

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Гудкова Виктория Родионовна

**Гибридные системы для доставки фотосенсибилизаторов на основе
наноалмазов**

1.5.2. Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Максимов Евгений Георгиевич

Москва – 2025

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы.....	10
1.1 Фотодинамическая терапия.....	10
1.1.1 Общие принципы фотодинамической терапии	10
1.1.2 История ФДТ	16
1.1.3 Текущий статус ФДТ	19
1.1.4 Недостатки ФДТ.....	23
1.2 Наноалмазы.....	25
1.2.1 Синтез и свойства наноалмазов	25
1.2.2 Использование наноалмазов в биологии	29
Глава 2. Материалы и методы.....	35
2.1 Наноалмазы и реагенты.....	35
2.2 Структура наноалмазов	36
2.3 Обработка образцов наноалмазов.....	36
2.4 Исследование цитотоксического действия наноалмазов	38
2.5 Титрование фталоцианинов наноалмазами.....	38
2.6 Тушение флуоресценции фталоцианинов	39
2.7 Определение адсорбционного потенциала наноалмазов.....	40
2.8 Определение эффективности генерации АФК.....	41
2.9 Сборка установки для освещения.....	42
2.10 Культура клеток.....	43
2.11 Измерение концентрационной зависимости эффекта	43
2.12 Оценка равномерности освещения планшета	44

2.13 Определение дозовой зависимости фотодинамического эффекта	45
2.14 Измерение синглетного кислорода	45
2.15 Эффективность ФДТ.....	46
2.16 Визуализация ГС в клетках	47
Глава 3. Результаты.....	48
3.1 Размер наноалмазов и их поведение в водной среде	48
3.2 Свойства поверхности наноалмазов	55
3.4 Токсичность наноалмазов.....	58
3.5 Образование ГС с фталоцианином	59
3.5.1 Сдвиг Q-полосы поглощения фталоцианинов	59
3.5.2 Изотерма адсорбции фталоцианинов.....	61
3.5.3 Изменение ζ -потенциала поверхности наноалмаза	63
3.5.4 Тушение флуоресценции фталоцианинов	63
3.5.5 Ключевые соотношения компонентов ГС	66
3.5.6 ГС без π - π стекинга	68
3.5.7 Генерация АФК	70
3.5.8 Апробация осветительной установки	72
3.5.9 Действие ГС НА-Фц на клетки линии А431	79
Заключение	84
Выводы:.....	86
Список сокращений.....	88
Список литературы.....	89

Введение

Актуальность работы

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – один из перспективных методов для лечения онкологических и бактериальных заболеваний. В основе действия ФДТ лежит облучение светом молекулы фотосенсибилизатора, приводящее к генерации активных форм кислорода (АФК). На эффективность ФДТ влияет ряд параметров, таких как избирательность в отношении патогенных клеток, глубина тканей, которые подвергаются лечению, избирательное освещение поражённой области и склонность фотосенсибилизаторов к агрегации в водной среде. Для увеличения эффективности ФДТ создаются гибридные системы (ГС) фотосенсибилизаторов с платформой для доставки. Материал платформы для доставки должен удовлетворять ряду требований: биологическая совместимость, малые размеры (до 100 нм), химическая стабильность, возможность связывания с молекулами лигандов. Перспективным материалом для такой платформы являются нанодиамазы (НА). НА представляют собой частицы размером 2-100 нм, в центре которых находится углерод в sp^3 -гибридизации, а на поверхности – углерод в sp^2 -гибридизации. Такой состав обеспечивает НА высокую химическую стабильность. В процессе обработки НА их поверхность дополнительно покрывается слоем органических функциональных групп, которые могут выступать в качестве сайта связывания с различными молекулами. Можно заключить, что эффективность ГС на основе НА зависит от характера взаимодействия между составными компонентами системы. Существует ряд работ, посвящённых использованию ГС НА-фотосенсибилизатор, однако в них не изучается влияние НА на фотодинамическую активность фотосенсибилизатора. Поэтому мы решили провести работу по оценке взаимодействия между НА и фотосенсибилизатором и получению комплекса НА-фотосенсибилизатор.

Цели и задачи

Целью данной работы является выявление механизмов взаимодействия между наноалмазом и фталоцианином для разработки гибридных систем на основе наноалмазов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать гибридные системы на основе наноалмазов и изучить их физико-химические свойства (ζ -потенциал, интенсивность и длительность флуоресценции) как результат взаимодействия составных компонентов.
2. Изучить роль углерода в sp^2 -гибридизации и органических функциональных групп на поверхности наноалмазов при взаимодействии с фталоцианином в формировании гибридных систем.
3. Определить сравнительную фотодинамическую эффективность гибридных систем в зависимости от их состава и характера взаимодействия элементов.

