



# Спектроскопическое исследование метиленового синего в водных растворах солей, белков и липидов

Д. В. Поминова<sup>1,2</sup>, А. В. Рябова<sup>1,2</sup>, А. С. Скобельцин<sup>1,2</sup>, И. В. Маркова<sup>2</sup>, И. Д. Романишкин<sup>1</sup>, А. М. Куличенко<sup>1,2</sup>, Е.В. Ахлюстина<sup>2</sup>

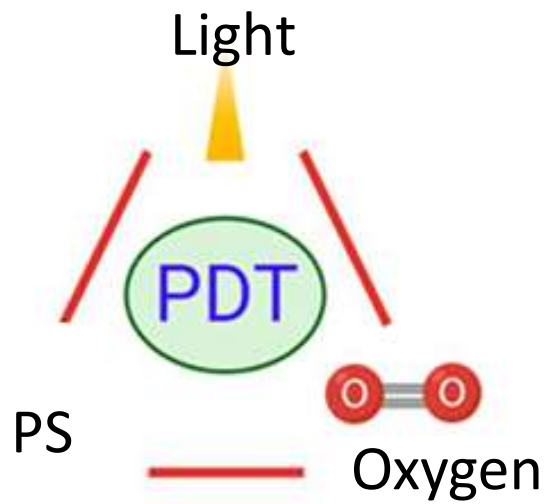
*1 Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук*

*2 Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ*

[pominovadv@gmail.com](mailto:pominovadv@gmail.com)

# Мотивация

- Настоящая работа посвящена исследованию спектров поглощения и флуоресценции, времени жизни флуоресценции, а также фотостабильности метиленового синего (МС) в водных растворах солей, белков и липидов в зависимости от концентрации МС.
- Интерес к исследованию обусловлен окислительно-восстановительными и фотодинамическими свойствами МС в отношении живых клеток.
- Спектроскопическое исследование фотофизических и фотохимических свойств МС в растворах позволит осуществлять контроль перехода МС в лейкометиленовый синий (ЛМС) под действием внешних факторов и интерпретировать результаты экспериментов на клеточных культурах и лабораторных животных, а также контролировать тип фотодинамической реакции.



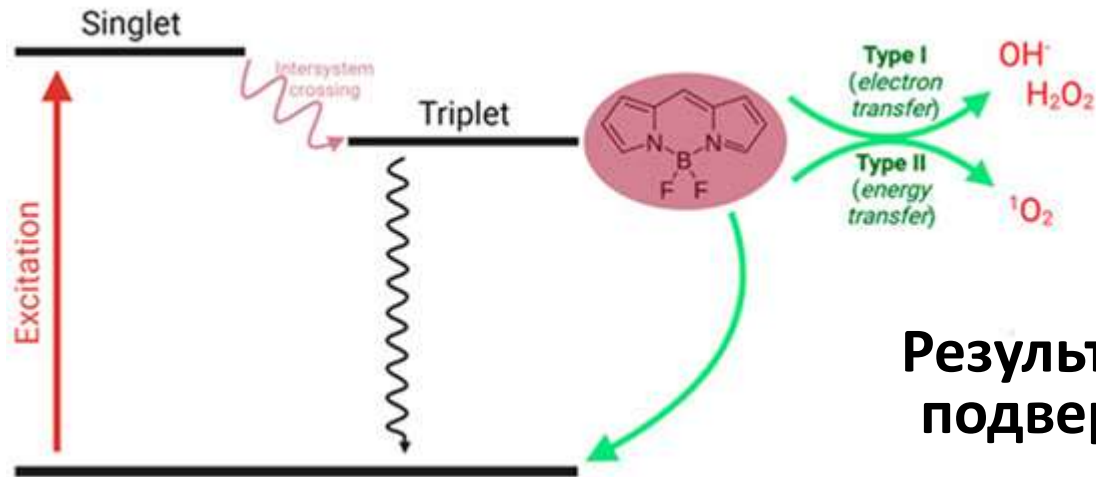
# Фотодинамическая терапия

Для фотодинамической терапии необходимы фотосенсибилизатор (ФС), свет и кислород.

ФС поглощает свет

- **Фотохимическая реакция I типа:** обмен электронами и образование радикалов [1].
- **Фотохимическая реакция II типа:** передача энергии молекулярному кислороду и образование синглетного кислорода.

**Результат: некроз и/или апоптоз клеток, которые подвергались воздействию.**



[1] A.A. Krasnovsky, *Photodynamic action and singlet oxygen*, *Biophysics*, vol.49(2) pp. 289-306, (2004).

# Достоинства и ограничения метода ФДТ

+ малая инвазивность

+ высокая селективность

+ минимальные побочные эффекты

- ограничена глубиной проникновения света в биоткани

- ограничена содержанием кислорода в тканях (II тип фотохимической реакции)\*

\*Большинство клинически разрешенных ФС образуют синглетный кислород, т.е. работают по II типу.

Терапия опухолей в состоянии гипоксии остается сложной задачей.

I тип фотохимической реакции может быть предпочтительным для терапии таких опухолей [1].

[1] Baptista M. S., Indig G. L. Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes. // The Journal of Physical Chemistry B. 1998. 102, 23. 4678–4688.

# Метиленовый синий

Метиленовый синий (МС) является перспективным фотосенсибилизатором для терапии патологических новообразований

- обладает флуоресценцией в красной части спектра и значительной фотодинамической активностью
- обладает как фотодинамической активностью (при лазерном облучении), так и окислительно-восстановительными и каталитическими свойствами (в отсутствии света)
- В зависимости от окружения (solрастворитель, ионная сила, pH и т.д.), может образовывать как синглетный кислород, так и другие АФК[1].
- способен увеличивать потребление кислорода опухолями (тканями с аэробным гликолизом и опухолям, при этом действие метиленового синего примерно пропорционально ферментативной способности тканей)<sup>1</sup>

[1] H.C. Junqueira, D. Severino, L.G. Dias, M.S. Gugliotti, M.S. Baptista, *Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces, Physical Chemistry Chemical Physics, vol. 11 (4), pp. 2320–2328, (2002).*

[2] Barron, E. G. (1930). *The catalytic effect of methylene blue on the oxygen consumption of tumors and normal tissues. The Journal of experimental medicine, 52(3), 447.*

