

КИЕВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ им. ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

На правах рукописи

УДК 535.33/34  
УДК 543.42; 541.144

Ван Лицзин

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
И ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ЯВЛЕНИЙ В ПОРФИРИНОВЫХ МОЛЕКУЛАХ  
МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Специальность - 01.04.03

радиофизика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Киев - 1992



00691465 (V)

- 2 -

...сполнена в Киевском университете  
им. Тараса Шевченко

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук,  
доцент Голубева Наталия Георгиевна

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
профессор Овандер Лев Николаевич,  
кандидат физико-математических наук,  
доцент Кондиленко Елена Ивановна


Ведущая организация: Институт физики АН Украины

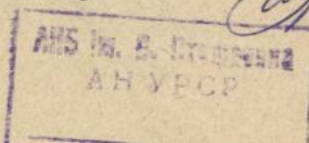
Защита состоится 21 декабря 1992г. в 15.00 часов на за-  
седании специализированного совета К 068.18.01 в Киевском уни-  
верситете по адресу: г.Киев, просп.Глушкова,6, ауд.46 корпуса  
радиофизического факультета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Киевского  
университета.

Автореферат разослан "04" декабря 1992г.

Ученый секретарь  
специализированного совета  
канд. физ.-мат. наук

  
А.Г. Шкавро



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.** Важным аспектом проблемы взаимодействия излучения с веществом является изучение закономерностей взаимодействия лазерного излучения со сложными органическими молекулами. Особый интерес в этом плане представляет анализ фотоиндуцированных процессов в порфириновых молекулах, которые обладают фотосенсибилизирующими свойствами. Применение их в медицине привело к появлению нового направления - фотодинамической терапии опухолей (ФДТ), суть которой состоит в разрушении опухолевых клеток, содержащих фотосенсибилизатор, под действием лазерного облучения. Эффективность лечения существенно зависит от структурных особенностей порфириновых молекул, их взаимодействия друг с другом, с биологическими системами и лазерным излучением. В связи с этим весьма актуальным становится анализ фотоиндуцированных явлений в этих молекулах и их связь с энергетическими и структурными изменениями молекулярных систем.

Кроме того, соединения на основе порфиринового макроцикла широко распространены в живой природе (хлорофилл, гемопротеины) и применяются в технике (металлопорфирины). Поэтому изучение фотофизических, фотохимических свойств порфириновых молекул, их взаимодействия друг с другом позволит расширить возможности их применения и получить материал для развития таких направлений как биоэлектроника и биотехнология.

Уникальное сочетание фотофизических, фото- и биохимических, а также оптических свойств порфиринов позволило использовать для их исследования такие чувствительные и информационные методы как флуоресцентная и колебательная спектроскопия, позволяющие получить информацию об электронных и колебательных состояниях молекулярных систем.

тем, их структурных особенностях и взаимодействии с окружающей средой.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Целью диссертационной работы является исследование фотоиндуцированного явления, характеризующегося изменениями в спектрах флуоресценции и поглощения производных гематопорфирина, при облучении светом; взаимодействия порфириновых молекул друг с другом и биологически активными структурами.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Исследовать спектральные характеристики ПГП при облучении монохроматическим светом с различными длинами волн в разных средах.
- Провести изучение закономерностей фотоиндуцированного явления в ПГП, приводящего к образованию фотопродукта и анализ его свойств;
- Исследовать влияние различных замещений в структуре порфириновых молекул на спектр РКР и провести его интерпретацию.
- Провести анализ электронных и колебательных состояний молекул ПГП и влияния на них света и межмолекулярных взаимодействий.
- Исследовать процессы взаимодействия ПГП с биологически важными молекулами (на примере сывороточного альбумина человека) под действием света.

#### НАУЧНАЯ НОВИЗНА

1. Обнаружена обратимость процесса образования фотопродукта в растворах ПГП под действием света и определен его спектр поглощения. Предложена модель структуры фотопродукта и его электронных состояний.

