

# Лазерно-спектроскопический метод оценки эффективности фотосенсибилизаторов в биологических средах

А.В.Рябова, А.А.Стратонников, В.Б.Лощенов

*Представлен быстрый и высокоинформативный метод оценки фотодинамической активности фотосенсибилизаторов. Метод позволяет определять скорость фоторазрушений в биологических средах, содержащих эритроциты, в приближенных к *in vivo* условиях, оценивать степень необратимого связывания растворенного в среде кислорода во время лазерного облучения в присутствии фотосенсибилизаторов, а также определять характер деструкции фотосенсибилизаторов под действием света (фотоблицинг).*

**Ключевые слова:** лазер, спектроскопия, фотосенсибилизаторы, оксигенация, синглетный кислород, фотоблицинг.

## 1. Введение

Основным механизмом разрушающего действия фотосенсибилизаторов (ФС), применяемых для фотодинамической терапии, является генерация синглетного кислорода [1]. В настоящее время для оценки эффективности ФС применяются несколько различных методов. Их можно разделить на две группы. С помощью методов первой группы (используются культуры живых клеток в среде, приближенной к физиологическим условиям), оценивают фототоксичность препаратов [2], места их внутриклеточного накопления [3], измеряют квантовый выход генерации синглетного кислорода [4]. Вторая группа методов служит для изучения свойств биологических элементов – биологических жидкостей, мембран эритроцитов или суспензий эритроцитов.

Методы первой группы позволяют оценить фотодинамический эффект на клеточном уровне, однако условия проведения фотодинамической процедуры далеки от клинических. Так, например, монослой клеточной культуры легко облучить равномерно, но во время клинических процедур важную роль играют рассеяние и поглощение лазерного света в толще ткани, вследствие чего используют неоправданно завышенные или заниженные уровни интенсивности лазерного излучения. При внутривенном введении ФС связываются не только с теми клетками, на которые должно быть направлено их разрушающее воздействие, но и со стенками сосудов, с мембранами эритроцитов, белками плазмы крови [3, 5, 6]. При этом от микроокружения ФС зависит, с какой эффективностью и какими молекулами будет потушен синглетный кислород [7]. Поэтому необходимо учитывать суммарный ответ всей биологической системы, а не только клеток одного вида.

Во второй группе следует выделить методы, основан-

ные на изучении изменения физических свойств мембран эритроцитов в результате фотодинамического воздействия [8, 9], которые позволяют оценить дозу лазерного облучения и концентрацию ФС, критические для наступления фотогемолиза эритроцитов. Также важным является измерение времени жизни и скорости тушения синглетного кислорода при фотодинамическом воздействии в разных средах для оценки возможного окислительного эффекта в биологической ткани [10–13] и для определения количества мест и эффективности связывания ФС с белками и мембранами клеток тканей [14, 15].

Тем не менее, несмотря на многосторонние исследования, сложно спрогнозировать, насколько успешным будет применение ФС в клинических испытаниях, непосредственно не проверив его на моделях опухолей *in vivo*. Поэтому целью нашей работы было создание высокоинформативного и быстрого метода оценки фотодинамической активности и свойств ФС, позволяющего максимально точно предсказывать целесообразность клинического использования фотосенсибилизаторов.

## 2. Принципы работы лазерно-спектроскопического метода оценки эффективности фотосенсибилизаторов в биологических средах

Разработанный нами метод оценки фотодинамической активности ФС основан на одновременной регистрации спектров поглощения гемоглобина, рассеянного назад лазерного излучения и флуоресценции ФС в режиме непрерывного мониторинга во время лазерного облучения.

Для регистрации спектров поглощения и флуоресценции исследуемых образцов мы использовали волоконно-оптический спектрометр ЛЭСА-01 («Биоспек») (спектральное разрешение 8 нм для  $\lambda = 600$  нм при ширине входной щели 200 мкм). Схема экспериментальной установки приведена на рис. 1. В качестве источника света для возбуждения ФС использовался полупроводниковый лазерный источник с длиной волны 680 нм и максимальной мощностью 2 Вт («Биоспек»), что позволяло создавать плотности мощности на образце вплоть до 1.5 Вт/см<sup>2</sup>.

А.В.Рябова, А.А.Стратонников, В.Б.Лощенов. Центр естественно-научных исследований Института общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail:Nastya\_R\_V@rambler.ru

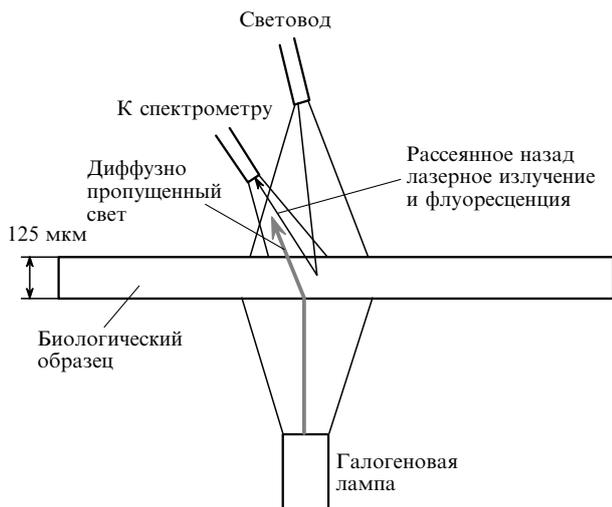


Рис.1. Схема экспериментальной установки для измерения фотохимической эффективности ФС.