# Метиленовый синий

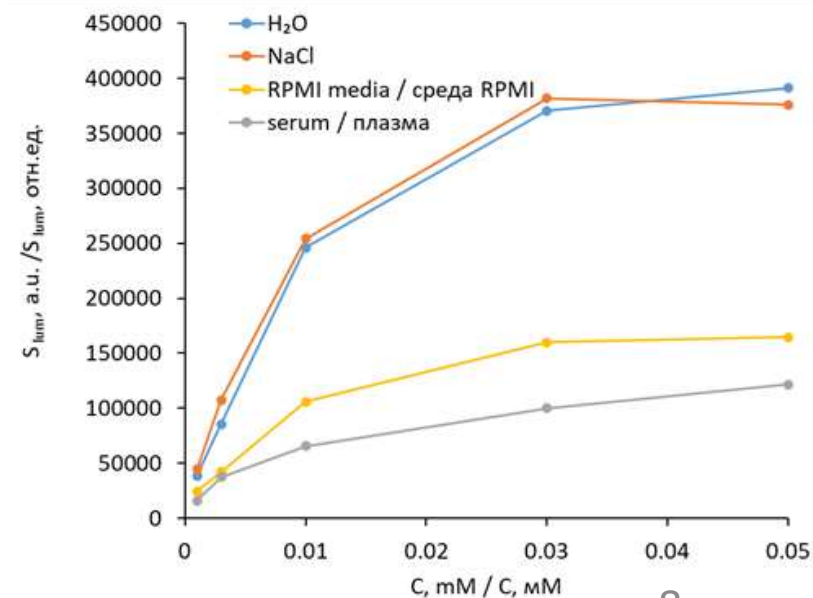
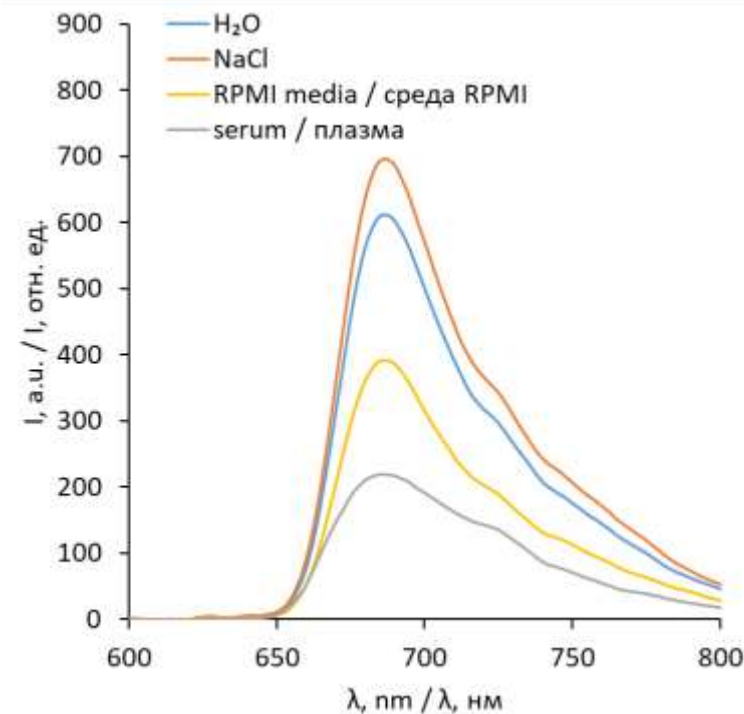
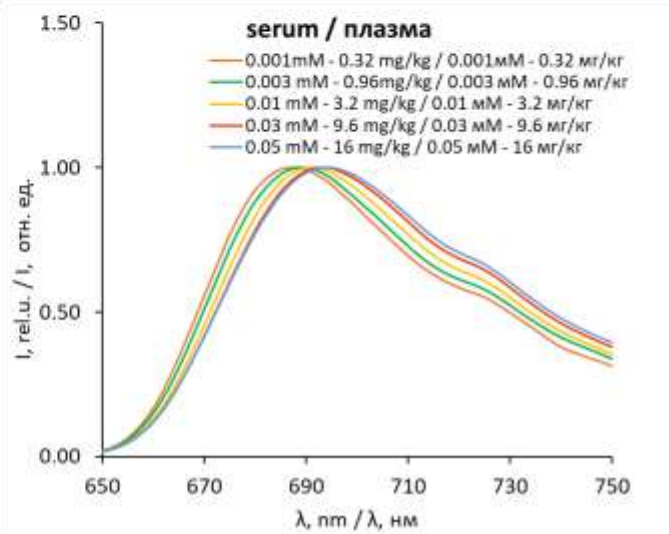
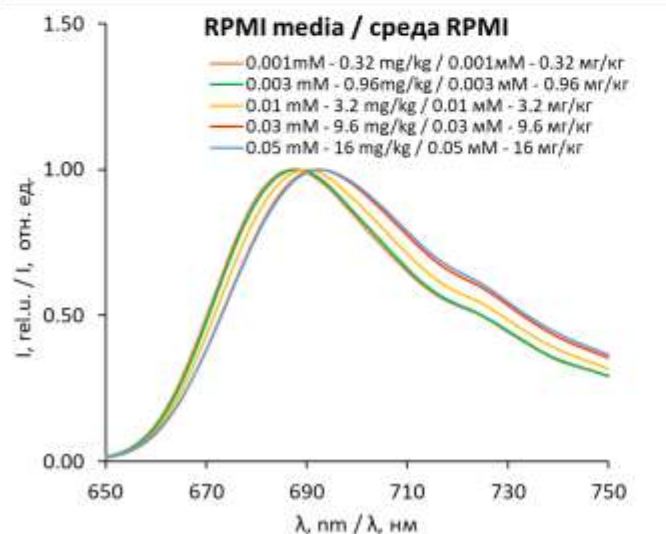
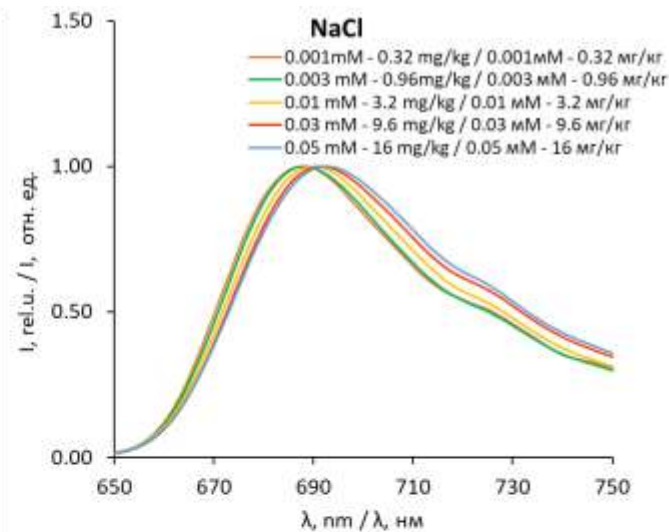
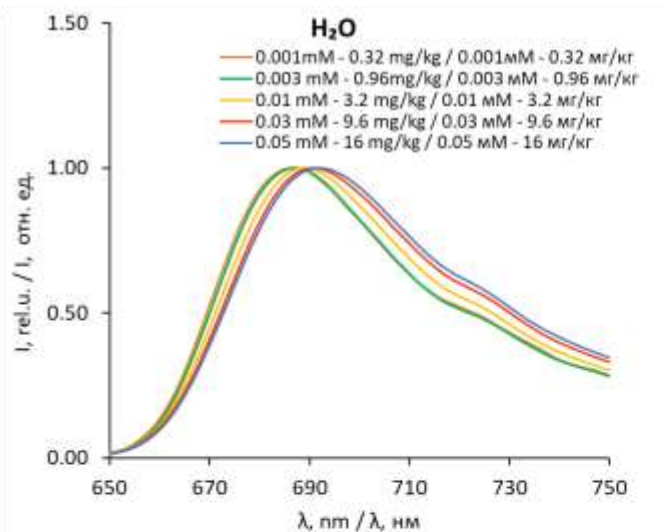
- Окисленная форма легко восстанавливается до бесцветного лейкометиленового синего (ЛМС) в отсутствие кислорода или при взаимодействии с НАД(Ф)Н или восстановленным глутатионом.
- Генерация  $^1\text{O}_2$  снижается до значений, близких к нулю при димеризации за счет быстрого безызлучательного распада (3–4 пс), благоприятствуя реакциям переноса электрона и последующему образованию радикалов.
- Соотношение мономера и димера существенно зависит от растворителя, а также концентрации МС.
- Агрегатное состояние МС в водном растворе также чувствительно к ионной силе: показано, что увеличение концентрации солей приводит к уменьшению склонности молекул МБ к агрегации.
- Еще одним параметром, влияющим на эффективность генерации синглетного кислорода, является рН. По литературным данным, производство синглетного кислорода примерно в пять раз эффективнее в щелочной, чем в кислой среде.



