

Сечение двухфотонного поглощения фталоцианина алюминия при возбуждении излучением фемтосекундного титан-сапфирового лазера

Ю.П.Мешалкин, С.С.Чуносова

Измерено сечение двухфотонного поглощения (ДФП) фталоцианина алюминия при возбуждении фемтосекундным излучением титан-сапфирового лазера, которое составило 543 ± 16 ГМ. Сечение ДФП на длине волны Ti: сапфирового лазера (800 нм) более чем в 40 раз превышает измеренное ранее сечение на длине волны Nd: YAG-лазера (1064 нм). Обсуждается роль резонансного усиления ДФП, обусловленного наличием у фталоцианина реального уровня S_{1u} (14815 см^{-1}) вблизи виртуального уровня (12594 см^{-1}).

Ключевые слова: фталоцианин алюминия, сечение двухфотонного поглощения, титан-сапфировый лазер, резонансное усиление.

1. Введение

Одной из главных проблем лазерной фотодинамической терапии является проблема доставки оптического излучения к молекулам фотосенсибилизатора, избирательно накопленным патологическими клетками. В последнее время в качестве неинвазивного способа доставки излучения в глубь биологических тканей рассматривается двухфотонное возбуждение фотосенсибилизаторов лазерным излучением ближнего ИК диапазона [1–4]. Предполагается, что при двухфотонном возбуждении фотосенсибилизаторов ИК излучением фотодинамический эффект будет проходить на значительных глубинах, т. к. возбуждающее излучение попадает в окно прозрачности биологических тканей с низким сечением двух- и трехфотонного поглощения и может взаимодействовать только с экзогенными молекулами с высоким сечением нелинейного поглощения. Такой подход в мировой практике получил название двухфотонной фотодинамической терапии (ФДТ), проходящей стадию доклинических исследований.

Возможность двухфотонного возбуждения фотосенсибилизаторов продемонстрирована на производных гематопорфирина [1, 2], различных псораленах [3, 5], производных стильбена [4], протопорфирине IX [6], фталоцианине алюминия [7] и гипокрилизине [8]. Для ряда фотосенсибилизаторов были измерены сечения двухфотонного поглощения (ДФП) на фиксированных длинах волн.

Для одного из наиболее распространенных в клинической практике фотосенсибилизаторов – фталоцианина

алюминия («Фотосенс») – ранее нами было измерено сечение ДФП на длине волны твердотельного Nd: YAG-лазера (1064 нм) при длительности импульсов 200 нс [7]. Оно составило 12.7 ± 0.20 ГМ ($1 \text{ ГМ} = 10^{-50} \text{ см}^4 \cdot \text{с} \cdot \text{фот}^{-1} \times \text{мол}^{-1}$) и было близко к сечениям ДФП производных гематопорфирина и 4'-гидрокси-метил-4,5,8'-триметилпсоралена, равным 15 ГМ ($\lambda = 750 \text{ нм}$) [2] и 20 ГМ ($\lambda = 730 \text{ нм}$) [5] соответственно. Молекулы с сечением ДФП менее 100 ГМ можно считать не очень эффективными сенсибилизаторами для двухфотонной ФДТ с точки зрения возбуждения (эффективность генерации синглетного кислорода не берется во внимание). Благодаря целенаправленному поиску и синтезу веществ с высокими сечениями ДФП в последнее время были получены органические соединения AF-50 (N,N-дифенил-7-[2-(4-пиридинил)эфир]-9,9-di-*n*-decyl-флуорен-2-амино- и PDHF (поли(дигексил)флуорен) с рекордными сечениями 19400 ГМ [9] и 20000 ГМ [10] соответственно. Очевидно, что чем выше сечение ДФП, тем менее мощные лазеры можно применять в двухфотонных технологиях, в том числе и в медицинских.

В последнее время для двухфотонного возбуждения красителей и фотосенсибилизаторов широко используются Ti: сапфировые лазеры, генерирующие фемтосекундные импульсы с длиной волны около 800 нм. Считается, что эти лазеры являются идеальными источниками излучения для двухфотонных технологий [11]. Они нашли применение и в медико-биологических технологиях – двухфотонной лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии [12, 13] и двухфотонной ФДТ [3]. В связи с этим возникает необходимость в измерении сечений ДФП фотосенсибилизаторов на длине волны Ti: сапфирового лазера.

В настоящей работе получено двухфотонное возбуждение фталоцианина алюминия излучением Ti: сапфирового лазера и измерено его сечение двухфотонно-возбуждаемой флуоресценции (произведение сечения ДФП на квантовый выход флуоресценции) на $\lambda = 800 \text{ нм}$. На основе измерений рассчитано сечение ДФП.