Излучение лазерного источника доставлялось к образцу с помощью кварцевого волокна, выходной конец которого фиксировался на расстоянии 1.7 см от образца под небольшим углом к нормали. Неоднородность облучения поверхности образца не превышала 10%. Одновременно образец освещался с обратной стороны светом галогеновой лампы невысокой мощности, прошедшим через широкополосный фильтр, пропускающий излучение в диапазоне длин волн 450–630 нм. После прохождения через образец диффузно рассеянное излучение галогеновой лампы вместе с обратным рассеянным лазерным и флуоресцентным излучениями собиралось принимающим кварцевым волокном. Это волокно с сердцевинной диаметром 200 мкм размещалось под углом  $30^\circ$  к нормали образца на расстоянии 7 мм от его поверхности. Волокно принимало излучение с кругового участка поверхности диаметром 3 мм, расположенного в центре пятна лазерного излучения. Принимающее волокно передавало излучение на щель спектрометра. Специальный узкополосный фильтр ослаблял обратное рассеянное лазерное излучение на длине волны 680 нм. Комбинация фильтров позволяла одновременно фиксировать диффузно прошедший свет в области 450–630 нм, обратное рассеянное лазерное излучение с длиной волны 680 нм и индуцированную лазером флуоресценцию в области 690–850 нм.

Следует отметить, что использование источника белого света одновременно с лазерным источником не вносило вклада в сигнал флуоресценции, возбуждаемой лазером. Это было обусловлено тем, что, во-первых, перед источником белого света стоял блокирующий фильтр, имеющий коэффициент подавления более  $10^5$  в спектральной области, где регистрировалась флуоресценция ФС (690–850 нм). Во-вторых, интенсивность сигнала флуоресценции, возбуждаемой источником белого света, пренебрежимо мала по сравнению с интенсивностью сигнала флуоресценции, возбуждаемой лазерным источником, поскольку мощность источника зондирующего белого света на три порядка меньше интенсивности лазерного излучения, а коэффициент экстинкции исследуемых ФС по крайней мере в 10 раз меньше в полосе излучения источника белого света, чем на длине волны лазерного источника. Экспериментально было подтверждено, что при включенном источнике белого света и

выключенном лазерном источнике интенсивность сигнала флуоресценции сравнима с шумами.

Спектральные данные, получаемые в ходе эксперимента через различные промежутки времени после начала облучения, приведены на рис.2,а. В области 450–650 нм находится спектр диффузно рассеянного вперед излучения галогеновой лампы без нормировки на ее спектральную интенсивность, острый пик на длине волны 675 нм представляет собой спектр рассеянного назад лазерного излучения, а широкий пик в области 690–850 нм – спектр флуоресценции, скорректированный в коротковолновой области подавляющим фильтром. Уменьшение интенсивности флуоресценции в процессе лазерного облучения, наблюдаемое на рис.2, связано с выгоранием ФС, а изменения в области диффузного рассеяния (450–650 нм) обусловлены изменением степени оксигенации гемоглобина. Для количественного определения степени оксигенации гемоглобина спектры диффузного рассеяния пересчитывались в спектры поглощения, приведенные на рис. 2,б. Видно, что в процессе лазерного облучения двугорбый спектр поглощения оксигенированного гемоглобина трансформируется в одногорбый, характерный для дезоксигенированного гемоглобина. Степень оксигенации определялась путем моделирования экспериментального спектра поглощения в виде линейной комбинации спектров окси- и дезоксигемоглобина с соответствующими весовыми коэффициентами методом наименьших квадратов [16]. Относительная ошибка при вычислении степени оксигенации составила не более 3%, абсолютная – не более 10%. Спектры обратного рассеяния лазерного излучения образца также представлены на рис.2,а. Для систем, содержащих эритроциты, по интенсивности рассеяния судили об их целостности, поскольку вклад эритроцитов в суммарное рассеяние системы был домини-

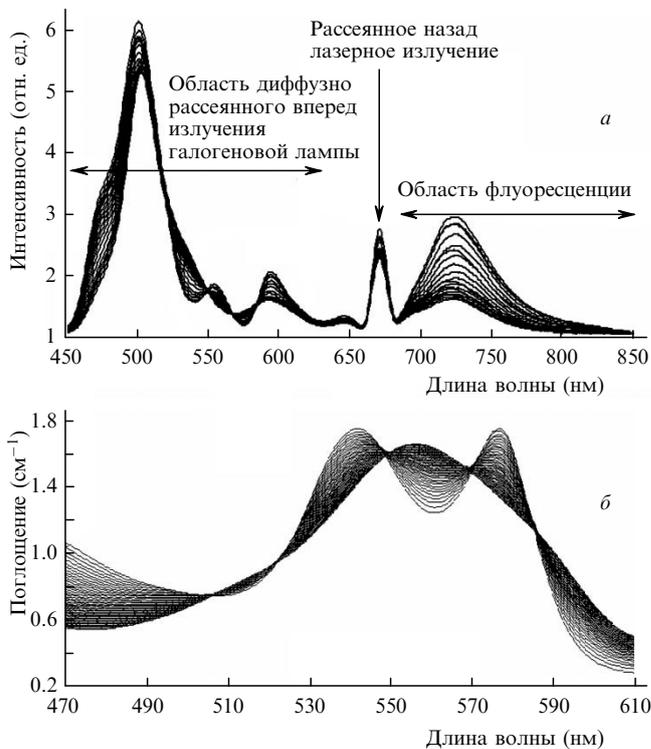


Рис.2. Спектр излучения, собранного принимающим волокном, в различные моменты времени (а) и спектр поглощения гемоглобина, полученный в результате обработки участка спектра на рис.а (б).

