

**СПЕКТРАЛЬНО-ОПТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ФОТОАКТИВНОСТИ ИТТЕРБИЕВОГО КОМПЛЕКСА 2,4-ДИ(А-
МЕТОКСИЭТИЛ)ДЕЙТЕРОПОРФИРИНА IX — ПЕРСПЕКТИВНОЙ
СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА В
БЛИЖНЕМ ИНФРАКРАСНОМ СПЕКТРАЛЬНОМ ДИАПАЗОНЕ**

И. П. Шилов¹, А. В. Иванов^{2,3}

¹ Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Фрязинский филиал, 141190, г. Фрязино Московской области, пл. акад. Введенского, 1

² НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, г. Москва, Каширское ш., 24

³ ГНЦ лазерной медицины им. О.К.Скобелкина ФМБА России, 121165, г. Москва, Студенческая ул., 40

Статья поступила в редакцию 10 сентября 2020 г.

Аннотация. Проведено изучение фотоактивности иттербиевого комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (Yb-ДМДП), перспективной субстанции для ИК-люминесцентной диагностики рака, обладающей повышенными спектрально-кинетическими характеристиками. Исследована динамика фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода для Yb-ДМДП IX и для безметальной формы комплекса при лазерном возбуждении на высокочувствительном лазерном флуориметре. Показано, что квантовый выход генерации синглетного кислорода для Yb-ДМДП (11%) значительно меньше, чем в случае его безметальной формы (40%), что экспериментально подтверждает его низкую фототоксичность. Повторно, низкая фотохимическая активность данного соединения была подтверждена МТТ-методом. Установлено, что соединение обладает малой фототоксичностью (IC₅₀ составила 10^{-5,5} моль/л). Таким образом, подтверждена низкая фотохимическая активность и фототоксичность Yb-ДМДП.

Ключевые слова: иттербиевый комплекс 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирин IX, фотоактивность, люминесценция,

синглетный кислород, квантовый выход, лазерный флуориметр, фототоксичность.

Abstract. The spectral optical study of photoactivity of ytterbium complex of 2,4-di(α -methoxyethyl)deuteroporphyrin IX (Yb-DMDP), perspective substance for IR-luminescent cancer diagnostics with enhanced spectral-kinetic characteristics, is carried out. The dynamics of singlet oxygen photosensitized formation for the Yb-DMDP and for the metal-free porphyrin under laser excitation using a highly sensitive laser fluorimeter, is studied. It was shown that quantum yield of a singlet oxygen generation for Yb-DMDP (11%) is significantly less than for the metal-free porphyrin (40%). This fact experimentally confirms a Yb-DMDP low photoactivity. Secondly, the Yb-DMDP low photoactivity was confirmed by the MTT-method. It was established that Yb-DMDP possesses low cytophototoxic properties (IC_{50} value $\sim 10^{-5,5}$ M/L). Thus, Yb-DMDP low photochemical activity and phototoxicity are proved.

Key words: ytterbium complex of 2,4-di(α -methoxyethyl)deuteroporphyrin IX, photoactivity, luminescence, singlet oxygen, quantum yield, laser fluorimeter, phototoxicity.

Введение

Известно, что свободные основания порфиринов обладают заметной фотохимической активностью и вызванной этим фактом повышенной фототоксичностью соединений. Фотосенсибилизаторы (ФС) типа «Фотодитазин», «Аласенс», которые активно используются при фотодинамической терапии опухолей, в случае использования их для токсичных концентраций синглетного кислорода. При этом в случае проведения только процедуры люминесцентной диагностики (ЛД) повреждаются как патологически измененные ткани, так и здоровые. Для снижения нежелательных побочных реакций биотканей при люминесцентной диагностике опухолей требуются препараты с крайне малым квантовым выходом генерации синглетного кислорода. В связи с чем изучение динамики

свечения в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне спектра лекарственных препаратов-сенсibilизаторов для фотодинамической терапии и фотодиагностики, образующих при освещении синглетный кислород $^1\text{O}_2$, стало особенно актуальным.

