

Магистрант ИФФ М.А.Умарова,  
научн. рук. д.ф-м.н. Ш.К.Нематов,ТашГТУ

### СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО - ПЕРСПЕКТИВНОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

*Ушбу мақолада турли концентрациядаги метилен сувли эритмасининг абсорбцион-флуоресцент хоссалари тадқиқ этилган. Метиленнинг спектрал характеристикалари ёрдамида ушбу молекулаларнинг эритмадаги олигомерларга боғланиши ва метахромизм характерининг пайдо бўлиши имкониятлари ўрганилган. Абсорбцион-флуоресцент характеристикалари ёрдамида метилиннинг антимикробли фотодинамик терапияда фотосенсибилизатор сифатида қўлланилиши имкониятлари кўрсатиб ўтилган.*

*В работе рассматриваются абсорбционно-флуоресцентные свойства водного раствора метиленового синего различных концентраций. Показаны на основе спектральных характеристик связывание молекул метиленового синего в олигомеры в растворе и характер проявления метахромизма. Представлены возможности применения метиленового синего в качестве фотосенсибилизатора для антимикробной фотодинамической терапии по абсорбционно-флуоресцентным характеристикам.*

*In the paper absorption-fluorescent properties of different concentrations of an aqueous solution of methylene blue have been studied. According to the spectral characteristics of methylene blue, the ability of these molecules binding to oligomers in solution and the character of the manifestation of metachromism has been studied. By the absorption-fluorescence characteristics the possibilities of using methylene blue as a photosensitizer for antimicrobial photodynamic therapy are shown.*

В последние годы, наряду с двумя важнейшими областями применения лазерного излучения в клинической практике - низкоинтенсивной стимулирующей терапией и высокоэнергетической хирургией, появилось новое направление современной медицины- фотодинамическая терапия (ФДТ)[1]. ФДТ является принципиально новым методом лечения злокачественных опухолей и основывается на способности специальных молекул - фотосенсибилизаторов при их возбуждении лазерным излучением переводить рядом находящиеся атомы кислорода в синглетное возбужденное состояние с сильно цитотоксическим действием. Избирательное накопление фотосенсибилизатора в злокачественных клетках позволяет разрушать именно последние, облучая соответствующие части человеческого тела лазерным излучением, а сопровождающаяся при этом флуоресценция фотосенсибилизатора в длинноволновой области – диагностировать и локализовать область расположения опухолей [2]. Наряду с онкологией, ФДТ успешно применяется также и в антибактериальной терапии, особенно, при устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антибактериальным препаратам [3].

В настоящее время во многих научных центрах мира идет активный поиск новых, перспективных в качестве фотосенсибилизаторов ФДТ веществ и изучение их цитобиологических, биохимических, а также спектрально-кинетических свойств [4]. Краситель феноксиазинового ряда - метиленовый синий (МС) характеризуется важнейшими для ФДТ свойствами: низкая токсичность применения, избирательное накопление в злокачественных клетках, высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода и

достаточно длинноволновое положение полосы возбуждения (665 нм), обеспечивающее глубокое проникновение возбуждающего излучения в ткани. Плоская гетероциклическая структура молекулы МС обуславливает интенсивное взаимодействие с белками, нуклеиновыми кислотами и, как следствие, высокую биологическую активность. Благодаря таким свойствам МС применяют в качестве молекулярного зонда в биополимерах; для окрашивания микробов и вирусов; а его чувствительность к структуре и конформационному состоянию окружающих биомолекул дает возможность контролировать деструкционные и конформационные изменения в ДНК и белках [5,6].

Кроме того, МС является высокоэффективным сенсбилизатором для преобразователей солнечной энергии [7], катализатором окислительных реакций [8], проявляет сильно выраженный электрохромный эффект [9], а также может использоваться в качестве активного элемента лазера на красителе [10]. Учитывая такие свойства, оптические и молекулярные свойства МС в последние годы активно изучаются.