# Цели и задачи исследования

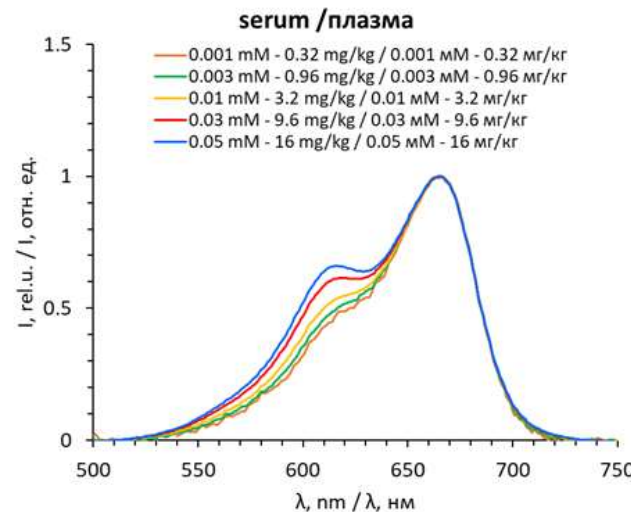
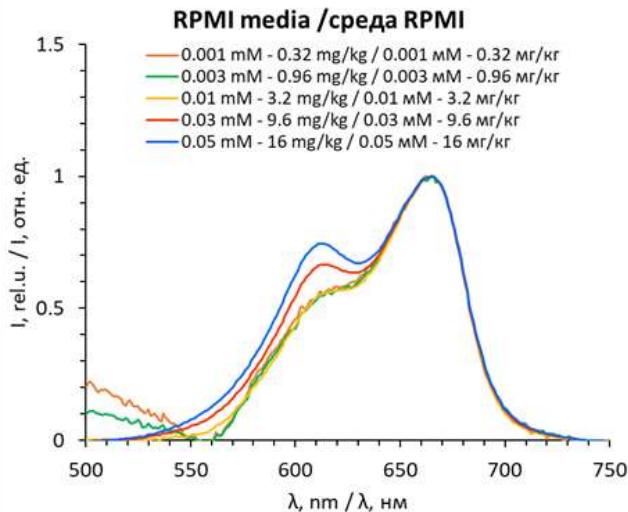
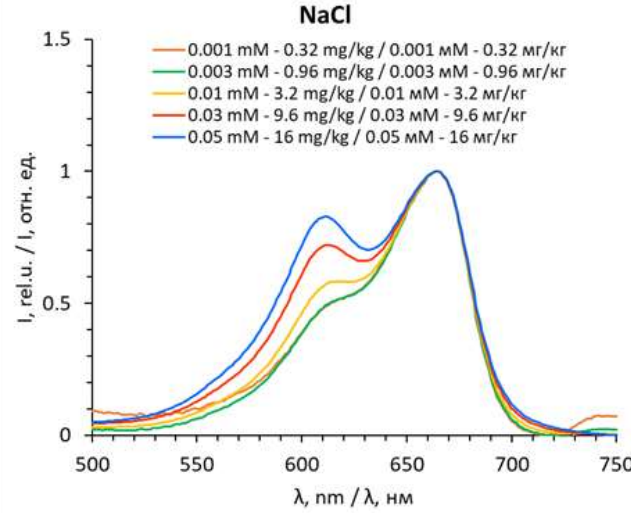
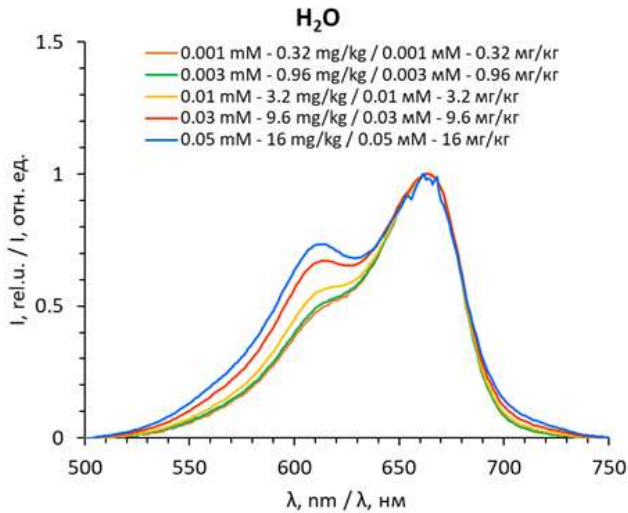
- Большое количество взаимосвязанных факторов, влияющих на фотофизические и фотохимические свойства метиленового синего, затрудняют его изучение и внедрение в клиническую практику, несмотря на ряд уникальных свойств, которые могут быть весьма полезны для повышения эффективности фотодинамической терапии.
- Для клинического использования важно изучить фотофизические и фотохимические свойства МБ в условиях, максимально приближенных к реальным биологическим
- В связи с этим в данной работе с использованием современных спектроскопических методов исследованы спектры поглощения и флуоресценции, время жизни флуоресценции, а также фотостабильность метиленового синего (МС) в водных растворах солей, белков и липидов в зависимости от концентрации МС
- Исследована эффективность генерации синглетного кислорода/АФК МС *in vitro*.