Научная новизна

В работе показано, что фотодинамическая эффективность ГС НА-Фц определяется главным образом составом и характером взаимодействия элементов ГС, таких как π - π стекинг и электростатическое взаимодействие. В механизме связывания с Фц определяющую роль играет состав поверхности НА: углерод в sp^2 -гибридизации связывается с π -электронной системой Фц за счёт π - π стекинга, а функциональные группы осуществляют электростатическое взаимодействие с заряженными заместителями Фц. Полученные результаты могут использоваться в разработке принципов конструирования новых ГС.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установлены физико-химические основы и механизмы функциональной активности ГС для доставки фотосенсибилизаторов на основе НА. π - π стекинг между π -электронными системами углерода в sp^2 -гибридизации и Фц в составе

ГС негативно влияет на фотодинамическую активность Фц. Показано, что наличие аморфного углерода на поверхности НА препятствует образованию π - π стекинга с Фц. Функциональные группы на поверхности НА могут обеспечивать связывание с Фц за счёт электростатических взаимодействий. За счёт образования ГС на основе НА увеличена фотодинамическая эффективность отрицательно заряженного Фц. Установленные закономерности свойств ГС от состава и взаимодействия компонентов позволяют оценивать перспективность использования НА с различным характером поверхности в качестве платформы для доставки фотосенсибилизаторов.

Методология и методы исследования

В исследовании использовали цинковые и алюминиевые фталоцианины (Фц) с различными заместителями, а также НА, полученные детонационным методом.

Для описания основных физико-химических свойств НА использовали комплекс методов на основе электронной микроскопии, ИК-Фурье микроскопии, комбинационного рассеяния и динамического светорассеяния. Для определения механизмов связывания НА и Фц использовали измерение спектров поглощения Фц. Методом время-коррелированного счёта единичных фотонов исследовали влияние НА на фотодинамическую активность Фц. Осуществляли доставку ГС на основе НА и Фц в клетки эпидермоидной карциномы человека. С помощью МТТ-теста и конфокальной микроскопии оценивали эффективность ФДТ и локализацию Фц, НА и ГС в клетке. Дополнительно была создана установка для освещения клеток в 96-луночном планшете светом с максимумом 660 нм для проведения фотодинамических исследований.

Объект и предмет исследования

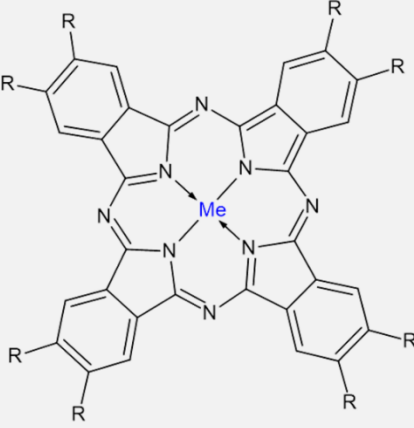
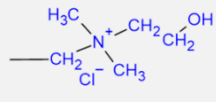
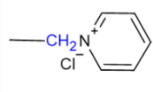
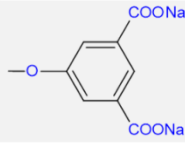
Общая структурная формула фталоцианина	Me	R	Обозначение
			ZnPcChol+8
	Zn		ZnPcPym+8
			ZnPc-16
	Al	COONa	AlPc-8

Рисунок 1. Структурные формулы использованных в работе Фц.

Объектом данного исследования являются Фц с различными заместителями и НА. Мы использовали следующие образцы Фц: цинковый Фц с холиниловыми заместителями (ZnPcChol+8) с суммарным зарядом +8, цинковый Фц с пиримидиновыми заместителями (ZnPcPym+8) с суммарным зарядом +8, цинковый Фц с карбоксильными заместителями (ZnPc-16) с суммарным зарядом -16 и алюминиевый Фц с карбоксильными заместителями (AlPc-8) с суммарным зарядом -8 (Рисунок 1). В качестве НА мы использовали НА с различным типом обработки, обозначаемые как НА ТАН, НА СТП и НА, обработанные воздухом при 400°C (тетрил-НА).

Предметом исследования являются спектральные свойства гибридной системы Фц-НА.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Раскрытие механизмов взаимодействия наноалмаза и фталоцианинов в составе гибридной системы возможно за счёт комплексного определения факторов, влияющих на эффективность гибридной системы.
2. В основе образования гибридной системы ZnPc-16/НА-СТП лежит исключительно электростатическое взаимодействие между

функциональными группами на поверхности наноалмаза и заряженными заместителями фталоцианина, а в основе образования гибридной системы ZnPcChol+8/тетрил-НА – электростатическое взаимодействие и π - π стекинг между π -электронными системами углерода в sp^2 -гибридизации и фталоцианина.