2. Получены спектры резонансного комбинационного рассеяния (РКР) ряда порфиринов (ТМЭК, ДМЭД, Уб-ТСФП и ПГП) в растворах и

установлены линии наиболее чувствительные к агрегации молекул и взаимодействию с белками.

3. С помощью полиакриламидного геля промоделированы процессы взаимодействия молекул ПГП при их накоплении в клетках.

4. Установлена связь между фотопродуктом, образующимся в ПГП под действием света, и процессом переноса энергии от белка к порфириновым молекулам.

#### ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ.

Представленные в настоящей диссертации результаты носят, в основном, прикладной характер и могут быть использованы при создании новых типов сенсбилизаторов и проведении ФДТ опухолей, а также для решения ряда задач фотобиологии, биохимии и биотехнологии. В частности, на основе наблюдаемых изменений спектральных параметров свечения ПГП при взаимодействии биологически активными молекулами и светом могут быть разработаны системы контроля за ходом фотодинамического лечения. Данные по спектрам РКР могут быть полезны для определения структурных особенностей новых порфириновых соединений при их синтезе. Обнаруженная обратимость процесса образования фотопродукта под действием света может быть использована для создания запоминающих устройств в биоэлектронике.

#### ЗАЩИЩАЕМЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ:

1. Модель процессов образования и разрушения фотопродукта, состоящего из мономера и агрегата, под действием света в ПГП и упрощенная схема его электронных состояний.

2. Результаты исследования спектров РКР и их интерпретация, которые показали, что внутренние колебательные состояния порфири-

нового макроцикла малочувствительны к межмолекулярным взаимодействиям и лазерному облучению образца. Определены линии РКР, связанные с внутренними колебаниями макроцикла, которые чувствительны к замещениям боковых цепей порфириновых молекул. Установлена активизация и изменение некоторых низкочастотных колебаний порфиринов при взаимодействии с САЧ.

3. Установлена связь между процессами образования фотопродукта и передачи энергии между молекулами белка и порфирина при их взаимодействии. Затухание процесса образования фотопродукта в растворах, содержащих белки, обусловлено конкуренцией процессов агрегации молекул ПГП и их взаимодействием с белковыми структурами и разрушением последних под действием синглетного кислорода.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались:

- на III Международной конференции по спектроскопии лазерного светорассеяния и диагностике биологических объектов (Москва, 1990 г.).

- на XI Европейском конгрессе по молекулярной спектроскопии (Загреб - Будапешт, 1991 г.)

- на Международной конференции по фотодинамической терапии и лазерной медицине (Пекин, КНР, 1991 г.)

**ПУБЛИКАЦИИ.** По результатам диссертации опубликовано 6 работ, список которых приведен в конце автореферата.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ.** Диссертация состоит из введения, пяти глав и заключения. Работа изложена на 156 страницах, содержит 40 рисунков, 5 таблиц. В конце диссертации приведен список литературы из 117 наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во ВВЕДЕНИИ обосновывается актуальность темы. Сформулирована цель, научная новизна и практическая ценность результатов работы, а также кратко изложены содержание и структура диссертации.

ПЕРВАЯ ГЛАВА посвящена обзору литературных данных в области изучения структуры и энергетически состояний порфириновых молекул. В ней приведены молекулярные формулы и схемы электронных состояний различных порфириновых молекул, изложены их основные физико-химические свойства и спектральные характеристики. Особое внимание уделено спектральным изменениям, наблюдаемым при изменении свойств среды и облучении светом.

Во ВТОРОЙ ГЛАВЕ описаны методы подготовки образцов, условия и методики проведения экспериментов, схемы экспериментальных установок. Для получения наиболее полной информации об электронных состояниях исследуемых соединений были измерены их спектры поглощения, флуоресценции и ее возбуждения. Измерения проводились на автоматизированном комплексе СДЛ-2. Учитывая сложный характер наблюдаемых спектров и возможное перекрытие полос, для повышения разрешения и более четкого выделения полос был использован метод синхронного сканирования спектров.