# Спектры флуоресценции



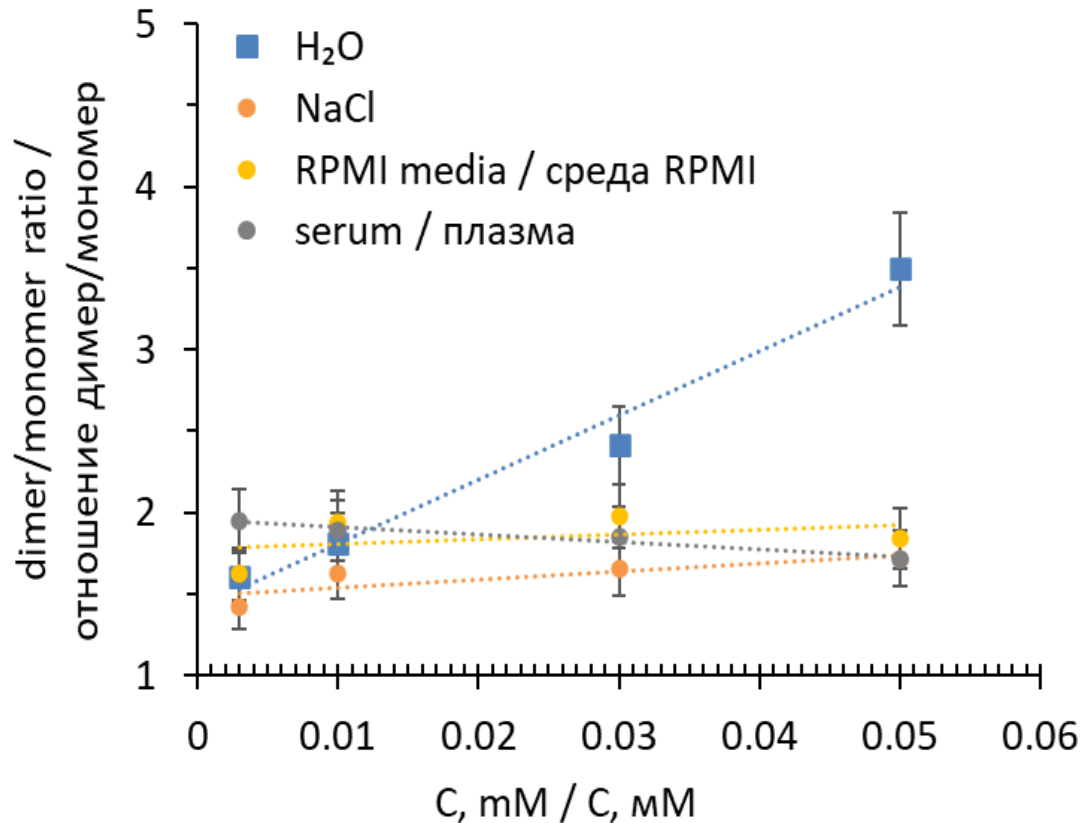


# Поглощение МС в биологических средах. Концентрационная зависимость



- В красной области наблюдаются характерные пики (664 нм — мономер, плечо при 615 нм — агрегаты).
- Форма спектра поглощения меняется при концентрациях выше 0,01 mM (3,2 мг/кг) для воды и NaCl и при 0,03 mM (9,6 мг/кг) для плазмы крови и среды RPMI, что проявляется в виде димерного пика МБ в спектральной области 600–630 нм.