В последнее время появился ряд работ [1–2], в которых для различных биомедицинских применений, включая диагностику новообразований, предлагаются ФС на основе некоторых лантанидных комплексов порфиринов (ЛКП), которые люминесцируют в ближней ИК-области спектра (БИК-люминесценция). К ним относятся комплексы порфиринов на основе Yb, Ho, Er и Nd. Для достижения повышенной эмиссии лантанидных ионов требуется эффективный энергетический переход между антенной, роль которой исполняет порфириновый лиганд, и эммитером (ионы лантанидов). Энергетический зазор между отдающим энергию уровнем антенны и принимающим энергию уровнем иона лантанида в идеале должен составлять $1000\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ [3]. ЛКП почти идеально подходят под эти требования. К тому же они обладают повышенным коэффициентом экстинкции в видимом и УФ-спектральном диапазонах.

Следует отметить, что БИК-область спектра (800–1400 нм), с так называемым «окном прозрачности биотканей», является весьма перспективным спектральным диапазоном для ЛД рака [4–7]. В этом диапазоне практически отсутствует фоновая люминесценция биотканей из-за наличия в них эндогенных порфиринов. Иттербиевые комплексы порфиринов (ИКП) являются главными кандидатами для работы в БИК-области спектра. Эти соединения характеризуются люминесцентным сигналом повышенной интенсивности в БИК-области спектра, обладают высоким коэффициентом экстинкции ($1,5 \times 10^5\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$) и повышенным временем жизни люминесценции [8].

Ранее было показано [4], что введение иона иттербия в центр порфириновой матрицы, как следует из теоретических построений, должно приводить к резкому снижению фотохимической активности, сохраняя при

этом свойственную большинству порфиринов тропность к злокачественным опухолям. Это связано с тем, что люминесцентный уровень иона Yb^{3+} лежит несколько ниже триплетного уровня органической части молекулы, но выше, чем у синглетного кислорода.

В итоге возбуждение порфириновой матрицы под влиянием внешнего светового излучения передается не на кислород, а перехватывается ионом Yb^{3+} , тем самым резко снижая сенсibilизированную порфирином генерацию синглетного кислорода. При этом наблюдается люминесценция, обусловленная переходами 4f-электронов иона Yb^{3+} : ${}^2\text{F}_{5/2} \rightarrow {}^4\text{F}_{7/2}$.

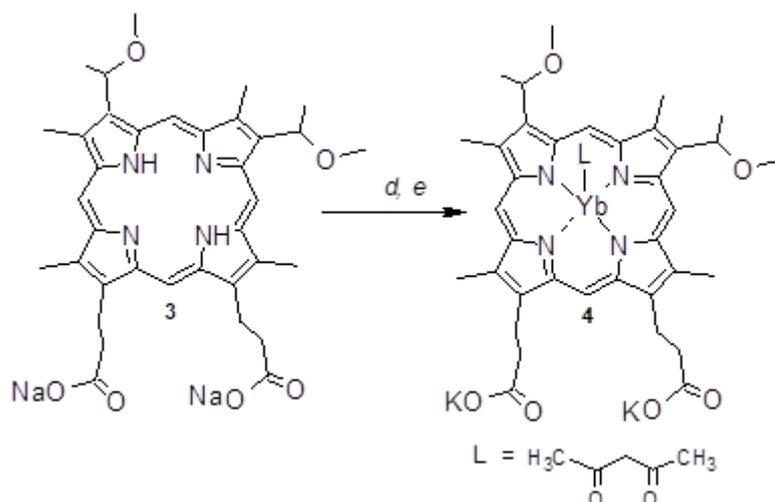
Целью настоящей работы являлось экспериментальное подтверждение низкой фотохимической активности и фототоксичности ИКП, перспективных субстанций для люминесцентной диагностики и нанотераностики опухолей.

1. Материалы и методы

В качестве объекта для исследований был выбран иттербиевый комплекс 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX (дикалиевая соль) (Yb -ДМДП), который, как показали проведенные исследования, обладает повышенными спектрально-кинетическими характеристиками. Синтез дикалиевой соли Yb -ДМДП включал три основные стадии. В качестве исходного соединения был выбран гемин, который выделяют из крови крупного рогатого скота [9, 10].

На первом этапе проводили деме­таллирование гемина действием 33%-ного ($\rho = 1,42 \text{ г/см}^3$) раствора бромистого водорода в уксусной кислоте. Затем реакционную массу обрабатывали метанолом и получали тетраметил­овый эфир гематопорфирина IX. Заключительная стадия процесса состоит во введении иона иттербия в порфириновый макроцикл (рис. 1).