Для изучения колебательных состояний порфириновых молекул использовались спектрометры ДФС-52 (для записи спектров комбинационного рассеяния) и "Spectord-80M" (для записи спектров ИК-поглощения). Регистрация спектров флуоресценции, возбуждения и комбинационного рассеяния проводилась с помощью ФЭУ по методу счета фотонов. В качестве источников возбуждения спектров и облучения образцов применялись ксеноновая лампа,  $\text{Ar}^+$  ( $\lambda = 488.0, 496.6, 514.5 \text{ нм}$ ),  $\text{He-Ne}$  ( $\lambda = 0.63 \text{ мкм}$ ) и  $\text{He-Cd}$  ( $\lambda = 441.6 \text{ нм}$ ) лазеры. Все измерения

проводились при комнатной температуре. С целью анализа влияния среды, агрегационных процессов межмолекулярного взаимодействия порфириновых молекул измерения проводились в водных, водно-спиртовых и спиртовых растворах, а также в диметилсульфаксиде в различных концентрациях порфириновых молекул. Исследования осуществлялись только на свежеприготовленных растворах. Для изучения поляризационных свойств флуоресценции ПГП и его фотопродукта, а также для моделирования концентрационных эффектов, имеющих место при накоплении порфириновых молекул в клетках, была разработана методика введения ПГП в полиакриламидный гель "Пластагар" и записи его спектров.

Для анализа процессов взаимодействия порфириновых молекул с биологически активными системами были исследованы водные растворы порфиринов (производных гематопорфирина и иттербиевого тетрасульфофенилпорфирина Yb-ТСФП), содержащие явороточный альбумин человека (САЧ). С целью изучения процессов взаимодействия ПГП с клетками опухоли и лазерным излучением, проводилось инкубирование клеток производными гематопорфирина. Для этого ПГП добавляли в питательный раствор, в котором выдерживали клетки в течение некоторого времени, после чего, с целью удаления не связавшихся с клеточными структурами порфириновых молекул, образец отмывался и направлялся на измерения.

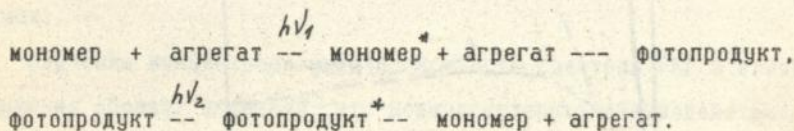
Для получения наиболее полной информации проводилась дополнительная машинная обработка измеренных спектров.

ТРЕТЬЯ ГЛАВА посвящена исследованию фотоиндуцированного явления, наблюдаемого в водных растворах ПГП и характеризующегося появлением фотопродукта с полосой флуоресценции  $\lambda = 640$  нм и дополнительной длинноволновой полосой поглощения  $\lambda = 633$  нм. Показано, что фотопродукт образуется при возбуждении ПГП в полосе Sore и IV поло-

се поглощения и разрушается при облучении образца в длинноволновой полосе поглощения  $\lambda = 633$  нм, причем этот процесс повторяется при последующих облучениях. Таким образом, процесс образования фотопродукта имеет обратимый характер (рис.1).

Исследована зависимость флуоресценции фотопродукта от концентрации порфириновых молекул в растворе. На основании зависимости интенсивности полос флуоресценции ПГП и его фотопродукта (рис.2) выявлена пороговая концентрация образования фотопродукта. Анализ спектров возбуждения и флуоресценции позволил определить полный спектр поглощения фотопродукта в видимой области, который состоит из полос 390, 493, 586 и 633 нм.

