ до и после проведения различных модификаций его структуры, что может помочь в ее оптимизации для различных задач биомедицинской фотоники, включая ФДТ и ФД.

Финансирование: Работа выполнена в рамках госзадания ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН №FFWZ-2025-0013.

Литература

1. Ivanov A. V. et al. Luminescence diagnostics of malignant tumors in the IR spectral range using Yb-porphyrin metallocomplexes //Laser Physics. – 2010. – Т. 20. – №. 12. – С. 2056-2065. <https://doi.org/10.1134/s1054660x10220032>
2. Karotki A. et al. Efficient singlet oxygen generation upon two-photon excitation of new porphyrin with enhanced nonlinear absorption //IEEE Journal of selected topics in quantum electronics. – 2001. – Т. 7. – №. 6. – С. 971-975. <https://doi.org/10.1109/2944.983301>
3. Бредихин В. И., Галанин М. Д., Генкин В. Н. Двухфотонное поглощение и спектроскопия //Успехи физических наук. – 1973. – Т. 110. – №. 5. – С. 3-43. <https://doi.org/10.3367/UFNr.0110.197305a.0003>

4. Drobizhev M. et al. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins //Nature methods. – 2011. – Т. 8. – №. 5. – С. 393-399. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1596>
5. Goyan R. L., Cramb D. T. Near-Infrared Two-Photon Excitation of Protoporphyrin IX: Photodynamics and Photoproduct Generation //Photochemistry and Photobiology. – 2000. – Т. 72. – №. 6. – С. 821-827. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)0720821NITPEO2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720821NITPEO2.0.CO2)
6. Ивановская Н. П. и др. Композитные наночастицы на основе лексанполимерной матрицы, иттербиевых комплексов порфиринов и оксида железа для БИК-люминесцентной диагностики и тераностики новообразований //Российские нанотехнологии. – 2019. – Т. 14. – №. 5-6. – С. 82-90. <https://doi.org/10.21517/1992-7223-2019-5-6-82-90>
7. Kruk M. et al. Two-photon absorption of tetraphenylporphin free base //Journal of luminescence. – 2003. – Т. 105. – №. 1. – С. 45-55. [https://doi.org/10.1016/S0022-2313\(03\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(03)00096-6)
8. Шилов И. П. и др. Малогабаритное устройство для экспресс-исследований спектрально-люминесцентных свойств металлокомплексов порфиринов //Журнал радиоэлектроники. – 2019. – №. 7. – С. 10-10. <https://doi.org/10.30898/1684-1719.2019.7.4>
9. Dichtel W. R. et al. Singlet oxygen generation via two-photon excited FRET //Journal of the American Chemical Society. – 2004. – Т. 126. – №. 17. – С. 5380-5381. <https://doi.org/10.1021/ja031647x>

Для цитирования:

Шилов И.П., Даниелян Г.Л. Разработка методики и стенда для экспресс-исследований двухфотонной люминесценции порфиринов. // Журнал радиоэлектроники. – 2025. – №. 11. <https://doi.org/10.30898/1684-1719.2025.11.38>