Спектрально-кинетические характеристики Yb -ДМДП получали с помощью разработанного в ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН измерительного стробоскопического стенда с возбуждением в видимом диапазоне спектра [5]. Источником излучения служил импульсный лазер LS-2132 фирмы Lotis-Tii на кристалле алюмоиттриевого граната с ионами неодима с длиной волны излучения 532 нм.



(d) $\text{Yb}(\text{acac})_3/1,2,4$ -трихлорбензол, (e) K_2CO_3 , KOH , $L = \text{acac}$

Рис. 1. Схема синтеза дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирина IX.

Динамика фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода в Yb-ДМДП и в безметальной субстанции исследовалась при лазерном возбуждении на высокочувствительном лазерном флуориметре разработки Института Физики им. Степанова (НАН, Республика Беларусь) [11, 12]. Данный флуориметр для изучения кинетики люминесценции работает в диапазоне 950–1400 нм с временным разрешением 1 нс. В качестве детекторов излучения применялись ФЭУ с полупроводниковыми InP/InGaAsP-фотокатодами (фирма Hamamatsu). Длина волны возбуждения составила 531 нм (Nd:LSB-лазер STA-01SH, STAND A Ltd.), детектирования — 1270 нм. Энергия лазерных импульсов — 1 мДж/имп. Флуориметр позволяет измерять сигналы люминесценции $^1\text{O}_2$ с квантовым выходом до 6×10^{-9} . Фотохимическая активность Yb-ДМДП подтверждалась следующим образом. Методом МТТ были проведены эксперименты по оценке цито- и фоточитотоксичности ИКДДП на культурах карциномы яичника человека Skov-3. В качестве источника излучения при исследовании фотоактивности Yb-ДМДП использовали непрерывный лазер 405 нм мощностью 400 мВт. При этом экспозиционная доза составляла 12 Дж/см².

Имеются следующие особенности МТТ-метода при определении IC_{50} (концентрации препарата, вызывающей 50% гибель клеток) в режиме *in vitro*:

1. Культуры клеток рассеиваются в 96-луночные планшеты. Плотность посева зависит от пролиферативной активности и в среднем составляет 105/мл (20 000 клеток на лунку).

2. Через 24 часа после посева вносятся дозы цитостатиков, антибиотиков или других токсичных агентов. Для построения графика определения IC_{50} вносят 6–8 различных концентраций.

3. Через 48–72–96 часов вносят реагент для регистрации дегидрогеназной активности ферментов выживших клеток по образованию сине-фиолетовых кристаллов фармазана — 3-(4,5-диметилтиазолил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ реагент) из расчета концентрации 0,5 мг/мл (или 10 мл из stock раствора 5 мг/мл на лунку). Отбирают культуральную среду, не повреждая монослой клеток. Для суспензионных культур предварительно центрифугируют планшеты 10 мин на 800–1000 об/мин на центрифуге с адаптором для плашек.

4. Лизируют клетки в 60 мл диметилсульфоксида (ДМСО) на лунку и снимают показатели оптической плотности на планшетном ридере (Multiscan).

5. Производят расчет процента гибели клеток по формуле: $X = (OD_{\text{sample}}/OD_{\text{control}}) * 100\%$, где OD — оптическая плотность, и выполняют построение графика зависимости процента гибели клеток (ось Y) от концентрации цитостатика-цитотоксика (ось X).

2. Результаты и их обсуждение

Спектральные характеристики люминесценции демонстрируют, что ИКП обладают характерной для редкоземельных ионов узкой и достаточно яркой полосой люминесценции, которая для Yb^{+3} находится в ИК диапазоне 975–985 нм, где собственная люминесценция биотканей практически отсутствует. Сама порфириновая матрица эмитирует флуоресценцию с пиком на длине волны 630 нм.

На рис. 2 приведен спектр люминесценции Yb -ДМДП, из анализа которого следует, что большая часть энергии возбуждения идет на флуоресценцию.

Расчетный квантовый выход люминесценции Φ_{tot} ионов иттербия в Yb-ДМДП составил $\sim 0,9\%$. Было также установлено, что среднее время жизни для синтезированных нами иттербиевых комплексов (в ДМСО) составляет 5–10 мкс, что существенно больше времени жизни неодимовых комплексов порфиринов (0,72–1,34 мкс).