Изучение фотоиндуцированных явлений, происходящих в ПГП, введенном в матрицу полиакриламидного геля показало, что по мере сближения порфириновых молекул, находящихся в различных формах (мономер, димеры и т.д.) в процессе уменьшения содержания воды в геле и уменьшения размеров его пор (ячеек), происходит образование молекулярных комплексов со спектральными характеристиками, аналогичными фотопродукту. На основании полученных данных сделан вывод, что фотопродукт представляет собой молекулярный комплекс, образованный из мономера и агрегата. Предложена схема его электронных уровней и механизм его образования, который схематически может быть представлен следующим образом:



Измерение поляризационных характеристик флуоресценции ПГП и фотопродукта в геле показало, что флуоресценция последнего может быть описана моделью плоского осциллятора.

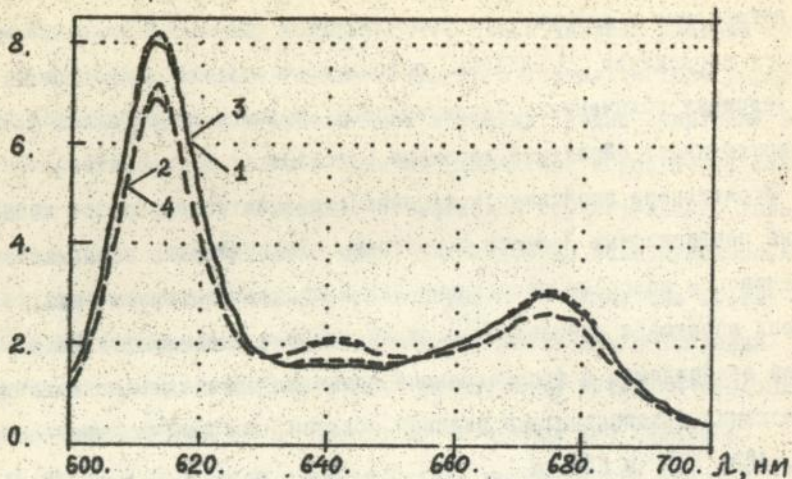


Рис.1. Спектр флуоресценции при повторном облучении светом с  $\lambda = 633$  нм, 400 нм.  
(1), (3) - после облучения светом с  $\lambda = 400$  нм,  
(2), (4) - после облучения светом с  $\lambda = 633$  нм.

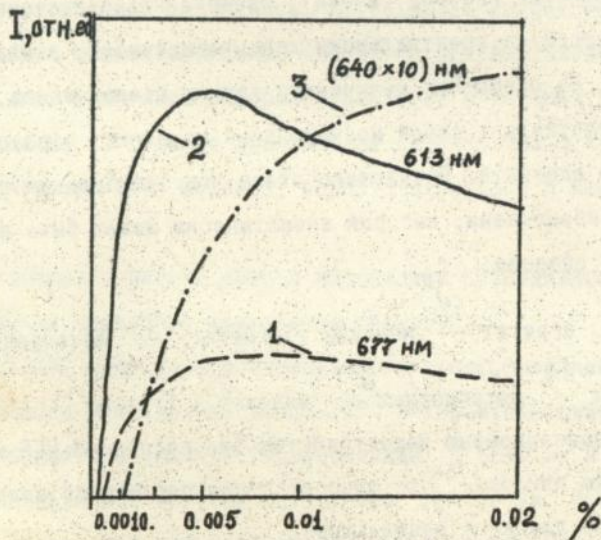


Рис.2. Зависимость интенсивности флуоресценции ПВП (1), (2) и его фотопродукта (3) от концентрации ПВП в растворе.

ЧЕТВЕРТАЯ ГЛАВА посвящена исследованию колебательных состояний порфириновых молекул и влиянию на них изменений боковых заместителей, межмолекулярных связей и облучения. Для этого были изучены спектры резонансного комбинационного рассеяния молекул ПП, диметилового эфира дейтеропорфирина (ДМЭД), тетраметилового эфира копропорфирина (ТМЭК) и Yb-тетрасульфопенилпорфирина (Yb-ТСФП), а также ИК спектры первых трех соединений.