Ю.П.Мешалкин. ГУ «НИИ физиологии» СО РАМН, лаборатория лазерной биофизики, Россия, 630117 Новосибирск, ул. акад. Тимакова, 4; Новосибирский государственный технический университет, Россия, 630092 Новосибирск, просп. К.Маркса, 20; e-mail: yurimesh@ngs.ru

С.С.Чуносова. Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 13

Поступила в редакцию 26 октября 2004 г., после доработки – 5 мая 2005 г.

2. Эксперимент

В работе использовались водные растворы смеси натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия от ди- до тетразамещенного, а также его растворы в этаноле с концентрациями 10^{-3} М (двухфотонное возбуждение) и 10^{-5} М (при однофотонных измерениях). Фталоцианин алюминия был изготовлен в НИОПИКЕ (Москва).

Для двухфотонного возбуждения фталоцианина алюминия использовался Ti:сапфировый лазер FemtoMed с накачкой аргоновым лазером INVERsia Ar-5-150 (фирма «Инверсия», Новосибирск). Фемтосекундный комплекс FemtoMed разработан фирмой «Техноскан» (Новосибирск) специально для медико-биологических исследований и установлен в лаборатории лазерной биофизики ГУ «НИИ физиологии» СО РАМН для проведения работ по двухфотонной ФДТ. При мощности непрерывного одномодового излучения аргонового лазера накачки 6 Вт (на всех сине-зеленых линиях) Ti:сапфировый лазер генерировал импульсы длительностью 50 фс с частотой повторения 89 МГц и центральной длиной волны 800 нм.

Без дополнительного усиления средняя мощность Ti:сапфирового лазера составляла 300–450 мВт как в непрерывном, так и в фемтосекундном режиме. Мощность излучения Ti:сапфирового лазера измерялась четырехзондовым калориметрическим измерителем LP-905 фирмы «Техноскан». Для изменения средней мощности излучения без изменения длительности импульсов использовалась призма Глана. После этой призмы излучение Ti:сапфирового лазера фокусировалось длиннофокусной линзой ($F = 140$ мм) в кварцевую кювету (длиной 1 см) с образцом. Фокальное пятно в перетяжке имело диаметр около 100 мкм.

Сигнал флуоресценции регистрировался под углом 90° с помощью оптоволокну, соединенного с оптическим анализатором (Angstrom, Новосибирск). Спектры линейного поглощения растворов фталоцианина алюминия регистрировались спектрофотометром UVIKON-943 (Kontron Instruments, Франция), а спектры линейной флуоресценции – сканирующим спектрофлуориметром Aminco-Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, США) в диапазоне 630–800 нм при возбуждении на $\lambda = 530$ нм.

Измерения сечения двухфотонно-возбуждаемой флуоресценции (ДФВФ) выполнялись методом эталона. Для этого кварцевая кювета с исследуемым веществом устанавливалась в сфокусированном оптическом пучке в зоне фокуса. При этом возбуждающее излучение пропусклось через тонкий слой образца непосредственно у передней стенки кюветы для минимизации самопоглощения флуоресценции. Оптическое волокно с входной апертурой 125 мкм с помощью двухкоординатной платформы подводилось к треку флуоресценции с настройкой по максимуму сигнала флуоресценции. После регистрации спектра ДФВФ кювета с исследуемым веществом заменялась на подобную кювету с эталоном без изменения геометрии возбуждения и регистрации. Изменение средней мощности возбуждающего излучения при измерении флуоресценции исследуемого вещества и эталона не превышало 5%.

Определение сечения ДФВФ $\sigma_{\text{ДФВФ}}$ исследуемого вещества проводилось путем сравнения интенсивностей ДФВФ этого вещества (1) и родамина 6G (I_0), для которого сечение ДФВФ равно произведению сечения ДФП

на данной длине волны $\sigma_{\text{ТРА}}$ на квантовый выход флуоресценции η_0 , и вычислялось по формуле

$$\sigma_{\text{ДФВФ}} = \frac{\eta_0 \sigma_{\text{ТРА}} C_0}{I_0 C},$$

где C и C_0 – молярные концентрации исследуемого вещества и эталона соответственно. Все сечения измерялись в единицах ГМ. Для родамина 6G сечение $\sigma_{\text{ТРА}} = 134$ ГМ [14], а квантовый выход флуоресценции $\eta_0 = 0.94$ [15].