# Поглощение МС в биологических средах. Концентрационная зависимость



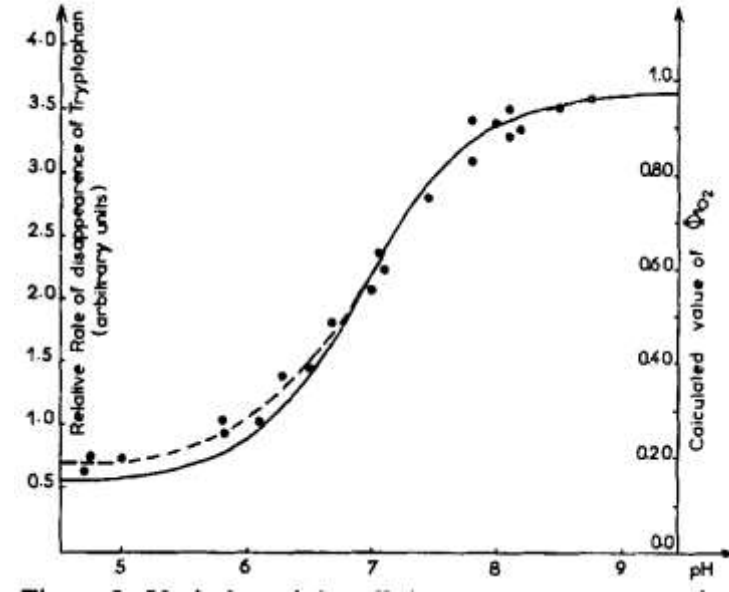
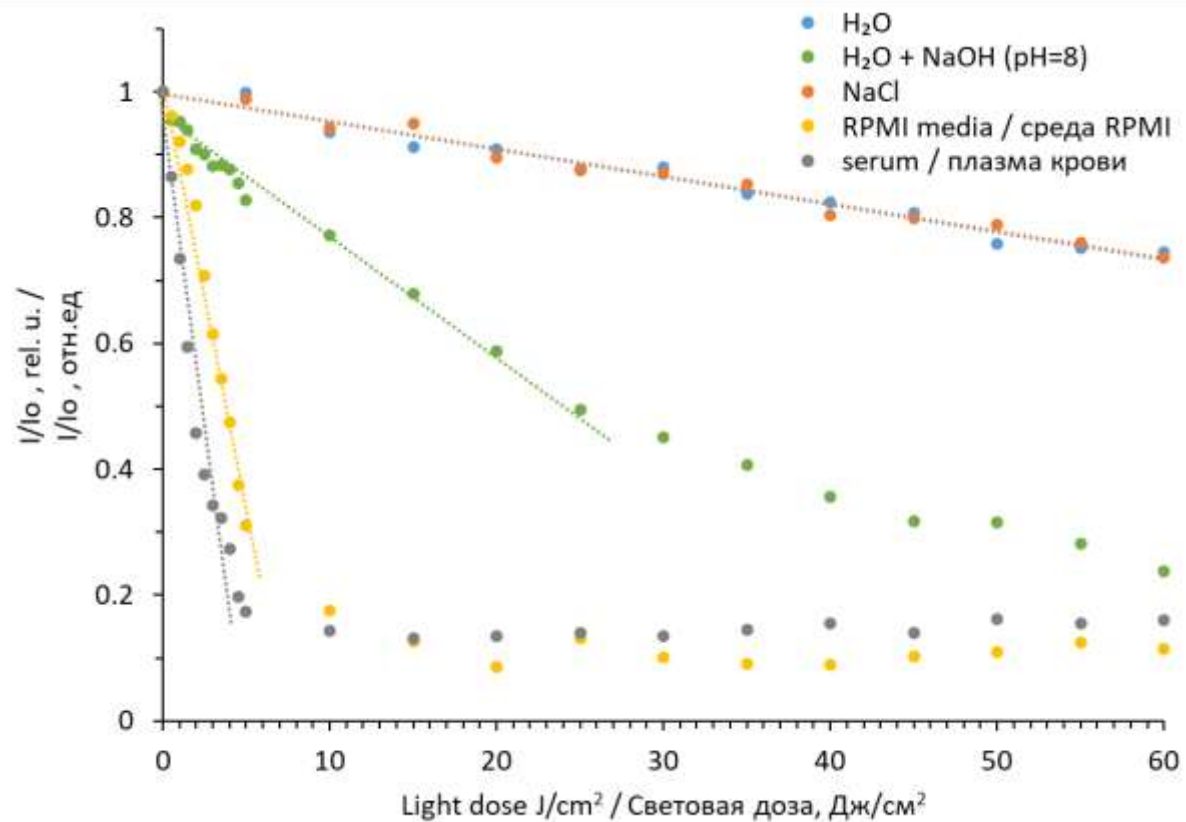
- В воде наблюдается наиболее быстрое увеличение агрегации с увеличением концентрации.
- В плазме крови и среде RPMI соотношение димер/мономер было низким в изученном диапазоне концентраций.

C, mM	τ, нс
0.001	0.3687
0.003	0.3700
0.01	0.3696
0.03	0.3696
0.1	0.3707

c=10μM=3.2мг/кг	τ, нс
EtOH	0.568
H <sub>2</sub> O	0.377
NaCl	0.397
RPMI	0.409
plasma	0.501
lipo	0.504

# Фотообесцвечивание МС

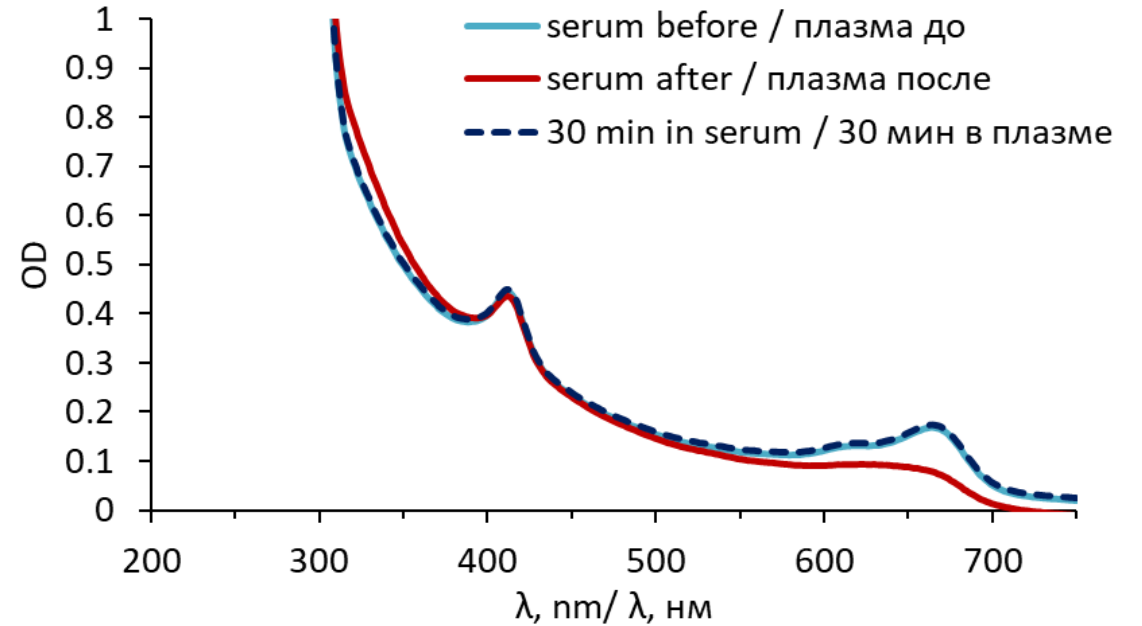
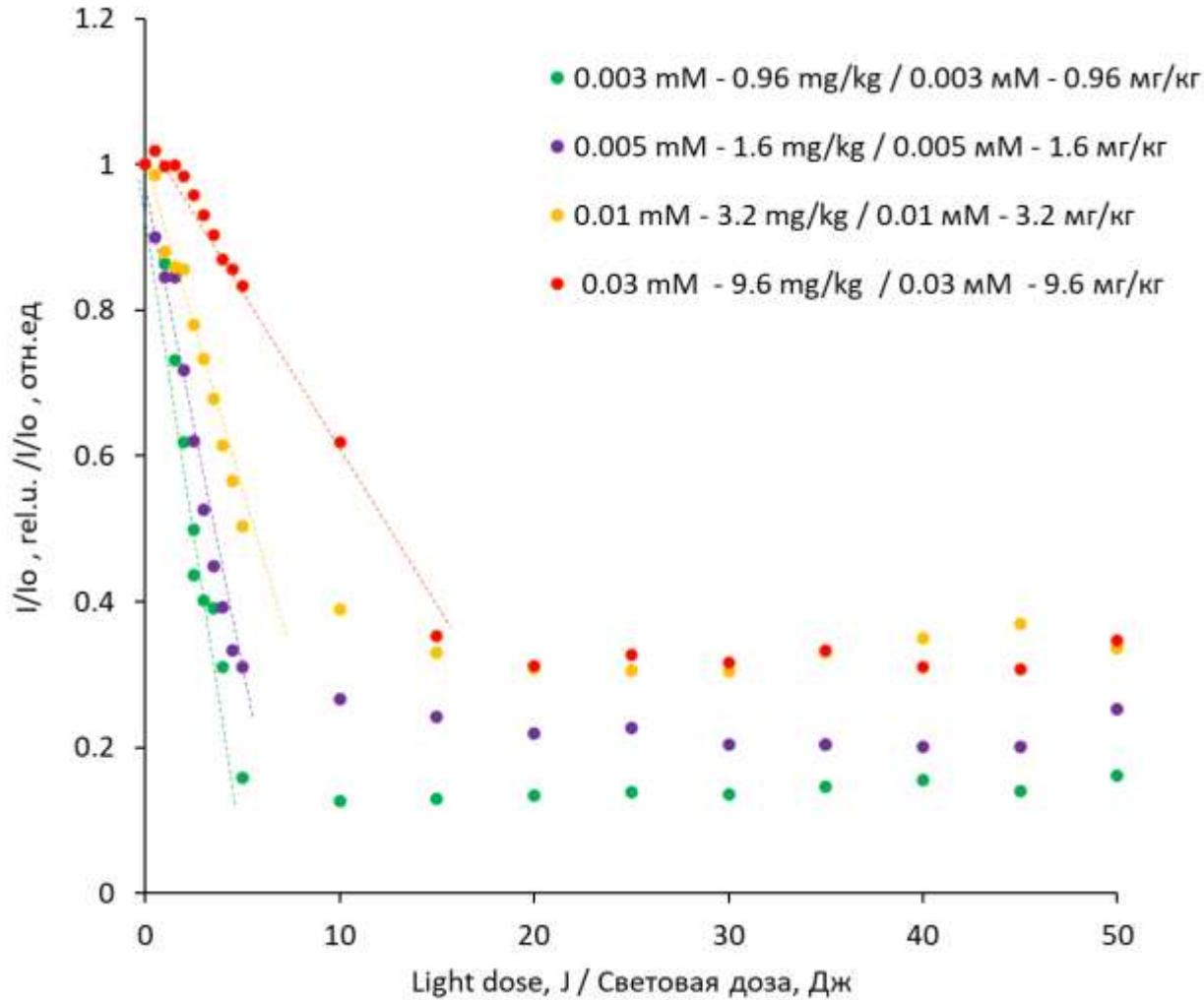
[Bonneau 1975]