рующим; в этом случае при гемолизе эритроцитов рассеяние лазерного излучения резко падало.

Ранее нами была предложена модель для наблюдения *in vitro* за скоростью потребления кислорода, определяемой по степени оксигенации гемоглобина [16]. Уменьшение концентрации кислорода во время фотодинамического воздействия прямо пропорционально концентрации окисленных мишеней (дефектов) в ткани. Когда последняя превышает некоторое пороговое значение, ткань оказывается необратимо поврежденной. Однако это пороговое значение зависит от локализации ФС внутри клетки. По данным А.А.Красновского время жизни синглетного кислорода в воде составляет 3 мкс [17], и соответственно можно предположить, что повреждения клеток имеют место лишь в непосредственной близости от места нахождения ФС. Скорость потребления кислорода во время фотодинамического воздействия в условиях, когда сам по себе дефицит кислорода не является лимитирующим фактором, и при низкой плотности мощности облучения, когда уменьшение заселения основного уровня ФС незначительно, можно выразить следующим уравнением:

$$\Gamma = \alpha \varphi_{\text{ch}} [C] P, \quad (1)$$

где  $\Gamma$  – скорость потребления кислорода (моль·л<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>);  $C$  – концентрация ФС (моль/л);  $P$  – плотность мощности лазерного излучения (Вт/см<sup>2</sup>);  $\alpha$  – коэффициент эффективности генерации синглетного кислорода молекулами ФС при лазерном облучении (см<sup>2</sup>/Дж) [18];  $\varphi_{\text{ch}}$  – квантовый выход химического (необратимого) тушения синглетного кислорода. Реализуется также механизм физического (обратимого) тушения, когда синглетный кислород в результате дезактивации переходит в основное (триплетное) состояние. Коэффициент эффективности генерации синглетного кислорода может быть записан следующим образом [18]:

$$\alpha = \frac{\sigma}{E_{\text{hv}}} \varphi_A \approx 1.925 \times 10^{-5} \lambda \varepsilon \varphi_A, \quad (2)$$

где  $\sigma$  – сечение поглощения лазерного излучения молекулой ФС (см<sup>2</sup>);  $E_{\text{hv}}$  – энергия лазерного фотона (Дж);  $\lambda$  – длина волны облучения (нм);  $\varphi_A$  – квантовый выход образования синглетного кислорода;  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции ФС (л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>). Величина  $\alpha$  имеет смысл числа молекул синглетного кислорода, образованного одной молекулой ФС при световой дозе 1 Дж/см<sup>2</sup>, а произведение  $\alpha \varphi_{\text{ch}}$  в формуле (1) – числа утилизированных молекул кислорода на одну молекулу ФС при той же световой дозе. При этом предполагается, что кислород в основном (триплетном) состоянии присутствует в избытке и не является лимитирующим фактором при генерации синглетного кислорода.

Коэффициент эффективности генерации синглетного кислорода  $\alpha$  очень удобен для оценки фотодинамической активности ФС, работающих по механизму II типа. Попробуем оценить значение  $\alpha$  снизу, т. е. определить минимальное значение, с превышением которого возможна реализация фотокаталитического эффекта. Для этого нужно, чтобы за время светового облучения одна молекула ФС сгенерировала по крайней мере одну молекулу синглетного кислорода. Средняя световая доза во время фотодинамического воздействия с большинством ФС

составляет порядка 100 Дж/см<sup>2</sup> (варьируется от 50 до 400 Дж/см<sup>2</sup>). Для типичных ФС коэффициент экстинкции составляет 10<sup>5</sup> л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>, а  $\varphi_A \sim 0.1 - 0.3$ . Тогда для  $\lambda \approx 670$  нм коэффициент эффективности  $\alpha$  генерации синглетного кислорода согласно формуле (2) будет равен примерно 140–500 см<sup>2</sup>/Дж. Это означает, что за время облучения световой дозой 100 Дж/см<sup>2</sup> одна молекула ФС способна сгенерировать более 10000 молекул синглетного кислорода при условии, что фотоблининг (деструкция ФС под действием света) и дефицит кислорода несущественны.

Для образцов цельной крови скорость потребления кислорода может быть определена из кривой динамики насыщения гемоглобина кислородом. В крови часть кислорода связана с гемоглобином, а часть находится в растворенном состоянии. Величина насыщения гемоглобина кислородом определяется следующим образом:

$$S_{\text{O}_2} = \frac{[\text{Hb}_1\text{O}_2]}{[\text{Hb}_1] + [\text{Hb}_1\text{O}_2]}, \quad (3)$$

где  $[\text{Hb}_1]$  и  $[\text{Hb}_1\text{O}_2]$  – молярные концентрации свободного гема (одна структурная единица гемоглобина) и гема, связанного с кислородом. Суммарная молярная концентрация кислорода, связанного с гемоглобином, определяется как

$$[\text{O}_2]_{\text{bound}} = 4[\text{Hb}_{\text{tot}}] S_{\text{O}_2} = 4 \frac{C_{\text{Hb}}}{M_{\text{Hb}}} S_{\text{O}_2}, \quad (4)$$