3. Результаты экспериментов и их обсуждение

На рис.1 представлен спектр поглощения фталоцианина алюминия в этаноле с концентрацией 10^{-5} М (кривая 1). Для него характерны основной максимум на $\lambda = 675$ нм и два побочных максимума на $\lambda = 607$ и 352 нм (полоса Core). В спектре флуоресценции наблюдается одна полоса с максимумом на $\lambda = 681$ нм (кривая 2). Спектр ДФВФ имеет максимум на $\lambda = 689$ нм с плечом 715 нм (кривая 3). Спектр ДФВФ несколько смещен в длинноволновую область из-за реабсорбции в растворах с высокой концентрацией (10^{-3} М). Как следует из спектров поглощения, излучение Ti:сапфирового лазера (кривая 4) не попадает в полосу поглощения фталоцианина алюминия и не может возбуждать флуоресценцию по линейному механизму.

Обычно для доказательства двухфотонной природы флуоресценции получают зависимость ее интенсивности от интенсивности (мощности) возбуждающего излучения. Для двухфотонных процессов эта зависимость близка к квадратичной. Поскольку режим генерации фемтосекундного излучения очень критичен к мощности излучения накачки, изменение интенсивности фемтосекундного излучения путем изменения мощности накачки возможно лишь в небольшом динамическом диапазоне.

Изменение интенсивности фемтосекундного излучения с помощью стопы стеклянных фильтров неудобно вследствие неконтролируемого затягивания длительности импульса. Так как излучение Ti:сапфирового лазера линейно поляризовано (вертикальная поляризация), то интенсивность излучения можно изменять в широком динамическом диапазоне с помощью поляризатора (призма Глана).

На рис.2 показана зависимость средней мощности излучения Ti:сапфирового лазера на выходе призмы Глана

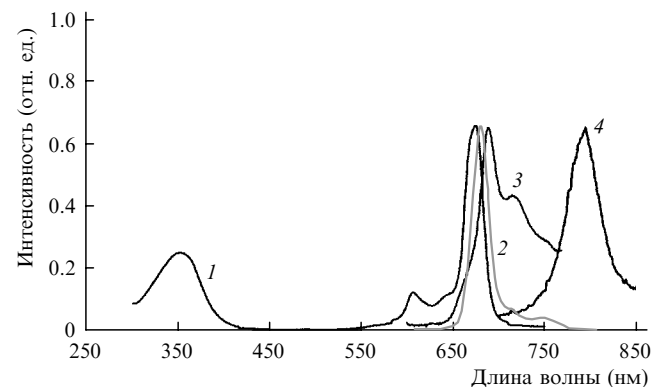


Рис.1. Спектры поглощения (1), флуоресценции (2) и ДФВФ (3) фталоцианина алюминия, а также спектр фемтосекундного излучения Ti:сапфирового лазера (4).

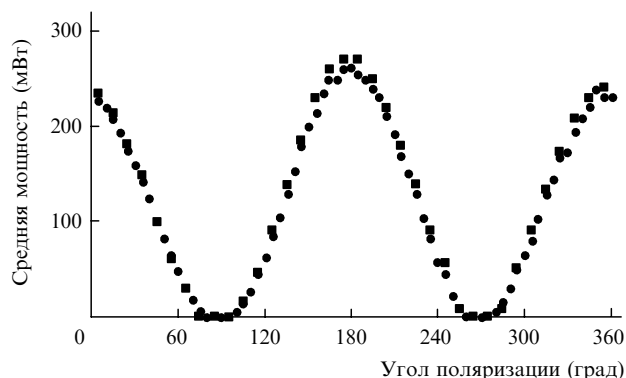


Рис.2. Поляризационные зависимости средней мощности излучения Ti:сапфирового лазера в непрерывном (●) и фемтосекундном (■) режимах.

в зависимости от угла ее поворота для фемтосекундного и непрерывного режимов генерации. При этом исходная мощность лазера в фемтосекундном режиме была равна 338 мВт, а в непрерывном – 340 мВт. Потери на призме Глана составили около 20 % в фемтосекундном режиме и около 23 % в непрерывном. Разницу потерь, по-видимому, можно объяснить наличием двухфотонного взаимодействия на детекторе измерителя мощности. При углах поворота призмы $95^\circ - 175^\circ$ интенсивность излучения на выходе из призмы Глана изменяется по близкому к линейному закону от нуля до максимума.

На рис.3 приведена зависимость логарифма интенсивности флуоресценции от логарифма средней мощности возбуждения. Тангенс угла наклона составляет 1.88, что однозначно указывает на двухфотонный характер возбуждения. (Отклонение тангенса угла наклона от 2 лежит в пределах ошибки измерения мощности излучения.)