Согласно литературным данным, эффективность генерации синглетного кислорода МС в 5 раз выше при pH =9, чем при pH =7

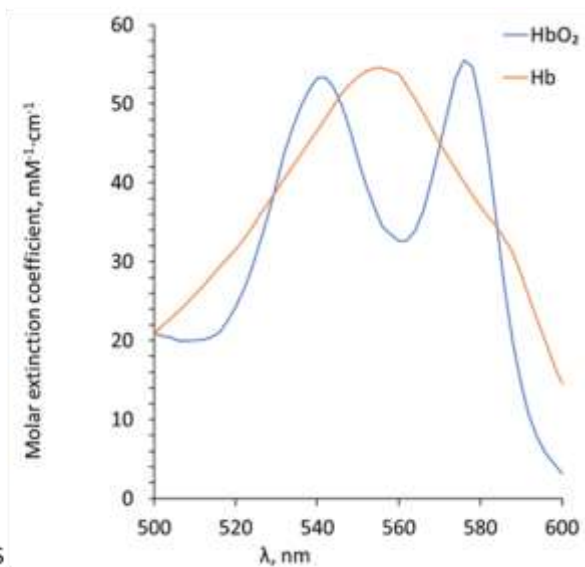
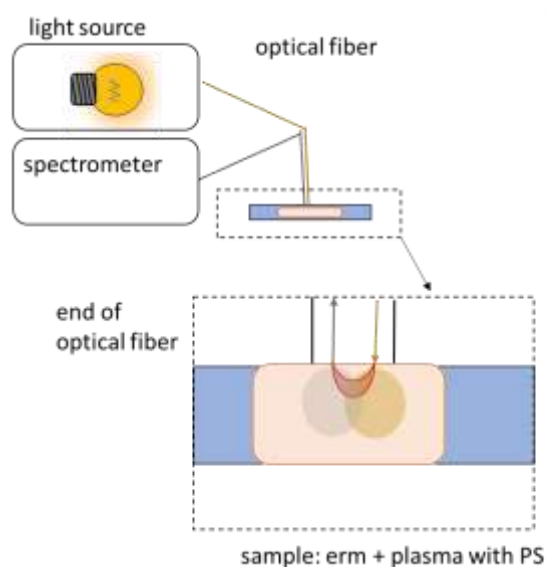
Исследования фотодеградаци в биологических средах показали, что фотообесцвечивание более чем на 80% в плазме и культуральной среде наблюдается уже при дозе 5 Дж/см<sup>2</sup>, в то время как в воде при такой концентрации при дозе 5 Дж/см<sup>2</sup> фотообесцвечивания еще не наблюдается, а при дозе 50 Дж/см<sup>2</sup> фотообесцвечивание МС составляет порядка 30% .

# Фотообесцвечивание в плазме



# Фотодинамическая активность МС *in vitro*

- Квантовый выход генерации синглетного кислорода составляет около 0,5 в этаноле.



Фотодинамическую активность МС изучали *in vitro* спектроскопическими методами путем измерения содержания кислорода в растворе эритроцитов с МС [1].

Измерение оксигенации гемоглобина с использованием спектров диффузного отражения.

Измерение скорости деоксигенации взвеси эритроцитов при ФДТ с МБ (лазерное облучение 660 нм, 250 мВт/см<sup>2</sup>, 10 мин = 150 Дж/см<sup>2</sup>).