В настоящей работе исследованы абсорбционно-флуоресцентные свойства водного раствора МС различных концентраций. По спектральным характеристикам МС изучена способность молекул МС связывания в олигомеры в растворе, характер проявления метакромизма. Показаны возможности применения МС в качестве фотосенсбилизатора для антимикробной фотодинамической терапии по их абсорбционно-флуоресцентные характеристики.

Водный раствор МС (Sigma-Aldrich, США) был приготовлен с первичной концентрацией  $10^{-3}$  М, который оставался стабильным не менее 3-4 дней в темноте при температуре 4°C. Более низкие концентрации раствора были получены добавлением в раствор бидистиллированной воды.

Спектры поглощения растворов МС различной концентрации и взвесей бактерий, впитавших ее при соответствующих концентрациях, измерялись в кварцевых кюветах объемами 5, 2, 1 и 0.5 мл с помощью высокочувствительного спектрофотометра ShimadzuUV-1280 (Shimadzu, Япония, 2015г.). Измерения производились при температуре 22°C.

Спектры флуоресценции измерялись на оригинальной экспериментальной установке, включающей в себя импульсный азотный лазер УФ-излучения ( $\lambda=337$  нм,  $f=10$  Гц,  $\tau=8$  нсек,  $P=10^5$  Вт), двухканальный бокскаринтегратор BCI-280 (ENDIM, Германия) с длительностью измеряющего гейта 0,2 нсек. и монохроматор МДР-23 (ЛОМО, Россия) со спектральным разрешением 0,2 нм [13].

Самоассоциация МС в водном растворе. Как известно, с увеличением концентрации ароматического красителя в растворе происходит изменение спектра его поглощения с появлением новых полос и смещением максимумов в длинноволновую или коротковолновую стороны, что относят к возникновению димеров, тримеров или олигомеров более высокого порядка [14]. Относительные доли олигомеров соответствующего порядка определяются концентрацией и структурой молекул красителя и химической природой раствора. Образование олигомеров можно описать химическими реакциями поэтапно или всеобщей агрегации:



где  $n$  – число мономеров  $MS^+$  или порядок агрегации МС. Реакции (1) и (2) характеризуются постоянными скорости поэтапной или всеобщей агрегации, выражаемыми уравнениями (3) и (4), соответственно:

$$K_n = [CD_n^{n+}] / [CD_{n-1}^{(n-1)+}] \cdot [CD^+] \quad (3)$$

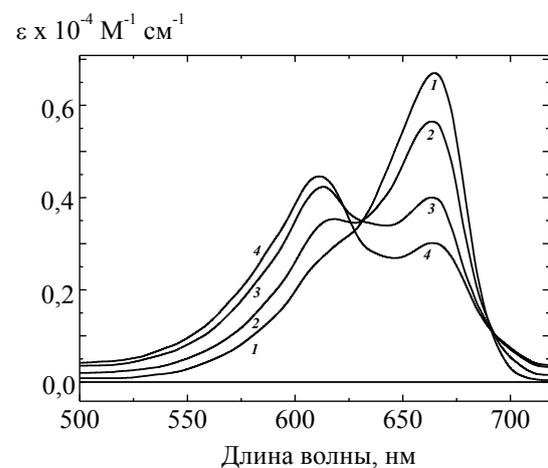
$$\beta_n = [CD_n^{n+} / CD^+]^n, \quad (4)$$