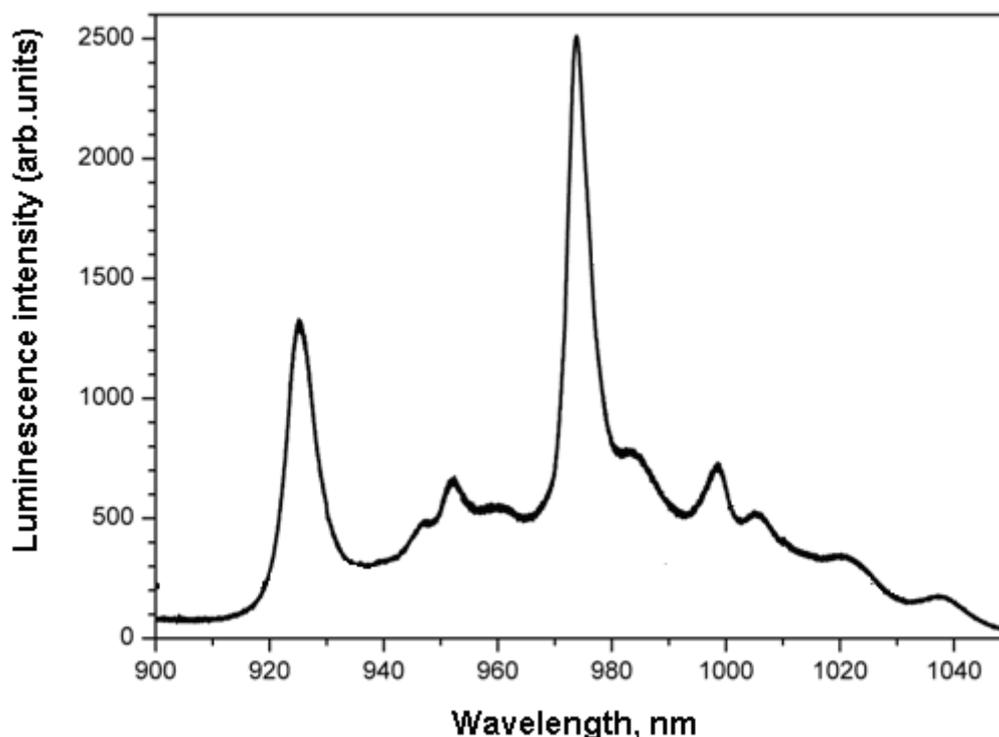


Рис. 2. Спектр люминесценции Yb-2,4-ди(α -метоксиэтил)дейтеропорфирин IX (водный раствор, концентрация 10^{-4} М).

С целью экспериментального подтверждения низкой фотоактивности Yb-ДМДП нами была исследована динамика фотосенсибилизированного образования синглетного кислорода в Yb-ДМДП и в безметалльной субстанции при лазерном возбуждении на высокочувствительном лазерном флуориметре. Электронный переход из нижнего возбужденного синглетного состояния в основное триплетное $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$, соответствующий люминесценции кислорода на длине волны 1270 нм, имеет строгий запрет по спину, четности и орбитальному угловому моменту, поэтому радиационное время жизни $^1\text{O}_2$ в жидкостях достигает нескольких секунд [11]. Однако измеряемое время жизни $^1\text{O}_2$ определяется не столько скоростью излучательной дезактивации, сколько

тушением $^1\Delta_g$ -состояния молекулами среды и, как следствие, может изменяться в очень широких пределах.

Изучение кинетических сигналов фотосенсибилизированной люминесценции синглетного кислорода в водных растворах исследуемого соединения показало, что квантовый выход генерации синглетного кислорода с 40% для безметальной формы порфиринового комплекса снижается почти в 4 раза (до 11%) для Yb-ДМДП, что экспериментально подтверждает его низкую фототоксичность (рис. 3).