На основании анализа полученных данных и сравнения их с результатами исследования других порфириновых молекул проведена предварительная интерпретация линий РКР изучаемых соединений. Показано, что внутренние колебания порфиринового макроцикла в области  $1000-1650 \text{ см}^{-1}$  в целом малочувствительны к изменениям боковых заместителей в Н-положениях. Влияние боковых заместителей в большей степени проявляется в области ниже  $1000 \text{ см}^{-1}$ , где находятся колебания, связанные с деформациями пиррольных колец и смещением отдельных фрагментов порфиринового макроцикла друг относительно друга. В спектрах РКР обнаружена широкая структурная полоса в области  $500 \text{ см}^{-1}$ , которая по-видимому обусловлена колебаниями агрегированных порфириновых молекул. В пользу этого свидетельствует изменение ее структуры и интенсивности при переходе к водно-спиртовым и спиртовым растворам, где молекулы существуют в основном в мономерных формах.

Изучение концентрационной зависимости спектров РКР и влияние облучения образца показало, что межмолекулярное взаимодействие и воздействие излучения не приводят к существенному изменению внутренних колебаний порфиринового макроцикла, а проявляются лишь в области низких частот.

Влияние атомов металла и замещений в мезо-положениях порфири-

нового макроцикла на колебательные состояния порфириновых молекул анализировались на основе измерений спектров  $\text{Yb-TСФП}$ . На основе сравнения его спектров РКР с данными по спектрам ТФП,  $\text{Cu-TФП}$ ,  $\text{Cu-порфина}$  и порфина было проведено предварительное отнесение наблюдаемых линий. Установлено, что замещения в мезо-положениях сильнее влияют на колебания порфиринового макроцикла, чем замещения в положениях 1-8. Проведено исследование спектров РКР ПГП и  $\text{Yb-TСФП}$  при их взаимодействии с САЧ. Обнаружено, что спектр внутренних колебаний этих молекул выше  $1000 \text{ см}^{-1}$  изменяется незначительно, а в низкочастотной области происходит активизация колебаний 109, (ПГП) и 109, 115, 265, 628  $\text{см}^{-1}$  ( $\text{Yb-TСФП}$ ) (рис.3, 4).

В ПЯТОЙ ГЛАВЕ изложены результаты исследования спектров флуоресценции и ее возбуждения водных растворов ПГП, содержащих САЧ, а также данные по спектрам опухолевых клеток, инкубированных ПГП. Изучено влияние на них лазерного излучения и концентрации ПГП. Установлено, что при взаимодействии ПГП с САЧ происходит сдвиг полос в длинноволновую область. В спектрах возбуждения ПГП появляется полоса в области 250-300 нм. Спектральное положение и зависимость интенсивности этой полосы от концентрации молекул ПГП и САЧ позволяет связать ее с передачей энергии в комплексе САЧ-порфирин. Показано, что в растворах, содержащих САЧ, процесс образования фотопродукта носит затухающий характер, который зависит от концентрации кислорода в растворе. Изменения в интенсивностях полос флуоресценции фотопродукта  $\lambda = 654 \text{ нм}$  и полосы передачи энергии  $\lambda = 292 \text{ нм}$ , а именно возрастание первой и уменьшение второй при облучении образца в сине-зеленой области спектра ( $\lambda = 488.0, 441.6 \text{ нм}$ ) (рис.5) свидетельствует о конкуренции процессов взаимодействия молекул ПГП друг с другом и с САЧ. Уменьшение интенсивности указан-