3. Аморфный углерод на поверхности НА-СТП препятствует образованию π - π стекинга с фталоцианином.
4. π - π стекинг приводит к образованию нефлуоресцирующих форм фталоцианина, что снижает фотодинамическую активность гибридной системы с π - π стекингом в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека.
5. Электростатическое взаимодействие между ZnPc-16 и НА-СТП в гибридной системе не снижает фотодинамическую активность фталоцианина в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека.
6. ZnPc-16 может проникать в клетку в составе гибридной системы на основе НА-СТП, где отсутствует π - π стекинг взаимодействия.

Апробация работы

Результаты проведённых исследований были представлены на семинарах лаборатории физико-химии биомембран и на российских и международных конференциях: VII Съезд биофизиков России, Краснодар, Россия, 2023 г; I Региональное собрание Российского фотобиологического общества и Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники», Нижний Новгород, Россия, 2024 г.

Личный вклад

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, построении схемы экспериментов, работе со спектральными методами (измерение поглощения, интенсивности флуоресценции, работа с системой время-коррелированного счёта фотонов), определении гидродинамических

характеристик образцов методом динамического светорассеяния, химической модификации НА, выращивании клеточных культур, микроскопировании и работе с системой FLIM, анализе полученных данных и определении типов взаимодействия между НА и Фц, а также публикации полученных данных.

Публикации

По результатам работы было опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых Web of Science и RSCI.

Структура и объём диссертации

Объём диссертации составляет 96 страниц машинописного текста и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждения, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 77 наименований. Работа содержит 28 рисунков и 1 таблицу.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю – заведующему лаборатории физико-химии биологических мембран биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова д.б.н. в.н.с. Евгению Георгиевичу Максимову.

Автор выражает глубокую признательность сотруднику ФГУП СКТБ «Технолог» д. т. н. Валерию Юрьевичу Долматову за любезно предоставленные образцы наноалмазов, которые легли в основу этой работы.

Автор благодарит коллег – сотрудников лаборатории физико-химии биомембран, а также сотрудников сектора фотобиологии и биофотоники и лично к.б.н. н.с. Гвоздева Даниила Александровича и к.б.н. н.с. Цораева Георгия Витальевича.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Фотодинамическая терапия

1.1.1 Общие принципы фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия (ФДТ) - перспективный метод для лечения онкологических заболеваний. Онкологические заболевания, несмотря на свою многолетнюю историю изучения, до сих пор представляют серьёзную проблему для системы здравоохранения. В 2022 году в мире было зарегистрировано 20 млн новых случаев заражением рака и 9,7 млн. случаев смерти от онкологических заболеваний [42]. В России число заболевших в 2022 году составило 635 560, а количество смертей – 311 729. Исследование новых методов лечения, в том числе, ФДТ, позволит снизить число смертей вследствие онкологии. В текущую клиническую практику частично внедрена ФДТ, однако её область применения пока ограничена. Поиск новых агентов для ФДТ поможет расширить область её применения.

В основе ФДТ лежит реакция фотосенсибилизации [25, 54]. Реакция фотосенсибилизации начинается с того, что молекула фотосенсибилизатора поглощает квант света и переходит в синглетное возбуждённое состояние (S_1) (Рисунок 2). Возбуждённое синглетное состояние может быть деактивировано различными путями: высвечиванием квантом света (флуоресценция), тепловой диссипацией энергии или переходом в возбуждённое триплетное состояние (T_1). Возбуждённое триплетное состояние, в свою очередь, может быть деактивировано высвечиванием кванта света (фосфоресценция) или взаимодействием с молекулой кислорода. Существует два типа взаимодействия фотосенсибилизатора в возбуждённом триплетном состоянии с молекулой кислорода. Первый тип взаимодействия подразумевает перенос электрона с образованием молекулы супероксид-анион радикала. Второй тип взаимодействия приводит к изменению направления спинов и образованию синглетного кислорода. Второй тип реакции является наиболее

распространённым среди фотосенсибилизаторов. И супероксид-анион радикал, и синглетный кислород, являются АФК, и при значительном увеличении их концентрации в клетке происходит клеточная гибель. Это может быть использовано в терапевтических целях для элиминации опухолевых или других патогенных клеток.

