

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДВУХФОТОННОГО ПОГЛОЩЕНИЯ В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Н. Крук¹, А. Короткий^{2,3}, М. Дробижев³, А. Ребане³, Г. Исаков⁴, П. Петров⁴

¹ Институт молекулярной и атомной физики НАН Беларуси, пр-т. Ф Скорины 70, 220072 Минск, Беларусь, kruk@imaph.bas-net.by

² Университет Торонто, Институт рака провинции Онтарио, Торонто, Канада

³ Университет штата Монтана, Бозмен, США

⁴ Научный фармацевтический центр, ОАО Белмедпрепараты, Минск, Беларусь

Фотодинамическая терапия является динамично развивающейся областью медицины и представляет собой метод разрушения злокачественных новообразований при их взаимодействии с синглетным молекулярным кислородом, который образуется при переносе на него энергии от молекулы активированного светом фотосенсибилизатора [1]. Используемые в настоящее время в медицинской практике лекарственные препараты-фотосенсибилизаторы принадлежат классу тетрапиррольных пигментов. Известно, что данные соединения обладают высокой способностью к сенсibilизации синглетного кислорода, являющегося ключевым агентом в клеточном фотоповреждении. С другой стороны, фотодинамическое действие *in vivo* напрямую зависит от эффективности фотовозбуждения молекулы сенсibilизатора. С этой целью длина волны света, используемого для фотовозбуждения сенсibilизатора, должна попадать в "окно прозрачности" тканей организма (~700-800 нм) [1,2]. К сожалению, многие порфириновые соединения обладают слабым поглощением в красной и ближней ИК-областях спектра и не могут быть эффективно использованы в качестве фотодинамических агентов. Следует добавить, что фотодинамическая терапия применяется только к ограниченному числу заболеваний из-за ограниченной глубины проникновения света в биологические ткани. Поэтому в настоящее время увеличение глубины фотодинамического воздействия рассматривается как один из важнейших факторов для увеличения эффективности метода в клинической практике.

Среди различных способов преодоления указанных ограничений одним из наиболее перспективных является использование двухфотонного возбуждения [3-7]. В этом случае длина волны используемого излучения равна удвоенной длине волны рабочего электронного перехода, а использование излучения, соответствующего диапазону прозрачности биологических тканей должно обеспечить увеличение глубины фотодинамического воздействия. Необходимо указать, что правила отбора для одно- и

двухфотонного поглощения в случае centrosимметричных молекул (сказанное верно и для квазисимметричных соединений [4,6-10]) являются альтернативными и заселяемые в результате фотовозбуждения электронные состояния будут различными. Однако независимо от способа фотовозбуждения в результате релаксационных процессов заселяется нижнее синглетное, а затем, в результате интеркомбинационной конверсии, нижнее триплетное состояние сенсibilизатора и происходит сенсibilизация электронно-возбужденного синглетного молекулярного кислорода (Рис.1).

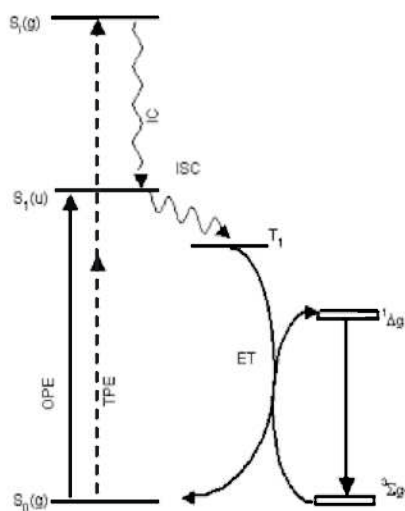


Рис.1. Схема сенсibilизированного образования синглетного кислорода при одно- (сплошная стрелка) и двухфотонном (пунктирная стрелка) фотовозбуждении молекулы сенсibilизатора. $S_0(g)$, $S_1(u)$, $S_i(g)$, и T_1 обозначают соответственно основное, первое и i -е возбужденные синглетные состояния, и нижнее триплетное состояние молекулы сенсibilизатора. Буквы в кавычках обозначают четную (g) либо нечетную (u) симметрию электронных состояний. $^3\Sigma_g^-$ и $^1\Delta_g$ - основное и первое возбужденное состояния молекулярного кислорода.

Поскольку для двухфотонного поглощения правилами отбора разрешены переходы между состояниями одинаковой четности, то для тетрапиррольных молекул эффективное двухфотонное возбуждение возможно для переходов в состояния четной симметрии (g→g переходы). Квантово-химические расчеты указывают, что нижние состояния четной симметрии (g-состояния) у тетрапиррольных пигментов находятся в области 25000-30000 см^{-1} , что подтверждается экспериментальными данными [11-13]. Таким образом, положение четных электронных состояний у тетрапиррольных молекул позволяет в полной мере использовать возможности для двухфотонного фотовозбуждения в окне прозрачности биологических тканей.