где  $K_n$  – пошаговые и  $\beta_n$  – общие постоянные скорости равновесной агрегации. Соотношения между  $\beta_n$  и  $K_n$  определяются как  $\beta_2 = K_2$ ;  $\beta_3 = K_2K_3$ ;  $\beta_4 = K_2K_3K_4$ . При этом полная концентрация МС определяется выражением:

$$C_{CD} = \sum_{n=1}^4 n [CD_n^{n+}] \quad (5)$$

Постоянные поэтапной агрегации МС согласно литературным данным [15] при температуре 22<sup>0</sup>С составляют  $K_2=2,1 \cdot 10^3$  дм<sup>3</sup>/моль;  $K_3=4 \cdot 10^3$  дм<sup>3</sup>/моль и  $K_4=2,1 \cdot 10^3$  дм<sup>3</sup>/моль. Учитывая это и уравнения (3), (4) и (5) можно рассчитать содержание димеров и полимеров более высокого порядка. С увеличением концентрации МС в дистиллированной воде, С, при С = 2,5 · 10<sup>-6</sup> М начинают образовываться димеры, а при С = 3 · 10<sup>-5</sup> М – тримеры. При С ≈ 10<sup>-3</sup> М содержание димерных молекул насыщается на уровне 30%, а содержание тримера составляет около 15%.

На рис. 1 показаны спектры поглощения водного раствора МС различной концентрации, измеренные в спектральной области 400 – 800 нм. При увеличении концентрации, в спектре поглощения, кроме основной полосы поглощения, относящейся мономеру МС с максимумом при 665 нм, можно наблюдать постепенно возрастающую полосу с максимумом при 610 нм, а также слабовыраженные полосы при меньших длинах волн. Действительно, как показывает вышеприведенный анализ, если при низких концентрациях (С = 5 · 10<sup>-6</sup> М) на фоне интенсивного пика поглощения мономера МС слабо выражен пик, соответствующий

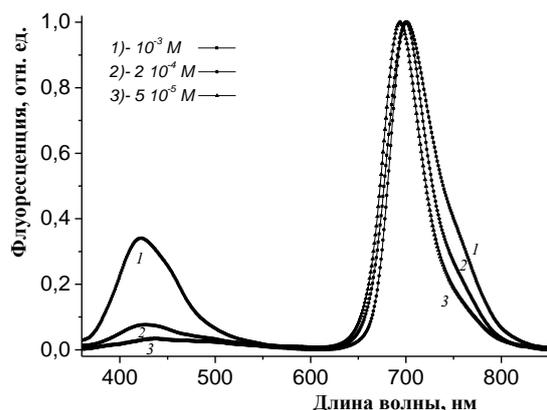


**Рис.1.** Спектры поглощения водного раствора МС различной концентрации (1) 1,3 · 10<sup>-5</sup> М, (2) 5 · 10<sup>-5</sup> М, (3) 2 · 10<sup>-4</sup> М, (4) 10<sup>-3</sup> М

димерной молекуле, то с увеличением концентрации последний растет и при С=10<sup>-4</sup> М интенсивности полос при 665 нм и 605 нм имеют одинаковый порядок. При этом положение максимума полосы при 665 нм практически не изменяется. Характерные изменения спектров с изменением концентрации - прохождение кривых через одну и ту же точку («изобестная точка» при 630 нм), свидетельствующие о бинарном характере смеси (присутствие только мономерных и димерных молекул МС) в растворе, наблюдаются вплоть до С = 2 · 10<sup>-4</sup> М и в дальнейшем, из-за возникновения заметного количества полимеров молекул МС более высокого порядка, не имеют место. Отметим, измеренная нами величина коэффициента экстинкции 3,7 · 10<sup>4</sup> М см<sup>-1</sup>, соответствующая «изобестной точке» в водном растворе МС неплохо согласуется с литературными данными [16].

На рис. 2 представлены спектры флуоресценции водного раствора МС при различных концентрациях 10<sup>-3</sup> М (кривая 1), 2 · 10<sup>-4</sup> М (кривая 2) и 5 · 10<sup>-5</sup> М (кривая 3), измеренные при возбуждении УФ излучением 337 нм (спектры нормированы по длинноволновым максимумам). Интенсивность полосы флуоресценции в коротковолновом диапазоне с максимумом при 415 нм, где нет заметных потерь, растет пропорционально количеству молекул МС в единице объема (т.е. концентрации) [17]. В длинноволновом же диапазоне, интенсивная полоса с максимумом около 700 нм с ростом концентрации МС в растворе претерпевает небольшое увеличение длины волны максимума, которое можно