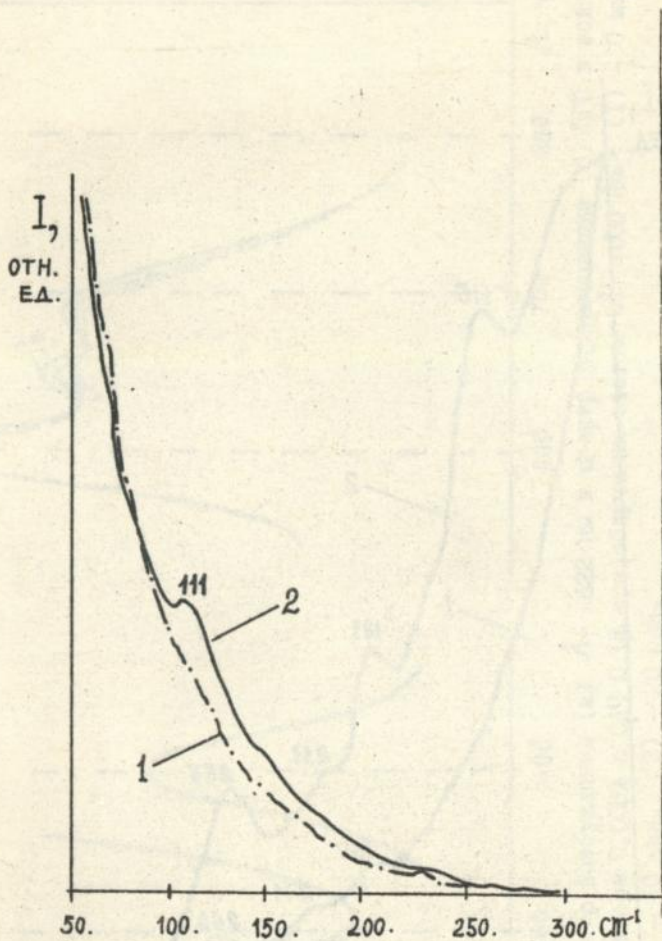


Рис.3. Спектр КР ПВП и ПВП + САЧ (1) и (2) соответственно, при возбуждении  $\lambda = 488$  нм.

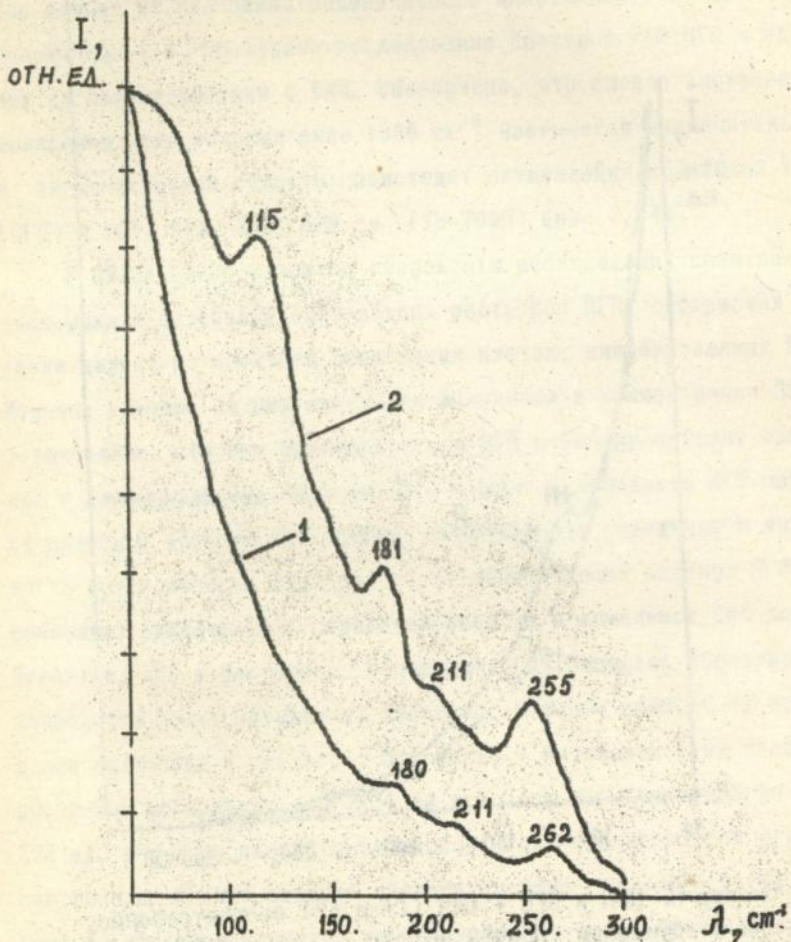


Рис. 4. Спектр КР  $\gamma_B$ -ТСФП (1) и  $\gamma_B$ -ТСФП+ альбумин (2) при возбуждении  $\lambda = 441,6$  нм.