где  $[\text{Hb}_{\text{tot}}] = [\text{Hb}_1] + [\text{Hb}_1\text{O}_2]/4$  – суммарная молярная концентрация гемоглобина в крови;  $C_{\text{Hb}}$  – концентрация гемоглобина в крови (г/л);  $M_{\text{Hb}} = 66500$  г/моль – молекулярный вес молекулы гемоглобина (четыре структурные единицы). При концентрации гемоглобина в образцах крови 145 г/л молярная концентрация связанного кислорода при 100 %-ном насыщении  $[\text{O}_2]_{\text{bound}} = 8.7 \times 10^{-3}$  моль/л. Насыщение гемоглобина кислородом – это динамический процесс с участием растворенного кислорода  $\text{O}_2$ , а величина насыщения определяется эмпирическим уравнением Хилла:

$$S_{\text{O}_2} = \frac{[\text{O}_2]^n}{[\text{O}_2]^n + [\text{O}_2]_{50}^n}, \quad (5)$$

где  $n \approx 2.34$  и  $[\text{O}_2]_{50} \approx 35$  мкмоль/л – концентрация растворенного кислорода при 50 %-ном насыщении гемоглобина кислородом [19]. Молярная концентрация растворенного кислорода в соответствии с законом Генри – Дальтона пропорциональна парциальному давлению кислорода  $P_{\text{O}_2}$ :

$$[\text{O}_2] = \frac{\alpha^* P_{\text{O}_2} [\text{Тор}]}{22.4 \text{ л/моль } 760 \text{ Тор}}, \quad (6)$$

где безразмерная константа  $\alpha^*$  – коэффициент растворимости Бунзена. Для крови и воды при температуре 37 °С  $\alpha^* = 0.024$  [20], так что из (6) получаем зависимость молярной концентрации растворенного кислорода от парциального давления кислорода в образце крови:  $[\text{O}_2]$  [мкмоль/л]  $\approx 1.4 P_{\text{O}_2}$  [Тор]. Легко видеть, что при значениях  $S_{\text{O}_2}$  от нескольких до 95 % количество связанного гемоглобином кислорода почти на два порядка выше, чем растворенного. Таким образом, избыток кислорода в крови связывается гемоглобином, а растворенная

фракция кислорода настолько незначительна, что при оценке скорости потребления кислорода во время фотодинамического воздействия не учитывается. Количество потребляемого кислорода  $D$  и скорость его потребления  $\Gamma$  в образце крови могут быть оценены с хорошей точностью по изменению насыщенности гемоглобина кислородом:

$$D = 4[\text{Hb}_{\text{tot}}] \Delta \text{SO}_2, \quad (7)$$

$$\Gamma = -4[\text{Hb}_{\text{tot}}] \frac{d\text{SO}_2}{dt}. \quad (8)$$

Комбинируя уравнения (1) и (8), из наклона кривой оксигенации гемоглобина в начальный момент облучения можно оценить коэффициент потребления кислорода:

$$\alpha \varphi_{\text{ch}} = \frac{-4[\text{Hb}_{\text{tot}}](d\text{SO}_2(0)/dt)}{[C_0]P}. \quad (9)$$

Уравнение (9) мы применяем для вычисления коэффициента потребления кислорода (произведения эффективности генерации синглетного кислорода на квантовый выход химического тушения) по экспериментальным данным, а затем сравниваем его с теоретическим значением, рассчитанным в соответствии с уравнением (2).

В настоящей работе предложена скрининговая система для оценки *in vitro* фотодинамической активности ФС, основанная на регистрации флуоресценции ФС, обратного рассеяния лазерного излучения и спектров поглощения окси- и дезоксигемоглобина во время проведения фотодинамической процедуры. Поскольку основными рассеивающими свет лазера частицами крови являются целые эритроциты, то по интенсивности обратного рассеяния лазерного излучения можно установить процессы, происходящие с эритроцитами во время облучения. При уменьшении степени оксигенации гемоглобина относительная величина интенсивности обратного рассеяния на длине волны 680 нм, на которой проводились основные измерения, немного уменьшается вследствие увеличения поглощения в этой области дезоксигемоглобином. Уменьшение интенсивности обратного рассеяния при этом прямо пропорционально количеству гемоглобина в образце и не превышает 20 %, причем на фоне этого относительного уменьшения для системы с эритроцитами в случае их гемолиза отчетливо наблюдаются гиперосмотическое разбухание (увеличение интенсивности рассеяния вследствие увеличения размеров рассеивающих частиц) и дальнейший лизис (уменьшение интенсивности рассеяния вследствие уменьшения количества рассеивающих частиц). Анализируя спектры поглощения окси- и дезоксигемоглобина в диапазоне длин волн 450–500 нм и принимая во внимание то, что диссоциация гемоглобина и кислорода происходит за наносекунды [21], можно судить о насыщенности системы кислородом. По спектру флуоресценции, регистрируемому одновременно со спектром поглощения, но в другом диапазоне длин волн (680–800 нм), вычисляли фотобликинг ФС.

### 3. Материалы и методы

#### 3.1. Приготовление образцов

В экспериментах использовались цельная свежая донорская кровь, а также эритроцитарная масса и плазма, предоставленные банком крови Городской клиниче-

ской больницы № 1 им. Н.И.Пирогова. Концентрация гемоглобина в крови составляла 130–145 г/л, а показатель гематокрита был равен 0.38–0.42. Для предотвращения свертываемости крови применяли гепарин. При измерениях использовались цельная кровь, комбинации отдельных фракций крови, а также растворы эритроцитов разных концентраций в различных средах (плазма, физиологический раствор, их смеси в разных пропорциях), которые перед началом измерений инкубировались с ФС в течение 30 мин. Перед началом лазерного облучения степень оксигенации гемоглобина составляла 75%–85%. ФС добавлялся в образец в концентрациях, сопоставимых с его содержанием в крови при внутривенном введении пациентам. Для приготовления образца в тонком слое капля исследуемой жидкости помещалась между двумя стеклами. Толщина каждого стекла составляла 1.2 мм, толщина слоя жидкости контролировалась при помощи специальной пленки и находилась в диапазоне 110–130 мкм. Диаметр образца был равен 1 см. Далее подготовленные таким образом образцы с различными концентрациями ФС облучались лазерным излучением с различной плотностью мощности.