объяснить спектральным сдвигом на краю высокоинтенсивной полосы поглощения мономерных молекул с максимумом при 665 нм. Отметим, взаимная конкуренция роста



**Рис.2.** Спектры флуоресценции водного раствора МС при различных концентрациях, измеренные при возбуждении УФ излучением (337 нм)

флуоресценции мономера и димера МС (700 и 750 нм, соответственно) методом разложения в гауссовы составляющие экспериментально измеренных спектров флуоресценции МС различных концентраций с помощью процедуры FMP (FitMultiplePeak) программного пакета Origin 8 были определены вклады в общую флуоресценцию мономерных и димерных молекул. Отметим, что даже при высоких концентрациях МС и, соответственно, димерных молекул, как это видно по спектрам поглощения на рис. 1, интенсивность полосы флуоресценции димерных молекул при 750 нм достаточно низкая и это можно объяснить интенсивным тушением возбуждения димера за счет внутренней конверсии.

Сильное стэкинг-взаимодействие между молекулами МС, вызванное их плоской структурой, обуславливает склонность к образованию димеров и более высокого порядка олигомеров МС [16], а это, в свою очередь, значительно усложняет абсорбционно-флуоресцентные спектры и вышеупомянутые качества МС могут претерпеть значительные изменения. Например, сильный спад светочувствительности, связанный с тушением электронного возбуждения в димерах МС из-за внутренней конверсии качественно изменяет спектры флуоресценции [17]. Но, с другой стороны, образование олигомеров МС и их агрегация со сложными молекулами может служить модельным объектом для изучения природы стэкинг- и электростатического взаимодействия в молекулярных комплексах.

Для практической реализации антимикробной ФДТ необходимо обеспечить эффективное внедрение фотосенсибилизатора в микроорганизмы [18].

Водный раствор МС, как широко применяемого красителя фенотиазинового ряда, проявляет интересные абсорбционно-флуоресцентные свойства: с увеличением концентрации хромофора при достаточно низких концентрациях наблюдается образование димеров и олигомеров более высокого порядка. Причем, если по спектрам поглощения можно отслеживать появление очередного олигомера, то в спектрах флуоресценции это затруднено из-за тушения флуоресценции в димерах.

Исследованы возможности применения МС в качестве фотосенсибилизатора для антимикробной ФДТ. Изучение спектральных характеристик МС в водном растворе различной концентрации, представляет интерес с точки зрения выявления физических механизмов агрегации и дает важную информацию для практического применения такого хромофора в антимикробной ФДТ. Способность МС специфически окрашивать определенные микробы внутри клетки, образуя агрегаты с их белками, может также найти применение в экспериментальной цитологии.

флуоресценции и поглощения с ростом количества молекул МС в единице объема (т.е. концентрации) приводит, в конечном счете, к тому, что при многократном изменении концентрации, в отличие от коротковолновой флуоресценции, интенсивность длинноволновой полосы флуоресценции практически не изменяется, но при высоких концентрациях на длинноволновом краю постепенно вырастает дополнительный пик, которого следует отнести флуоресценции димера. Основываясь на литературных данных по длинам волн максимумов полос