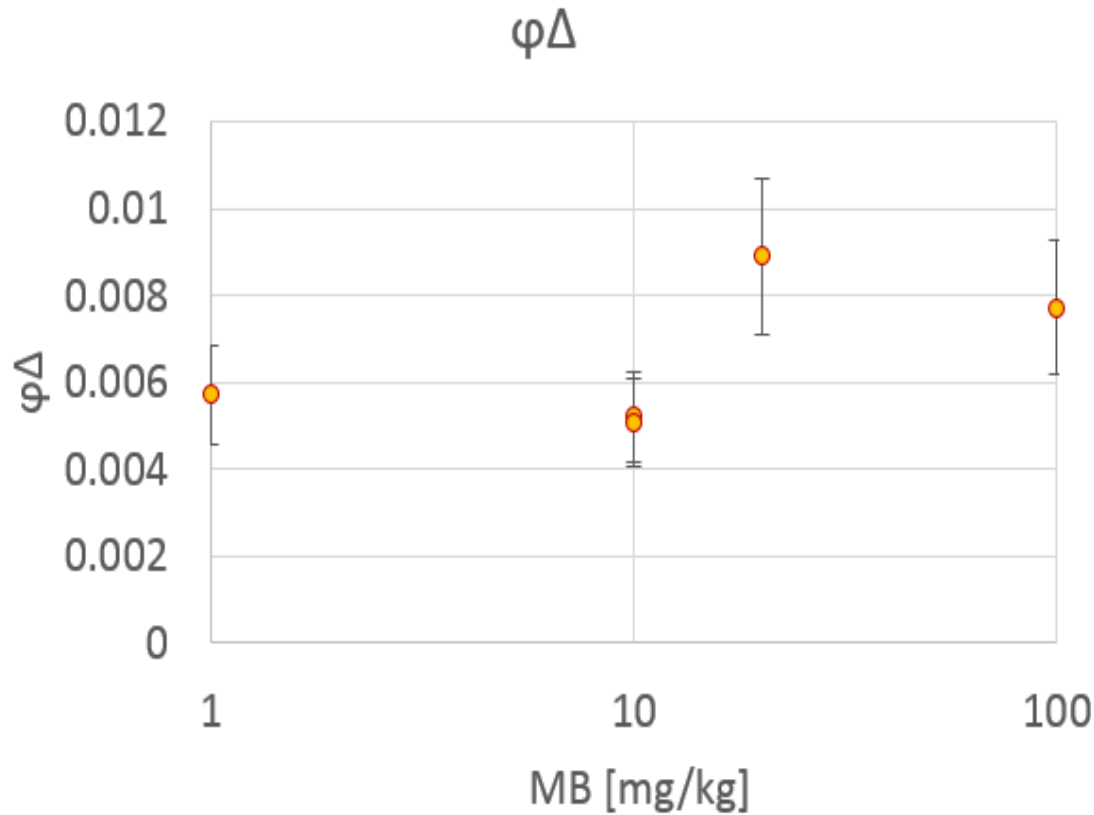
В результате механизма фотосенсибилизации II типа образовавшийся <sup>1</sup>O<sub>2</sub> необратимо реагирует с биологическими молекулами, что приводит к уменьшению растворенного O<sub>2</sub> в образце.

Относительный квантовый выход генерации синглетного кислорода для концентраций МС 1–100 мг/кг был рассчитан путем сравнения с экспериментальными данными для фталоцианина алюминия с известным из литературы квантовым выходом генерации синглетного кислорода в водной среде ( $\phi = 0,38$ ). [2].

[1] Ryabova A. V., Strattonnikov A. A., Loshchenov V. B. Laser spectroscopy technique for estimating the efficiency of photosensitisers in biological media. // Quantum Electronics. – 2006. – Т. 36, № 6. – С. 562–568.

[2] Redmond R. W., Gamlin J. N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules // Photochemistry and Photobiology. 1999. № 4 (70). pp. 391–475

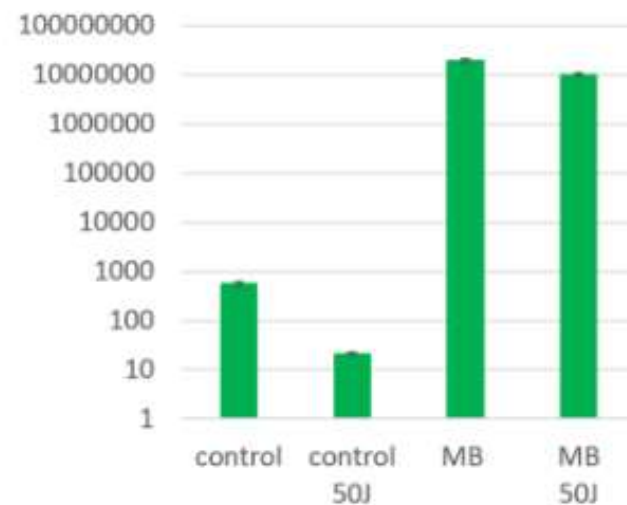
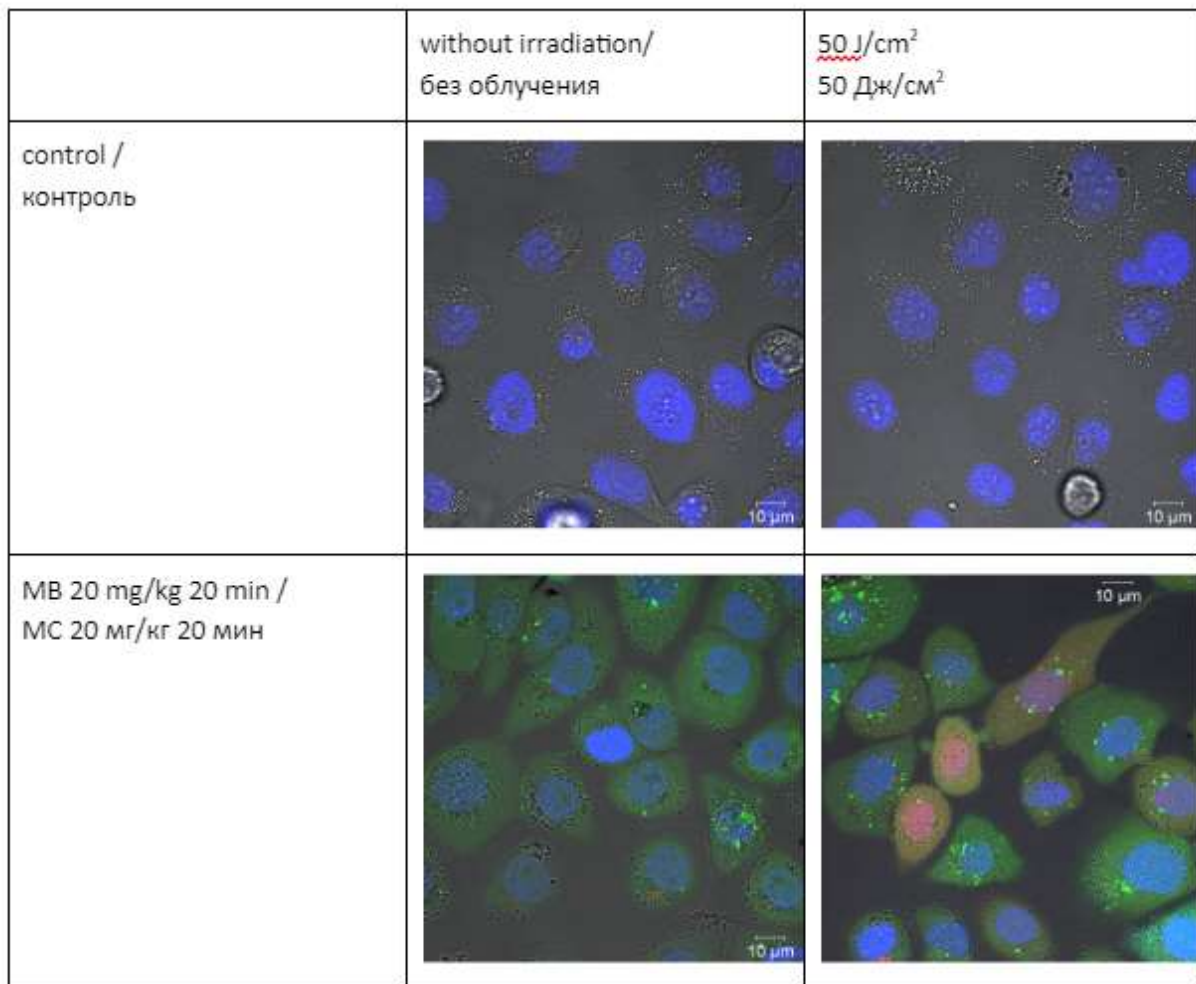
# Фотодинамическая активность МС *in vitro*