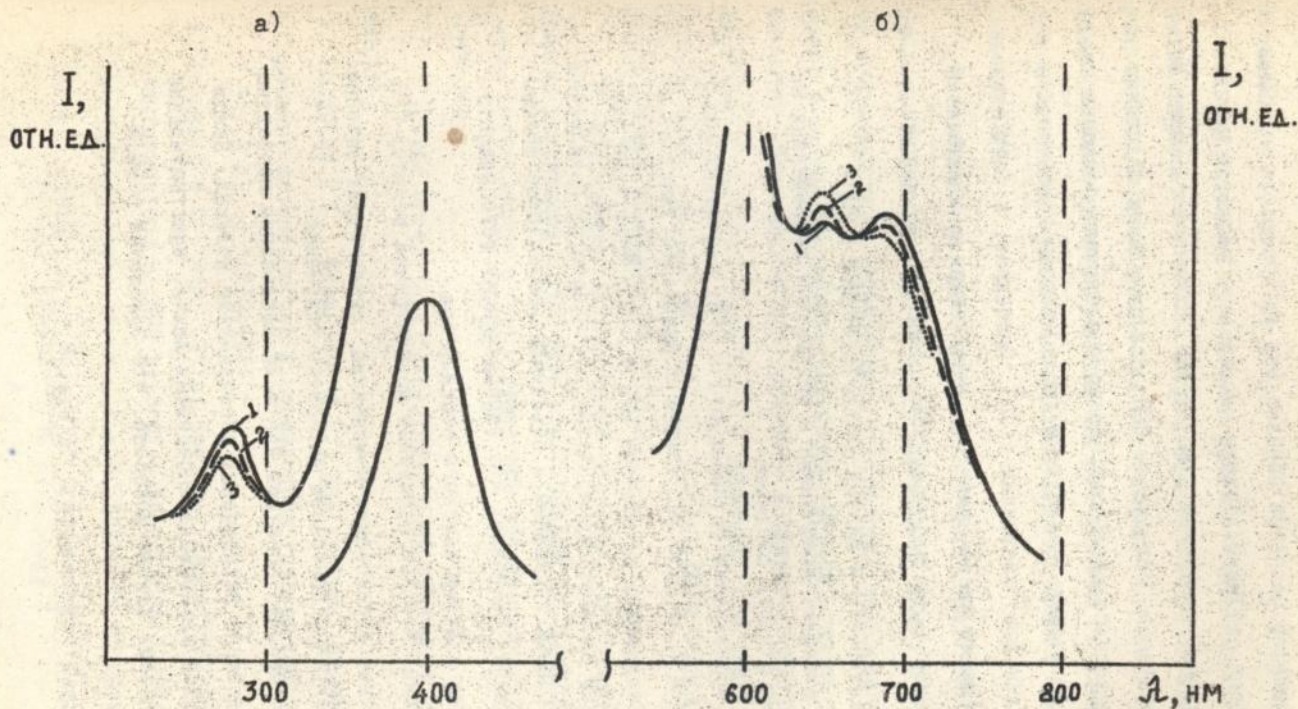


Рис.5. ... Спектр возбуждения (а)  $\lambda_p = 622$  нм и спектр флуоресценции (б) ПП в водном растворе 0,005% с САЧ 0,1% при облучении светом  $\lambda = 400$  нм: (1) - 0 мин., (2) - 10 мин., (3) - 20 мин.