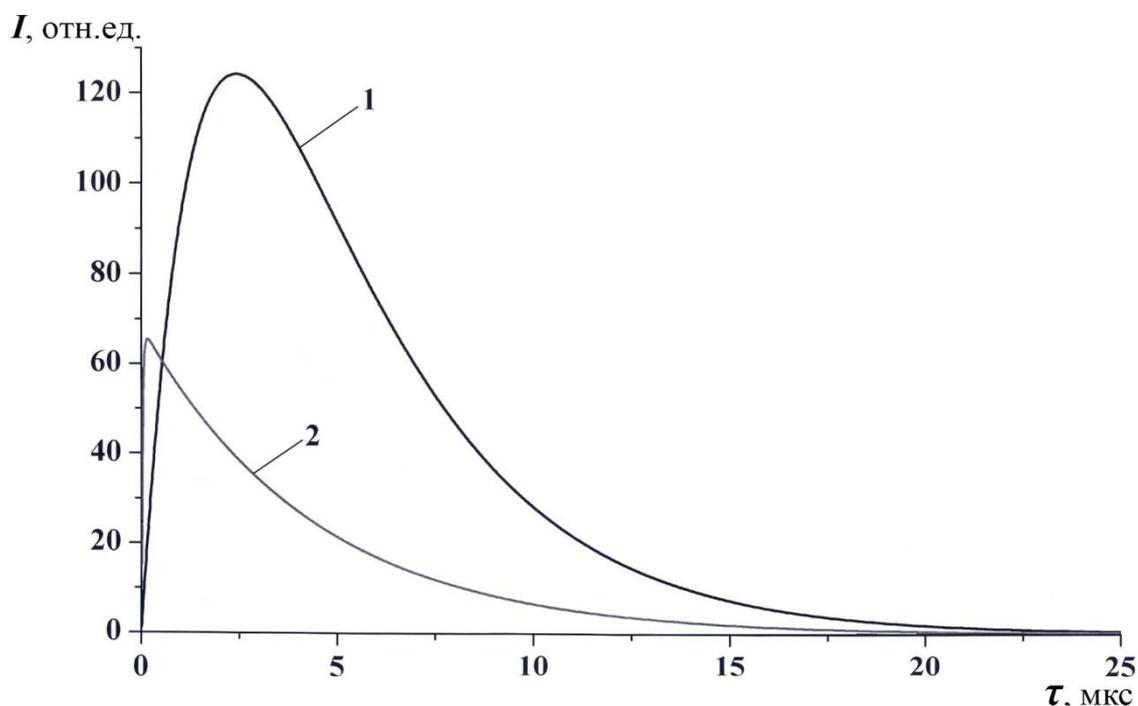


Рис. 3. Кинетические сигналы фотосенсибилизированной люминесценции синглетного кислорода в водных растворах безметальной формы (1) и Yb-ДМДП (2).

Квантовый выход генерации синглетного кислорода исследуемых образцов определялся относительным методом. В качестве эталона использовался хлорин еб в буферном растворе при рН ~ 8,5, для которого квантовый выход составляет 0,18 [12]. Показано, что квантовый выход генерации синглетного кислорода составил: для безметальной формы комплекса — 44%, для Yb-ДМДП — 11%. Для хлоринов эта величина составляет 40–70%. Поскольку других механизмов фототоксичности ИКП,

кроме генерации активных форм кислорода, не наблюдается, можно утверждать о низкой фотохимической активности Yb-ДМДП. Остаточная фототоксичность обусловлена спектрально доказанным присутствием в Yb-ДМДП свободных оснований порфирина, избавиться от которых при синтезе иттербиевых комплексов технологически невозможно. Данные высокоэффективной жидкостной хроматографии это убедительно подтверждают [9]. Было показано, что самого Yb-ДМДП в соединении содержится до 90% (89,38%), а остальное приходится на свободное основание порфиринового комплекса и сопутствующие примеси.

Для сравнения низкая фотохимическая активность ИКП подтверждалась следующим образом. Методом МТТ были проведены эксперименты по оценке цито- и фотоцитотоксичности на культурах карциномы яичника человека Skov-3. Методом МТТ было также проведено сравнительное исследование фотоактивности Yb-ДМДП с широко используемым в клинической практике отечественным препаратом хлоринового ряда «Фотодитазин».