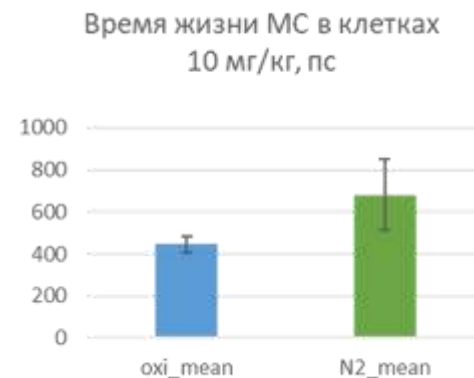
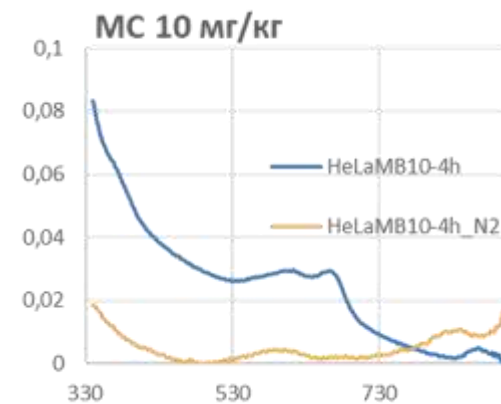
МС	мг/кг	$\phi\Delta$
	1	0.0057
	10	0.0052
	10	0.0051
	20	0.0089
	100	0.0077
Фталоцианин алюминия	10	0.38

- В исследованном диапазоне концентраций МС эффективность генерации синглетного кислорода достаточно низкая. Мы предполагаем, что это обусловлено связыванием положительно заряженного МС с отрицательно заряженными клеточными мембранами, что приводит к изменению типа фотодинамической реакции.

# Генерация АФК, полученная на культуре клеток



Интегральная интенсивность (усреднение по всей картинке) флуоресценции сенсора на АФК LIVE ROS в клетках HeLa после накопления МС и облучения.



Полученные данные о генерации АФК и невысоком квантовом выходе генерации синглетного кислорода подтверждают данные о склонности МС к механизму типа I (перенос электрона с образованием полувосстановленных и полуокисленных радикалов MB+).

# Заключение и выводы

- Проведено спектроскопическое исследование фотофизических свойств МС в водных растворах и биологических жидкостях. Зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции, а также времена жизни флуоресценции. По зависимости интенсивности и формы спектров от концентрации удалось установить диапазоны концентраций МС для исследований *in vitro* и *in vivo* при которых не наблюдается агрегация (до 0.01 мМ, что соответствует 3.2 мг/кг).
- Исследовано фотообесцвечивание МС под действием лазерного излучения. Исследования фотодеградаци в биологических средах показали, что фотообесцвечивание более чем на 80% в плазме и культуральной среде наблюдается уже при дозе 5 Дж/см<sup>2</sup>, в то время как в воде при такой концентрации при дозе 5 Дж/см<sup>2</sup> фотообесцвечивания еще не наблюдается, а при дозе 50 Дж/см<sup>2</sup> фотообесцвечивание МС составляет порядка 30%. Установлено, что в средах, содержащих белки и обладающих щелочным рН, фотообесцвечивание происходит существенно быстрее, чем в нейтральных водных средах. Ионная сила раствора не оказывает влияния на скорость фотообесцвечивания. Такое фотообесцвечивание вызвано фотодеградацией МС, а не переходом в лейкоформу.
- Проведена оценка эффективности генерации синглетного кислорода и фотодинамической активности *in vitro*. В исследуемом диапазоне концентраций МС эффективность генерации синглетного кислорода достаточно низкая, так как положительно заряженный МС связывается с негативно заряженными мембранами клеток, что приводит к изменению типа фотодинамической реакции. Продемонстрировано возникновение в клетках других АФК, отличных от синглетного кислорода. Генерации АФК и невысокий квантовый выход генерации синглетного кислорода свидетельствуют о склонности МС к механизму фотосенсибилизации I типа (перенос электрона с образованием полувосстановленных и полуокисленных радикалов MB<sup>+</sup>), а не к механизму II типа (перенос энергии к кислороду с образованием синглетного кислорода) в биологических средах и *in vivo*.





**Спасибо за внимание!**

*Работа поддержана грантом РФФ ( 22-72-10117)*