Сечение ДФВФ фталоцианина алюминия в этаноле, измеренное методом эталона, составляет 380 ± 11 ГМ. Если считать квантовый выход флуоресценции фталоцианина алюминия равным 0.7 [7], то сечение ДФП составляло 543 ± 16 ГМ. Полученное значение оказалось почти в 43 раза больше сечения ДФП на $\lambda = 1064$ нм [7].

Значительное возрастание сечения ДФП при смещении в коротковолновую область от удвоенной длины волны максимума поглощения получило название синего сдвига и продемонстрировано на примере ряда красителей [16]. Так, максимум поглощения родамина В находится на $\lambda = 526$ нм [17]. Следовательно, можно было ожидать, что максимальное сечение ДФП будет иметь место при возбуждении излучением с длиной волны,

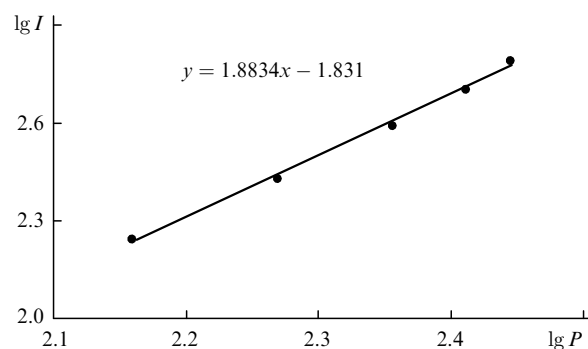


Рис.3. Зависимость интенсивности I ДФВФ фталоцианина алюминия от средней мощности возбуждения P .

близкой к удвоенной длине волны поглощения, например излучением Nd:YAG-лазера ($\lambda = 1064$ нм). Вместе с тем сечение ДФП на этой длине волны составляет 14.3 ± 7 ГМ [18] и неравномерно растет по мере уменьшения длины волны (табл.1). Природа синего сдвига для большинства красителей пока не установлена.

В случае фталоцианина алюминия синий сдвиг может быть объяснен резонансным усилением ДФП. Как известно [20], резонансное усиление имеет место тогда, когда вблизи виртуального уровня, через который осуществляется ДФП, находится реальный уровень. У фталоцианина при возбуждении излучением Ti:сапфирового лазера двухфотонный оптический переход приводит к заселению высшего возбужденного синглетного состояния (ВВСС) в полосе Core (рис.4). В этом случае виртуальный уровень лежит на ~ 2220 см^{-1} (ΔE_1) ниже возбужденного уровня S_{1u} (16474 см^{-1}).

При возбуждении излучением Nd:YAG-лазера двухфотонный оптический переход приводит к заселению запрещенного правилами симметрии состояния (18796 см^{-1}), лежащего выше первого возбужденного синглетного состояния (уровень 5 на рис.4). В данном случае виртуальный уровень двухфотонного перехода (9398 см^{-1}) лежит более чем на 5400 см^{-1} (ΔE_2) ниже возбужденного уровня S_{1u} .

Независимо от того, по какому механизму и в какие возбужденные состояния – высшее синглетное или первое возбужденное синглетное – происходит оптический переход, флуоресценция идет с нижнего колебательного подуровня первого возбужденного синглетного состояния: $S_{1u} \rightarrow S_0$. Однако эффективность ДФВФ, а следовательно и его сечение, больше при двухфотонном возбуждении фталоцианина алюминия в ВВСС.

Таким образом, за счет эффекта резонансного усиления

Табл.1. Синий сдвиг сечения ДФП родамина В.

Растворитель	Концентрация (М)	Длина волны возбуждающего излучения (нм)	Длительность импульсов возбуждающего излучения	Сечение ДФП (ГМ)	Литература
Метанол	10^{-4}	691	100 фс	194 ± 50	[19]
Этанол	–	694.3	наносекундный диапазон	140 ± 70	[18]
Этанол	–	694.3	– " –	170	[17]
Метанол	10^{-4}	800	100 фс	150	[19]
Метанол	10^{-4}	840	100 фс	210 ± 55	[19]
Метанол	10^{-4}	1050	100 фс	20 ± 6	[19]
Этанол	10^{-2}	1064	наносекундный диапазон	14.3 ± 7	[18]
Этанол	10^{-2}	1064	пикосекундный диапазон	12 ± 2	[17]