#### 3.2. Фотосенсибилизатор

В качестве модельного ФС использовался «Фотосенс» (производство НИОПИК), широко применяемый в клинической практике для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Этот ФС представляет собой смесь фракций фталоцианина алюминия с различной степенью сульфирования (30 % – тетрасульфированный, 50 % – трисульфированный, 20 % – дисульфированный) и коэффициентом экстинкции  $10^5 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  в максимуме полосы поглощения на длине волны 675 нм.

### 4. Результаты и их обсуждение

#### 4.1. Сравнение эффективности ФС для цельной крови и для эритроцитарной массы в плазме

При облучении тонкого слоя крови с «Фотосенсом» наблюдаются изменения в характере рассеяния, обусловленные гипоосмотическим разбуханием и гемолизом эритроцитов, в то время как при облучении раствора эритроцитов в плазме данные процессы отсутствуют (рис.3). Это свидетельствует о том, что белки плазмы за-

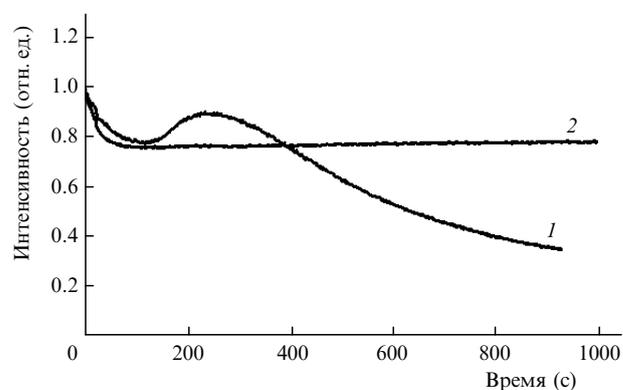


Рис.3. Зависимости интенсивности обратного лазерного рассеяния от времени облучения для цельной крови (1), и комбинации эритроцитарной массы и плазмы крови (2) при концентрации «Фотосенса» в образце 10 мг/л и плотности мощности лазерного облучения 400 мВт/см<sup>2</sup>.

щипают эритроциты от действия синглетного кислорода, в случае же свежей цельной крови происхождение гемолиза не так очевидно, как в системе эритроцитов в физиологическом растворе. В работах [22–24] было показано, что практически все виды иммуноглобулинов и Т-клеточные рецепторы катализируют реакцию превращения синглетного кислорода в перекись водорода. Экспериментально установлено, что молекула иммуноглобулина может увеличивать скорость этой реакции примерно в 500 раз без каких-либо изменений своей функциональности. Перекись водорода, в свою очередь, обладает для биологических структур меньшей токсичностью. (В свежей цельной крови присутствует фермент каталаза (время его жизни – менее суток, поэтому в препаратах, законсервированных для хранения, он отсутствует). Каталаза индуцирует реакцию обратного разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Это означает, что в свежей крови полученная перекись снова станет молекулярным кислородом, а затем – синглетным, в результате чего повысится вероятность гемолиза эритроцитов.)

#### 4.2. Сравнение эффективности ФС для эритроцитарной массы в плазме и в физиологическом растворе

Хотя в присутствии плазмы и наблюдается полная дезоксигенация образца [25], гемолиза нет, поскольку иммуноглобулины превращают синглетный кислород в перекись водорода и белки плазмы участвуют в химическом тушении синглетного кислорода. Это утверждение можно доказать, исследовав образцы с разным количеством плазмы. Эритроциты становятся восприимчивыми к фотодинамическому воздействию при объемном содержании плазмы в образце менее 10 % (объемное содержание физиологического раствора 50 %, эритроцитарной массы – 40 %) (рис.4).

Таким образом, при используемых концентрациях «Фотосенса» в образце, состоящем из эритроцитов и плазмы, в случае связывания ФС с мембранами эритроцитов вероятность перехода образовавшегося синглетного кислорода в перекись или его тушения белками плазмы значительно больше, нежели вероятность диффузии синглетного кислорода через раствор от места его образования на мембране эритроцита до места окисления полиненасыщенной жирной кислоты в этой же мембране

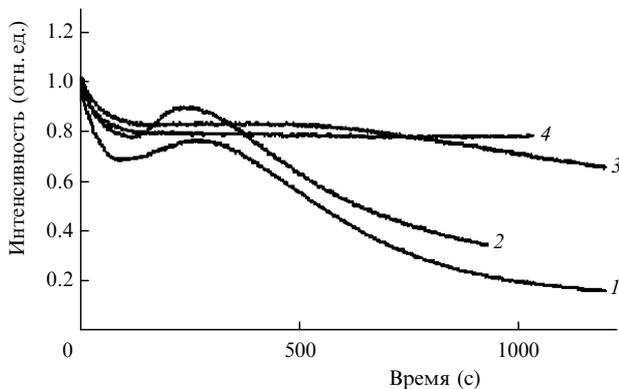


Рис.4. Динамические зависимости интенсивности обратного рассеяния эритроцитами при лазерном облучении тонкого слоя эритроцитарной массы (40 %) в физиологическом растворе в отсутствие плазмы (1) и при ее 5 %-ном (2), 10 %-ном (3) и 60 %-ном (4) содержании; концентрация «Фотосенса» в образце 10 мг/л, плотность мощности облучения 400 мВт/см<sup>2</sup>.