До недавнего времени практическое применение двухфотонного возбуждения считалось маловероятным по причине весьма малых значений сечения двухфотонного

поглощения σ_2 . Однако результаты наших исследований показывают, что сечение двухфотонного поглощения у тетрапиррольных молекул может достигать 1000 ГМ и более ($1 \text{ ГМ} = 1 \cdot 10^{-50} \text{ см}^4 \cdot \text{с} \cdot \text{фотон}^{-1}$) [4-9,12]. Поскольку эффективность двухфотонного поглощения пропорциональна квадрату мгновенной интенсивности фотовозбуждения, то использование в качестве источников света импульсных лазеров с пико- и субпикосекундной длительностью импульсов позволяет существенно усилить этот эффект [3]. При таких условиях оказывается возможным получить при той же мощности излучения сравнимые концентрации возбужденных молекул сенсibilизатора, что и в случае однофотонного возбуждения. Следует отметить, что хотя пиковая мощность при использовании коротких световых импульсов оказывается существенно выше, чем у используемых обычно лазеров с длительностью импульса 10-30 нс, порог разрушения биотканей в данном случае оказывается существенно выше [3], что позволяет широко применять такие лазерные источники в различных биологических экспериментах [3,14].

Дополнительным преимуществом двухфотонной схемы фотовозбуждения является то, что на длине волны источника света сенсibilизатор не поглощает, что позволяет избежать явления самоэкранирования. Соответствие длины волны возбуждения окну прозрачности биологических тканей снижает риск эффектов гипертермии из-за поглощения лазерного излучения тканями организма, а использование в качестве источников света импульсных лазеров с субпикосекундной длительностью импульсов предотвращает процессы столкновительной ионизации и другие лавинные процессы разрушения тканей, часто имеющие место при мощном импульсном фотовозбуждении [3]. Квадратичный характер зависимости величины двухфотонного поглощения от мощности фотовозбуждения позволяет, используя фокусировку, локализовать фотодинамическое воздействие в малом объеме (до 1 мкм^3 [15]), что принципиально невозможно в случае однофотонного возбуждения.

С точки зрения структуры потенциальных фотосенсibilизаторов для двухфотонного возбуждения нам представляется перспективной модификация тетрапиррольного макроцикла путем присоединения одного или нескольких заместителей, которые сами обладают большим сечением двухфотонного поглощения σ_2 [16]. В этом случае заместители работают как светособирающая антенна, затем осуществляется транспорт энергии фотовозбуждения на тетрапиррольный макроцикл. Наиболее обещающим в этом направлении является синтез дендримерных систем первого поколения G-0, у которых ядром является тетрапиррольный макроцикл, а дендроны

представляют собой молекулы с высоким сечением двухфотонного поглощения [16,17]. Дендримерная конфигурация позволяет осуществить перенос энергии электронного возбуждения с дендронов на ядро с эффективностью, близкой к 100%. Внедрение порфирина в дендримерную оболочку и модификация боковых заместителей (дендронов) также может решить проблему растворимости тетрапиррольного сенсibilизатора в водной среде и обеспечить его эффективный транспорт и накопление в опухолевых тканях [1,18,19]. В зависимости от типа дендронов и их количества сечение двухфотонного поглощения σ_2 у таких систем может достигать больших значений (~800 ГМ [16], ~8000 ГМ [17]), что позволяет осуществить эффективную сенсibilизацию синглетного кислорода.

К настоящему времени в мире прошли клинические испытания и широко применяются более 10 фотосенсibilизаторов [1,19]. Учитывая то, что клинические испытания занимают длительный срок, вызывает значительный интерес изучение способности к фотосенсibilизированному образованию синглетного молекулярного кислорода при двухфотонном возбуждении у промышленно выпускаемых препаратов. Нами проведены исследования двухфотонного поглощения отечественного фотосенсibilизатора Фотолон® и показана возможность фотосенсibilизированного образования синглетного молекулярного кислорода при двухфотонном возбуждении [10]. В литературе также описаны результаты изучения двухфотонного поглощения препаратов протопорфирина-IX [15], Al-фталоцианина [20], Verteporfin® (VisudyneTM) [21,22]. Полученные значения сечения двухфотонного поглощения не превышают 100 ГМ и являются недостаточными для широкого применения такого способа фотовозбуждения. Вместе с тем, в ряде случаев, когда важны преимущества, обеспечиваемые двухфотонным способом фотовозбуждения, несомненно могут быть предприняты попытки его использования.