ных выше полос при облучении образца красным светом ( $\lambda = 633$  нм) и затухающий характер процесса образования фотопродукта и зависимость этих явлений от концентрации кислорода в растворе указывает на фотодеструктивные изменения в молекулах. Причиной их может быть образование в растворе, содержащем ПГП, под действием облучения с  $\lambda = 633$  нм, синглетного кислорода, который разрушает белковые структуры, что в свою очередь приводит к деструктивным изменениям в порфириновых молекулах, связанных с САЧ. Последнее, в свою очередь, приводит к уменьшению числа молекул, участвующих в образовании фотопродукта и уменьшению интенсивности полос его флуоресценции.

#### ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

К основным выводам, полученным в результате проведенных исследований, можно отнести следующие:

1. Процесс образования фотопродукта в ПГП, флуоресцирующего в водных растворах с  $\lambda = 640$  нм, связан с взаимодействием мономерной и агрегированной форм молекул ПГП и носит обратимый характер. На основании анализа спектральных характеристик предложена модель его электронных состояний и объяснены наблюдаемые фотоиндуцированные явления. Показано, что флуоресценция фотопродукта может быть описана моделью плоского осциллятора.

2. Установлено, что при повышении концентрации молекул ПГП в растворах возможно образование комплексов, аналогичных фотопродукту, возникающему под действием лазерного облучения.

3. На основе анализа спектров РКР и ИК поглощения проведена интерпретация колебаний исследуемых порфириновых молекул. Среди внутренних колебаний макроцикла определены линии, чувствительные к замещениям в боковых цепях. Показано, что замещение в мезо-

положениях сильнее влияет на спектр кольца, чем замещение в положениях.

4. Установлено, что межмолекулярные взаимодействия и лазерное облучение мало влияет на внутренние колебания порфиринового макроцикла, а проявляются при колебаниях, связанных с его деформацией и смещениями его отдельных фрагментов. Выявлена активизация некоторых низкочастотных колебаний порфиринов при взаимодействии с САЧ.

5. Установлена связь между процессами образования фотопродукта и передачей энергии между молекулами белка и порфирина при их взаимодействии. Обнаружено, что процесс образования фотопродукта в водных растворах, содержащих ППП+САЧ, носит затухающий характер. Это связано с разрушением белковых структур синглетным кислородом, который образуется в образцах, под действием облучения красным ( $\lambda = 633$  нм) светом, что, в свою очередь, приводит к разрушению порфириновых молекул.

6. Проведенные исследования показали, что спектры флуоресценции порфиринов могут быть использованы для контроля за процессами, протекающими в биосистемах при фотодинамической терапии опухолей.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Голубева Н.Г., Великанов А.О., Ван Лицин, Скрипченко Б.А. Исследование фотопроцессов в производных гематопорфирина. УФЖ, 1990, Т.35, N 12, с. 1812-1817.
2. Golubeva N.G., Wang Lijin. Spectral characteristic and Phototransformations of HPD molecules in aqueous solution and at the interaction human serum albumin. Abstracts of paper of XX European Congress on Molecular Spectroscopy. Zagreb-Budapest,

АН УРСР

Yugoslavia - Hungary, 25-30 August 1991, p.77

3. Golubeva N.G., Wang Lijun. RRS spectra of hematoporphyrin derivatives. The 3-rd International Conference on Laser Scattering Spectroscopy Diagnostics of Biological Objects. Book of Abstracts, V.2, p.15. Moscow 1990.
4. Голубева Н.Г., Миронов А.Ф., Ван Лицзин, Вебляя Т.С. Исследование колебательных состояний некоторых порфириновых молекул. УФЖ, 1992, т.37, N 2, с. 86-93.
5. Golubeva N.G., Wang Lijun. Resonance Raman spectra of HPD. Proc. SPIE 1990, v. 1403, p. 134-138.
6. Golubeva N.G., Wang Lijun, Spark I.U., Gordienko U.I., Velikanov A.O. Spectral Characteristics and Interactions of Hematoporphyrin Derivatives with Biological Objects.// Abstracts of International Conference of Photodynamic therapy and laser medicine. Beijing, China, October 15-17, 1991, p.150.

469131

Ab 26.272

**AB 26.272**