или мембране другого эритроцита. В отсутствие плазмы гемолиз эритроцитов более эффективен (рис.5). Решающую роль в гемолизе играют повреждения мембран эритроцитов под действием синглетного кислорода [26]. Характер поведения ФС при лазерном воздействии лучше всего проявляется в образцах с эритроцитарной массой без плазмы; при этом можно сравнивать эффективности разных препаратов по скорости наступления гемолиза. Именно поэтому для разработки метода оценки эффективности ФС нами были выбраны образцы с эритроцитарной массой в физиологическом растворе.

Скорость гемолиза мы оценивали по времени, прошедшему от начала облучения до момента, когда уменьшение интенсивности обратного рассеяния составило 50 % от начального значения. Для «Фотосенса» с концентрацией 10 мг/л в образце эритроцитарной массы (40 %) со степенью оксигенации гемоглобина 80 % в физиологическом растворе при плотности мощности облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> время уменьшения интенсивности обратного рассеяния на 50 % составило 10 мин.

#### 4.3. Измерение скорости дезоксигенации гемоглобина

Скорость дезоксигенации гемоглобина зависит от многих параметров (см. уравнения (1) и (2)): от концентрации фотосенсибилизатора в образце, от плотности мощности облучения, от состава образца – наличия плазмы, количества эритроцитарной массы, от того, входит ли в образец гемоглобин без эритроцитов.

Для образцов одинакового состава с увеличением плотности мощности облучения скорость дезоксигенации растет практически линейно (рис.6). На рис.7 приведена ее зависимость от концентрации «Фотосенса» при плотности мощности облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> в образце эритроцитарной массы (40 %) в физиологическом растворе. Видно, что, начиная с концентрации 2 мг/л, зависимость линейна. При меньших концентрациях «Фотосенса» скорость растет несколько быстрее, что объясняется отсутствием в этом случае образования агрегатов молекулы препарата в растворе. Если сравнивать скорости дезоксигенации эритроцитарной массы в плазме и в физиологическом растворе, то в плазме скорость выше, а сравнение скоростей дезоксигенации эритроцитарной массы и гемоглобина (при одинаковой концентрации гемоглобина в обоих случаях) показывает, что эритроци-

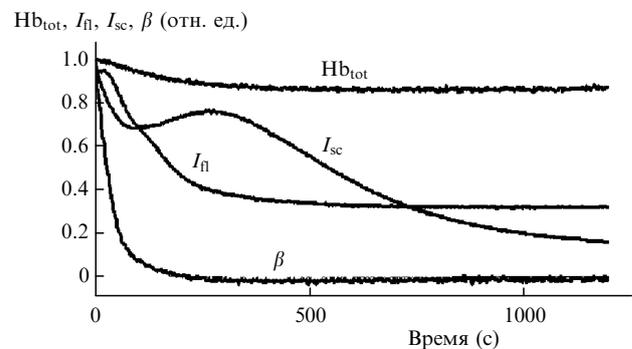


Рис.5. Зависимости основных параметров, характеризующих эффективность ФС, в тонком слое эритроцитарной массы (40 %) в физиологическом растворе (концентрация гемоглобина  $[Hb_{tot}]$ , интенсивность флуоресценции  $I_{fl}$ , интенсивность обратного рассеяния лазерного излучения  $I_{sc}$  и степень оксигенации гемоглобина  $\beta$ ) от времени лазерного облучения при концентрации «Фотосенса» в образце 10 мг/л и плотности мощности облучения 400 мВт/см<sup>2</sup>. Все приведенные параметры нормированы на свои начальные значения.

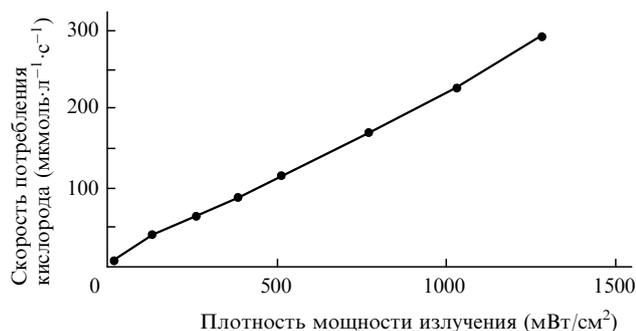


Рис. 6. Зависимость скорости потребления кислорода при лазерном облучении тонкого слоя эритроцитарной массы (40 %) в физиологическом растворе от плотности мощности излучения при концентрации «Фотосенса» в образце 10 мг/л.

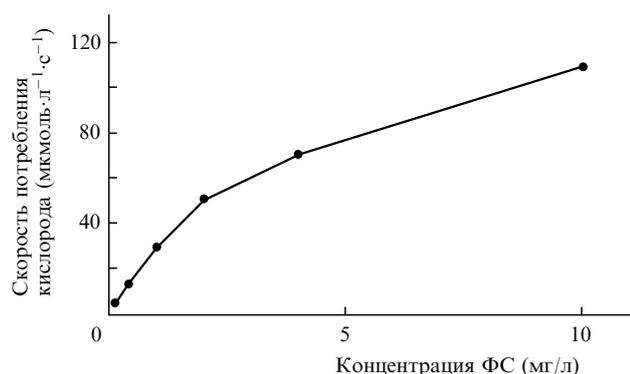


Рис. 7. Зависимость скорости потребления кислорода от концентрации «Фотосенса» в образце при лазерном облучении с плотностью мощности 400 мВт/см<sup>2</sup> в тонком слое эритроцитарной массы (40 %) в физиологическом растворе.