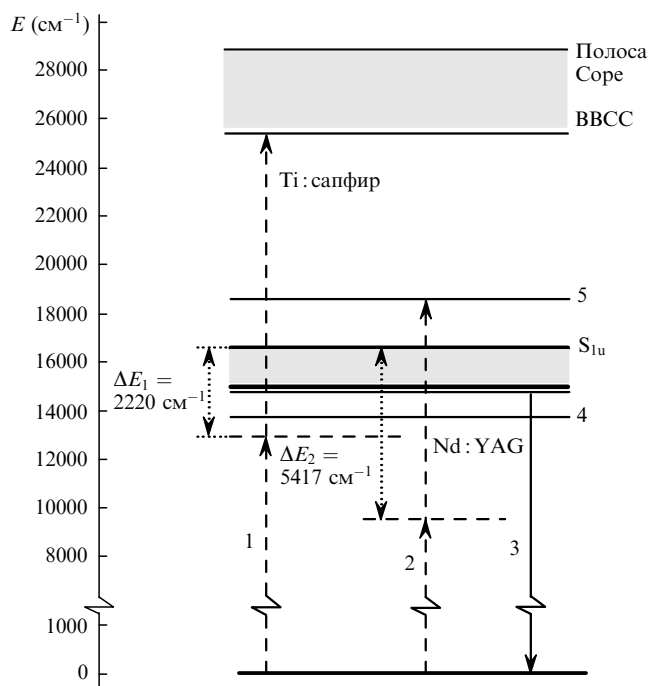


Рис.4. Диаграмма уровней и двухфотонных переходов фталоцианина алюминия:

1 и 2 – двухфотонное возбуждение Ti: сапфировым и Nd: YAG-лазерами соответственно; 3 – двухфотонно-возбуждаемая флуоресценция; 4 и 5 – разрешенные для двухфотонного перехода уровни, не обнаруживаемые в спектре поглощения и возбуждаемые Nd: YAG- и Ti: сапфировым лазерами соответственно.

ния сечение ДФП фталоцианина алюминия на длине волны Ti: сапфирового лазера оказывается достаточно большим (593 ± 16 ГМ), что делает возможным применение данного фотосенсибилизатора в двухфотонной

ФДТ с использованием в качестве источника излучения фемтосекундного титан-сапфирового лазера.

Подобный эффект резонансного усиления ДФП также недавно обнаружен в некоторых производных азопорфирина [21].

1. Bodaness R.S., King D.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 346 (1985).
2. Bodaness R.S., Heller D.F., Krasinsky J., King D.S. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12098 (1986).
3. Fisher W.G., Partridge W.P. Jr., Dees C., Wachter E.A. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 141 (1997).
4. Bhawalkar J.D., Kumar N.D., Zhao C.F., Prasad P.N. *J. Clin. Laser. Med. Surg.*, **15**, 201 (1997).
5. Oh D.H., Stanley R.J., Lin M., Hoeffler W.K., Boxer S.G., Berns M.W., Bauer E.A. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 91 (1997).
6. Goyan R.L., Cramb D.T. *Photochem. Photobiol.*, **72**, 821 (2000).
7. Мешалкин Ю.П., Алфимов Е.Е., Васильев Н.Е. и др. *Квантовая электроника*, **29** (3), 227 (1999).
8. Liu J., Zhao Y.W., Zhao J.Q., et al. *J. Photochem. Photobiol. B*, **68**, 156 (2002).
9. He G.S., Yuan L., Cheng N., et al. *J. Opt. Soc. Am. B*, **14**, 1079 (1997).
10. Yoo J., Yang S.K., Jeong M.-Y., Ahn H.C., Jeon S.-J., Cho B.R. *Organical Lett.*, **5**, 645 (2003).
11. Fisher W.G., Wachter E.A., Armas M., Seaton C. *Appl. Spectroscopy*, **51**, 218 (1997).
12. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. *Science*, **248**, 73 (1990).
13. Masters B.R., So P.T.C., Gratton E. *Laser. Med. Sci.*, **13**, 196 (1998).
14. Oulianov D.A., Tomov I.V., Dvornikov A.S., Rentzepis P.M. *Opt. Commun.*, **191**, 235 (2001).
15. Бутенин А.В., Коган Б.Я., Гундобин Н.В. *Оптика и спектроскопия*, **47**, 1022 (1979).
16. Xu C., Williams R.M., Zipfel W., Webb W.W. *Bioimaging*, **4**, 198 (1996).
17. Sperber P., Penzkofer A. *Opt. Quantum Electron.*, **18**, 381 (1986).
18. Hermann J.P., Ducuing J. *Opt. Commun.*, **6**, 101 (1972).
19. Xu C., Webb W.W. *J. Opt. Soc. Am. B*, **13**, 481 (1996).
20. Летохов В.С. *Лазерная фотоионизационная спектроскопия* (М.: Наука, 1987).
21. Drobizhev M., Karotki A., Kruk M., et al. *Chem. Phys. Lett.*, **361**, 504 (2002).