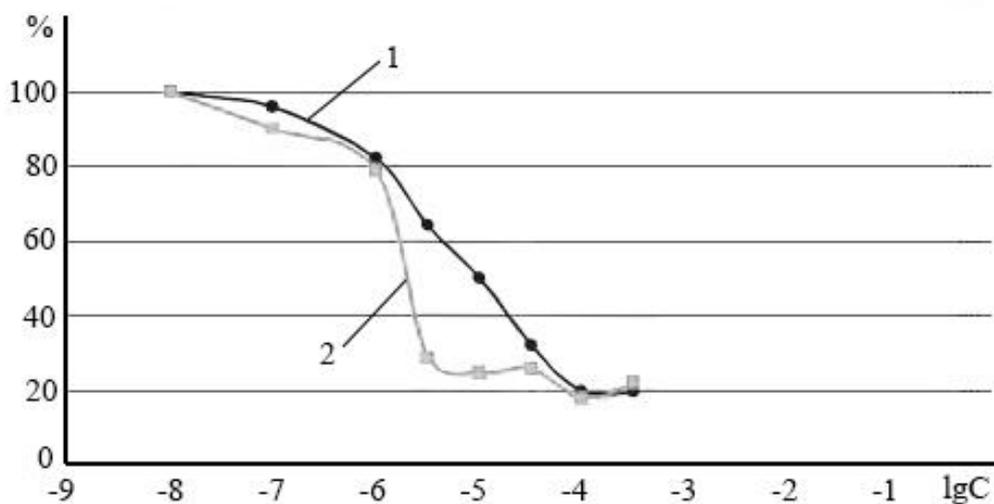


Рис. 4. Определение доз темновой (1) и общей токсичности (2) Yb-ДМДП на клетках Skov-3 (ось ординат — выживаемость, %, ось абсцисс — логарифм концентрации C).

Для вторичного экспериментального подтверждения низкой фотохимической активности ИКП МТТ-методом были определены параметры

общей токсичности (темновой) и фототоксичности Yb-ДМДП. Для темновой токсичности IC_{50} составляла $10^{-5,15}$ моль/л для клеток Skov-3 (рис. 4).

Как следует из рис. 4, данный ИКП после фотовозбуждения становится более токсичным. Но проявляется лишь незначительный вклад фототоксичности в общую токсичность, что свидетельствует о малой фототоксичности соединения (общая IC_{50} составила $10^{-5,5}$ моль/л). Следовательно, соединение обладает умеренной темновой токсичностью и незначительной фотоактивностью. Таким образом, экспериментально подтверждается постулат, утверждающий, что путем введения в порфирины «перехватчиков» возбуждения синглетного кислорода в виде ионов иттербия, можно резко снизить фотоактивность порфириновых комплексов.

Методом МТТ было проведено также сравнительное исследование фотоактивности Yb-ДМДП с широко используемым в клинической практике отечественным препаратом хлоринового ряда «Фотодитазин». Показано (рис. 5), что для «Фотодитазина» 50%-ная гибель клеток наступает при концентрации $IC_{50} \sim 10^{-6,3}$ моль/л, что почти на порядок величины меньше, чем для ИКП.

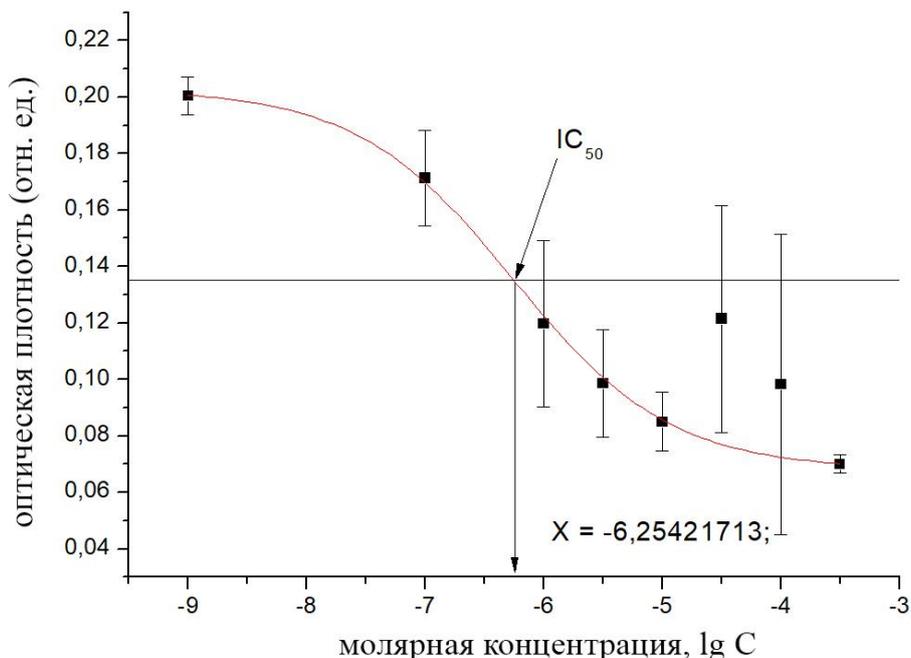


Рис. 5. Фототоксичность «Фотодитазина» на клетках Skov-3.