тарная масса быстрее отдает кислород, чем молекулы гемоглобина без мембранной оболочки (рис. 8 и 9). В первом случае это можно объяснить большим количеством акцепторов синглетного кислорода в плазме, а во втором – разной микрогеометрией образцов: ФС в системе с эритроцитами находится на их мембранах и образовавшийся синглетный кислород быстрее утилизируется, окисляя полиненасыщенные жирные кислоты, чем в случае его обратимой дезактивации.

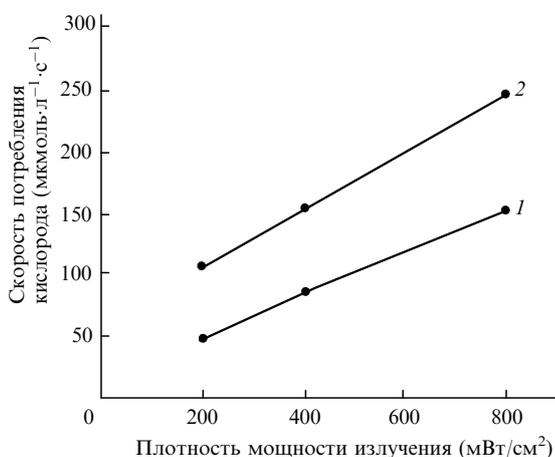


Рис. 8. Зависимости скорости потребления кислорода от плотности мощности лазерного излучения для тонкого слоя эритроцитарной массы (40 %) в физиологическом растворе (1) и в плазме (2) при концентрации «Фотосенса» в образце 10 мг/л.

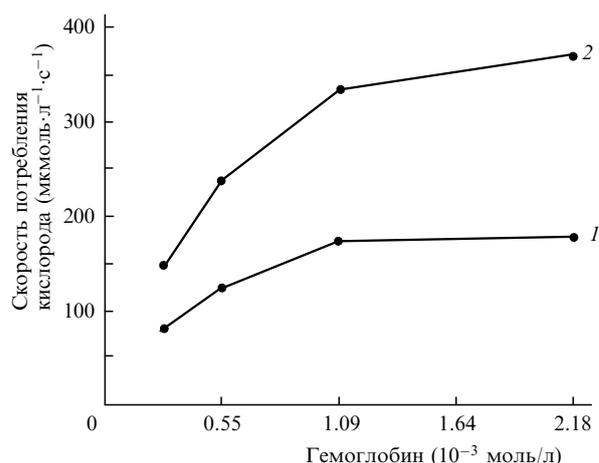


Рис. 9. Зависимости скорости потребления кислорода от концентрации гемоглобина в случае свободного гемоглобина (1) и гемоглобина эритроцитарной массы (2) в физиологическом растворе при концентрации «Фотосенса» в образце 10 мг/л и плотности мощности лазерного облучения 200 мВт/см<sup>2</sup>.

Механизмы дезактивации синглетного кислорода, по мнению разных авторов, могут быть различными. Интересным представляется предложенный А.А.Красновским механизм [27], состоящий в связывании двух молекул синглетного кислорода с дальнейшей передачей энергии на синглетное состояние молекулы ФС. Такая схема дезактивации подтверждается и результатами наших экспериментов, демонстрирующими обратимое уменьшение интенсивности флуоресценции в образце при уменьшении содержания в нем молекулярного кислорода. Для «Фотосенса» были определены экспериментальные значения  $\alpha\varphi_{ch}$ . В плазме  $\alpha$  оказалось равным  $39 \pm 6$  см<sup>2</sup>/Дж, а в физиологическом растворе –  $22 \pm 6$  см<sup>2</sup>/Дж. Следует отметить, что рассчитанное по формуле (2) значение  $\alpha$  для «Фотосенса» ( $\epsilon = 2 \times 10^5$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>,  $\varphi_d \sim 0.3$ ,  $\lambda \approx 700$  нм) составило порядка 900 см<sup>2</sup>/Дж.

Расхождение в экспериментальных и теоретических значениях можно объяснить следующим образом. Во-первых, основная часть фталоцианина алюминия в растворе находится в димеризованном состоянии (в термодинамическом равновесии с мономерами), димеры не флуоресцируют и не способны активировать молекулярный кислород. При связывании димера с белками плазмы или с мембранами эритроцитов молекулы фталоцианинов мономеризуются и начинают участвовать в генерации синглетного кислорода. При этом, как следует из экспериментальных данных, эффективность мономеризации фталоцианинов белками плазмы выше, чем мембранами эритроцитов. Во-вторых, происходит обратимая фотохимическая реакция с образованием молекулярного кислорода, в результате которой суммарная энергия двух молекул синглетного кислорода передается молекуле фталоцианина. При этом физически дезактивируются сразу две молекулы синглетного кислорода [25]. Возможны и другие механизмы, влияющие на эффективность генерации и дезактивацию синглетного кислорода, например способность молекул ФС к связыванию комплексов с окружающими белками, липидами, кислородом и друг с другом напрямую или через другие молекулы среды [26]. Таким образом, теоретически рассчитанная эффективность генерации синглетного кислорода может значительно отличаться от таковой в реальных

биологических средах. Поэтому экспериментальный метод определения эффективности генерации синглетного кислорода в настоящее время наиболее точно отражает процесс взаимодействия излучения с биологическими средами, содержащими ФС.