## Литература

1. Wilson B.C., Patterson M.S. (2008). The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* **53**. R61-R109.
2. Fujimoto B.S., Clendenning J.B., Delrow J.J., Heath P.J., Schurr M. (1994). Fluorescence and photobleaching studies of methylene blue // *J. Phys. Chem.* **98**. 6633-6643.
3. Wainwright V. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **42**, 13–28.
4. Zakhidov E.A., Kokhkharov A.M., Nematov Sh.Q. (2011). Effect of molecular surrounding to spectral characteristics of chlorophylls – the perspective PDT photosensitizers // *Uzbek Journal of physics.* **13**, No3. 160-168.
5. Veselkov A.N. (2002). Anti-Cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives. Sevastopol. Ukraine. SNTU press. 260 p.
6. Zhang L.Z., Cheng P. (2004). Study of Ni(II) ion-DNA interactions with methylene blue as fluorescent probe // *J. Inorganic Biochem.* **98**, 569-574.
7. Kamat P.V., Lichtin N.N. (1981). Electron transfer in the quenching of protonated triplet methylene blue by ground-state molecules of the dye // *J. Phys. Chem.* **85**. 814-818.
8. YeJ., Baldwin P.R. (1988). Catalytic reduction of myoglobin and hemoglobin at chemically modified electrodes containing methylene blue. *Anal. Chem.* **60**. 2263-2268.
9. Ohtani M., Kuwabata S., Yoneyama H.J. (1997). Electrochemical oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at Au electrodes modified with phenothiazine derivative monolayers *Electroanal. Chem.* **422**. 45-54.
10. Braslavsky S., Gensch T. (1997). Volume Changes Related to Triplet Formation of Water-Soluble Porphyrins. A Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy (LIOAS) Study // *J. Phys. Chem.* **B101**. 101-108.
11. Valikhanov K.M., Zakhidov E.A., Zakhidova M.A., Kasymdzhanov M.A., Kurbanov S.S., Nematov Sh.K., Khabibullaev P.K. (2002). Kinetics of Photoinhibition and Delayed Fluorescence in the Plant Photosynthetic System // *Doklady biochemistry and biophysics.* **387**, 331-334.
12. Tafulo P.A.R., Queiros R.B., Gonzalez-Aguilar G. (2009). On the “Concentration-driven” methylene blue dimerization. *Spectrochimica Acta Part A* **73**, 295-300.
13. Patil K., Pawar R., Talap P. (2000). Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu<sub>4</sub>NBr and urea // *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 4313-4317.
14. Ghosh A.K., Mukerjee P. (1970). Multiple association equilibria in the self-association of methylene blue and other dyes // *Journal of the American Chemical Society*, **92**, 6408-6412.
15. Moore J.W., Pearson R.G., Frost A.A. *Kinetics and Mechanisms*. John Wiley and Sons, 3rd Ed, 1981. P.49.
16. Klika Z., Pustkova P., Praus P., Kovar P., Posposil M., Maly P., Grygar T., Kulhankova L., Capkova P. (2009) Fluorescence of reduced charge transfer complexes with methylene blue: Experiments and molecular modeling. *Journal of Colloid Interface Science.* **339**. 416-423.
17. Elena R., Giulo J. (1998). *Rev. Chem. Intermediates.* **10**, 260.
18. Zakhidov E.A., Zakhidova M.A., Kasymova K.R., Kokhkharov A.M., Kuvondikov V.O., Nematov Sh.K., Sadykov R.A., Sadykov R.R., Saparbaev A.A. (2012). Study of methylene blue aggregation processes using absorption and fluorescence spectroscopy // *Research in Environment and Life Sciences.* Vol.5. No.4. PP.141-146.

**АНТИМИКРОБЛИ ФОТОДИНАМИК ТЕРАПИЯДА ИСТИҚБОЛЛИ  
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР БЎЛА ОЛАДИГАН МЕТИЛЕННИНГ СПЕКТРАЛ  
ХАРАКТЕРИСТИКАЛАРИ**

Умарова М.А. Ислон Каримов номидаги Тошкент давлат техника университети магистранти  
Нематов Ш.Қ., физика-математика фанлари доктори

**СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО -  
ПЕРСПЕКТИВНОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ  
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

Умарова М.А., Магистрант Ташкентского государственного технического университета  
имени Ислама Каримова  
Нематов Ш.Қ., доктор физико-математических наук

**SPECTRAL CHARACTERISTICS OF METHYLENE BLUE - PERSPECTIVE  
PHOTOTENSIBILIZER FOR ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY**

Umarova M.A. Master student of Tashkent State Technical University named after Islam Karimov  
Nematov Sh.Q., doctor of physical-mathematical sciences