Таким образом, фотоактивность Yb-ДМДП в среднем почти на порядок величины меньше, чем у препарата хлоринового ряда типа «Фотодитазин».

Заключение

Экспериментально подтверждена низкая фотохимическая активность и фототоксичность Yb-ДМДП. Показано, что введение в порфирины «перехватчиков» возбуждения синглетного кислорода в виде ионов иттербия резко снижает фотоактивность порфириновых комплексов, что позволяет рекомендовать их для внедрения в клиническую практику при диагностике визуально и эндоскопически доступных локализаций злокачественных новообразований.

Благодарности

Выражаем благодарность сотрудникам Института Физики им. Степанова НАН, Республика Беларусь, Джагарову Б. М. и Сташевскому А. С. за проведение совместных работ по изучению кинетических сигналов фотосенсибилизированной люминесценции синглетного кислорода. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0030 – 2919 – 0009.

Литература

1. Comby S., Bunzli J. Lanthanide near-infrared luminescence in molecular probes and devices // Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths. Elsevier Science. Amsterdam. 2007. P.217.
2. Bulach V., Sguerra F., Hosseini M.W. Porphyrin lanthanide complexes for NIR emission // Coordination Chemistry Review. 2012. Vol.256. P.1468-78.
3. Armelao L., Quici S., Barigelletti F. et al. Design of luminescent lanthanide complexes: From molecules to highly efficient photo-emitting materials // Coordination Chemistry Review. 2010. V.254. P.487-498.
4. Ivanov A.V., Rumyantseva V.D., Shchamkhalov K.S., Shilov I. P. Luminescence diagnostics of malignant tumors in the IR spectral range using Yb-porphyrin metallocomplexes // Laser Phys. 2010. Vol.20. No.11. P.2056-2065.

5. Ivanov A.V., Rummyantseva V.D., Shilov I.P. et al. Low toxic ytterbium complexes of 2,4-dimethoxyhematoporphyrin IX for the luminescence diagnostics of tumors // *Photonics & Lasers in Medicine*. 2013. Vol.2. No.3. P.175-187.
6. Lanthanide Luminescence. Photophysical Analytical and Biological Aspects. Springer, Heidelberg. Eds. Hanninen P. and Hanna H. 2011. P.1-388.
7. Chen Y., Gryshuk A., Achilefu S. et al. A novel approach to a bifunctional photosensitizer for tumor imaging and phototherapy // *Bioconjugate Chem*. 2005. Vol.16. P.1264-1274.
8. Stasheuski A.S., Knyukshto V.N., Ivanov A.V. et al. Luminescence properties of Yb-2,4-dimethoxyhematoporphyrin IX, a promising compound for diagnosis of malignant tumors // *J Applied Spectroscopy*. 2015. Vol. 81. P.938-943.
9. Щелкунова А.Е., Болтухина Е.В., Румянцева В.Д. и др. Разработка синтеза дикалиевой соли иттербиевого комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX // *Макрогетероциклы*. 2019. Т.12. №4. С.366-372.
10. Mironov A.F. Porphyrin complexes with lanthanides // *Russ. Chem. Rev.* 2013. Vol.82. P.333-351.
11. Галиевский В.А., Киселев В.В., Шабусов А.И. и др. Лазерный флуориметр с наносекундным разрешением для ближнего И.К.-диапазона // *Приборы и техника эксперимента*. 2010. №4. С.109-116.
12. Пархоц М.В., Кнюкшто В.Н., Исаков Г.А. и др. Спектрально-люминесцентные исследования фотосенсибилизаторы «Фотолон» в модельных средах и крови онкологических больных // *Журн. прикл. спектр.* 2003. Т.70. №6. С.816-821.

Для цитирования:

Шилов И.П., Иванов А.В. Спектрально-оптические исследования фотоактивности иттербиевого комплекса 2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирина IX — перспективной субстанции для люминесцентной диагностики рака в ближнем инфракрасном спектральном диапазоне. Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]. 2020. №9. <https://doi.org/10.30898/1684-1719.2020.9.9>