#### 4.4. Измерение флуоресценции препаратов и скорость их фотобликинга при лазерном воздействии

Во время проведения фотодинамической терапии важную роль играет информация о концентрации ФС [28, 29]. В нашей системе изменение концентрации ФС определялось по изменению интенсивности флуоресценции. Относительную величину интенсивности определяли как площадь под спектральной кривой интенсивности флуоресценции, отнесенную к площади пика интенсивности обратного рассеяния лазерного излучения, индуцирующего флуоресценцию (680 нм). При этом уменьшение относительной интенсивности флуоресценции во время облучения свидетельствует о фотобликинге ФС. С помощью разработанной нами методики можно следить за этим процессом в разных средах, а также регистрировать зависимость скорости фотобликинга ФС от насыщенности среды кислородом. Для концентрации «Фотосенса» 10 мг/л в образце эритроцитарной массы (40 %) со степенью оксигенации гемоглобина 80 % в физиологическом растворе при плотности мощности облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> за время уменьшения степени оксигенации до нуля интенсивность флуоресценции уменьшилась до 40 % и далее практически не менялась (см. рис.3). При этом фотобликинг носит обратимый характер, т.е. если образец заново насытит кислородом, уровень интенсивности флуоресценции «Фотосенса» восстановится. Это еще раз свидетельствует об участии молекулярного кислорода в процессе фотобликинга «Фотосенса».

#### 5. Заключение

Разработан лазерно-спектроскопический метод оценки фотодинамической активности ФС, основанный на одновременной регистрации спектров поглощения гемоглобина, рассеянного назад лазерного излучения и флуоресценции ФС в режиме непрерывного мониторинга во время лазерного облучения. Метод позволяет быстро выявить характер поведения ФС в условиях, максимально приближенных к условиям клинического применения, а также определить ряд количественных параметров, необходимых для точных расчетов терапевтических концентраций ФС и доз лазерного облучения.

На примере «Фотосенса» продемонстрировано использование метода, проведена оценка таких характеристик ФС, как скорость потребления кислорода, фотостойкость препарата в условиях, близких к *in vivo*, и оценена его фотодинамическая активность. Для «Фотосенса» вычислены значения коэффициента потребления кислорода  $\alpha\varphi_{ch}$  в разных средах – в плазме ( $39 \pm 6 \text{ см}^2 \times \text{Дж}^{-1}$ ) и в физиологическом растворе ( $22 \pm 6 \text{ см}^2/\text{Дж}$ ).

1. Rywkin S., Lenny L., et al. *J. Photochem. Photobiol.*, **56** (4), 463 (1992).
2. Spielmann H., Maurer T., et al. *ATLA*, **22**, 314 (1994).
3. Boyle R.W., Dolphin D. *J. Photochem. Photobiol.*, **64** (3), 469 (1996).
4. Keyse S.M. *Stress Response Methods and Protocols* (Totowa, USA: Humana Press, 2000, pp 35–47).
5. Hsieh Y.J., Wu C.C., et al. *J. Cell Physiol.*, **194** (3), 363 (2003).
6. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Гилязова Д.Г. *Биофизика*, **49** (2), 351 (2004).
7. Красновский А.А. мл. *Успехи биологической химии*, **39**, 255 (1999).
8. Tapia G., Galetovic A., et al. *J. Photochem. Photobiol.*, **70** (4), 499 (1999).
9. Захаров С.Д., Иванов А.В. *Квантовая электроника*, **29** (3), 192 (1999).
10. Baker A., Kanofsky J.R. *J. Photochem. Photobiol.*, **55** (4), 523 (1992).
11. Kanofsky J.R. *J. Photochem. Photobiol.*, **53**, 93 (1991).
12. Kanofsky J.R. *J. Photochem. Photobiol.*, **51**, 299 (1990).
13. Oelckers S., Ziegler T., et al. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **53**, 121 (1999).
14. Ricchelli F. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **29**, 109 (1995).
15. Zavodnik I.B., Zavodnik L.B., et al. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **67**, 1 (2002).
16. Stratonnikov A.A., Douplik A.Yu., et al. *Laser Phys.*, **13** (1), 1 (2003).
17. Еропов С.Ю., Красновский А.А. мл. *Биофизика*, **28** (3), 497 (1983).
18. Fernandez J.M., Bilgin M.D., Grossweiner L.I. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **37**, 131 (1997).
19. Fournier R.L. *Basic Concepts of Biomedical Engineering* (Columbus, OH: Greyden Press, 1995).
20. Schimidt R.F., Thews G. *Human Physiology* (Berlin: Springer-Verlag, 1989).
21. Sun L., Chen H., et al. <http://www.symp15.nist.gov/pdf/p525.pdf>.
22. Wentworth P.Jr., Jones L.H., et al. *Science*, **293** (5536), 1806 (2001).
23. Nieva J., Wentworth P. Jr. *Trends Biochem. Sci.*, **29** (5), 274 (2004).
24. Parren P.W.H.I., Leusen J.H.W., van der Winkel J.G.J. *Trends Immunol.*, **24** (9), 467 (2003).
25. Butorina D.N., Krasnovsky A.A., Jr., Bashtanov M.E., Egorov S.Yu., Priezhev A.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4241**, 317 (2001).
26. Буторина Д.Н., Красновский А.А. мл., Приезhev А.В. *Биофизика*, **48** (2), 201 (2003).
27. Butorina D.N., Bashtanov M.E., Krasnovsky A.A., Jr., Priezhev A.V. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4001**, 385 (2000).
28. Frank B.J. *J. Exper. Biol.*, **198**, 155 (1995).
29. Sato Y., Sato K., et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, **366** (1), 61 (1999).