Необходимо отметить также еще одно применение двухфотонного возбуждения – в двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии, новом динамично развивающемся научном направлении в исследовании свойств биологических объектов [23,24]. Двухфотонное возбуждение открывает возможности для использования новых спектральных диапазонов, ограничивает фоторазрушение тканей биообъекта фокальной плоскостью, а также обеспечивает формирование изображения с пространственным разрешением (3D-разрешением) и минимизирует фоновый сигнал.

Полученные к настоящему времени результаты в целом позволяют говорить о перспективности применения двухфотонного возбуждения в фотодинамической терапии.

Двухфотонное возбуждение не является альтернативой обычному способу фотовозбуждения и должно, по-видимому, рассматриваться как параллельный подход, который следует применять в тех случаях, когда невозможно обеспечить требуемый фотодинамический эффект из-за ограничений, налагаемых однофотонным возбуждением.

Литература

1. Bonnett R., Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, 2000.
2. S. Wan, J.A. Parrish, R. Rox Anderson, M. Madden, Photochemistry and Photobiology **34**, 679 (1981).
3. E.A. Wachter, W.P. Partridge and W.G. Fisher, H.C. Dees and M.G. Petersen, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. **3269**, 68 (1998).
4. A. Karotki, M. Kruk, M. Drobizhev, A. Rebane, E. Nickel and C. W. Spangler, IEEE Journal on Selected Topics in Quant. Electr. **7**, 971 (2001).
5. M. Kruk, A. Karotki, M. Drobizhev and A. Rebane Technical Digest of LALS-IX Conference, 92, Vilnius, 2002.
6. A. Karotki, M. Drobizhev, M. Kruk, A. Rebane, E. Nickel, C. W. Spangler, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. **4612**, 143 (2002).
7. A. Karotki, M. Drobizhev, M. Kruk, C. W. Spangler, E. Nickel, N. Mamardashvili, A. Rebane, J. Opt. Soc. of America: B **20**, 321 (2003).
8. M. Drobizhev, Karotki A., Kruk M., Rebane A., Nickel E., Spangler C. W., N. Mamardashvili, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. **4797**, 152 (2003).
9. M. Drobizhev, A. Karotki, M. Kruk, A. Rebane, Chem. Phys. Letters **355**, 175 (2002).
10. M. Kruk, A. Karotki, M. Drobizhev, A. Rebane, G. Isakov, P. Petrov, Международная конференция "Лазерная физика и применения лазеров", 263, Минск, 2003.
11. В. Кузьмицкий, Журн. прикл. спектр. **68**, 758 (2001).
12. M. Drobizhev, A. Karotki, M. Kruk, N. Mamardashvili, A. Rebane, Chem. Phys. Letters **361** 504 (2002).
13. M. Kruk, A. Karotki, M. Drobizhev, V. Kuzmitsky, V. Gael, A. Rebane, Journal of Luminescence **105** 45 (2003).
14. L. Kelbaskas, Dietel W., Photochemistry and Photobiology **76**, 686 (2002).
15. R.L. Goyan, Gramb D.T. , Photochemistry and Photobiology **72**, 821 (2000).
16. F. Meng, E. Nickel, M. Drobizhev, M. Kruk, A. Karotki, Y. Dzenis, A. Rebane, C.W. Spangler, Polymeric Materials: Science & Engineering **89** 462 (2003).
17. W.R. Dichtel, J.S. Serin, C. Edder, J.M.L. Freshet, M. Matuszewski, L.-S. Tan, T.Y. Ohulchansky, P.N. Prasad, JACS **126**, 5380 (2004).
18. О.Н. Альбитская, И.Н. Журавкин, М.А. Каплан, Н.Д. Кочубеева, А.Л. Мещерякова, П.Т. Петров и др., Агент для фотодинамической диагностики и терапии онкологических заболеваний, Патент РФ №2152790 от 12.05.1999 г.
19. Петров П.Т., Царенков В.М., Мещерякова А.Л. и др., Средство для фотодинамической терапии злокачественных образований - Фотолон, Патент РБ №5651 от 08.04.1999 г.
20. Yu.P. Meshalkin, E.E. Alfimov, N.E. Vasil'ev, A.N. Denisov, V.K. Makukha, A.P. Ogirenko, Quant. Electron. **29**, 1066 (1999).
21. D.T. Gramb, R.L. Goyan, Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. **4262**, 41 (2001).
22. A. Karotki, Ph.D. Dissertation, Montana State University, Bozeman, 2003.
23. W.Denk, J.H. Strickler, W.W. Webb, Science, **248**, 73 (1990).
24. W.R. Zipfel, R.M. Williams, W.W. Webb, Nature biotechnology, **21**, 1369 (2003).