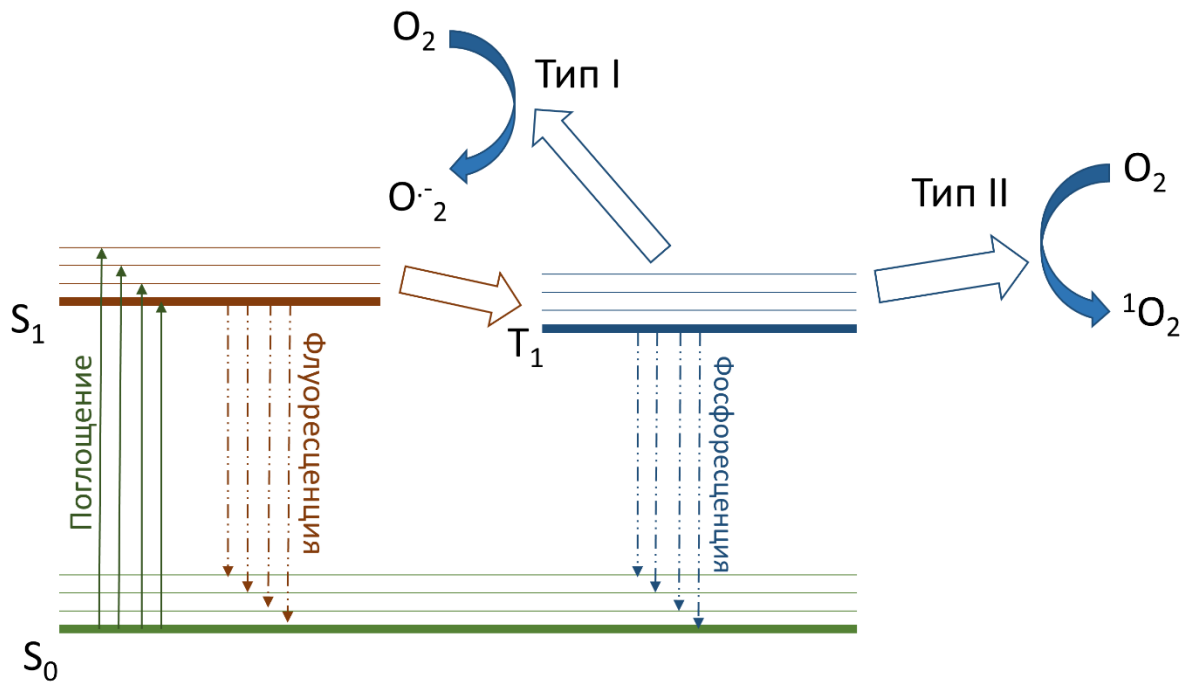


Рисунок 2. Диаграмма Яблонского и основные типы фотодинамических реакций.

Для достижения терапевтического эффекта пациенту вводят фотосенсибилизатор, а затем освещают поражённый участок [43, 54, 71]. В случае, если поражённая область расположена на поверхности кожи, освещение не представляет серьёзных проблем. Однако при поражении более глубоких тканей доставку света осуществляют с помощью специальных световодов. Одна из вариаций такого световода – сапфировая игла с оптоволоконном внутри [25]. Кончик иглы может быть модифицирован определённым образом, либо для лучшего проникновения в ткани, либо для большей площади рассеяния света. Вне зависимости от локализации опухоли, освещение происходит с длинами волн 630, 650 или 670 нм, облучённостью

50-200 Дж/см² в течение обычно 15-20 минут [62, 71]. Во время процедуры пациент может испытывать жжение и небольшую боль в области освещения. Допустимый метод обезболивания – охлаждение обрабатываемой области, однако это может замедлить скорость фотодинамической реакции. После ФДТ пациент должен избегать солнечного света и с осторожностью использовать осветительные приборы. Согласно [71], мониторы при этом допустимы к использованию. Побочные эффекты ФДТ уступают по своей тяжести побочным эффектам от традиционных методов лечения (химиотерапия, радиотерапия), поэтому активное внедрение ФДТ в клиническую практику может положительно сказаться на качестве жизни пациентов [71].

Большинство молекул фотосенсибилизаторов имеют порфириновую природу (Рисунок 3) [54]. Все порфириноподобные молекулы имеют полосу поглощения в районе 400 нм, которая называется полосой Sore и не представляет ценности для ФДТ, так как синий свет проникает в ткани очень неглубоко. Поэтому для лечения используется Q-полоса, которая расположена в районе 600-800 нм. В основе таких спектров лежат π -электронные системы, которые различаются у разных классов фотосенсибилизаторов (например, у порфирина – 22 π -электронов, у хлорина – 20 π -электронов, у бактериохлорина – 18 π -электронов) [54].

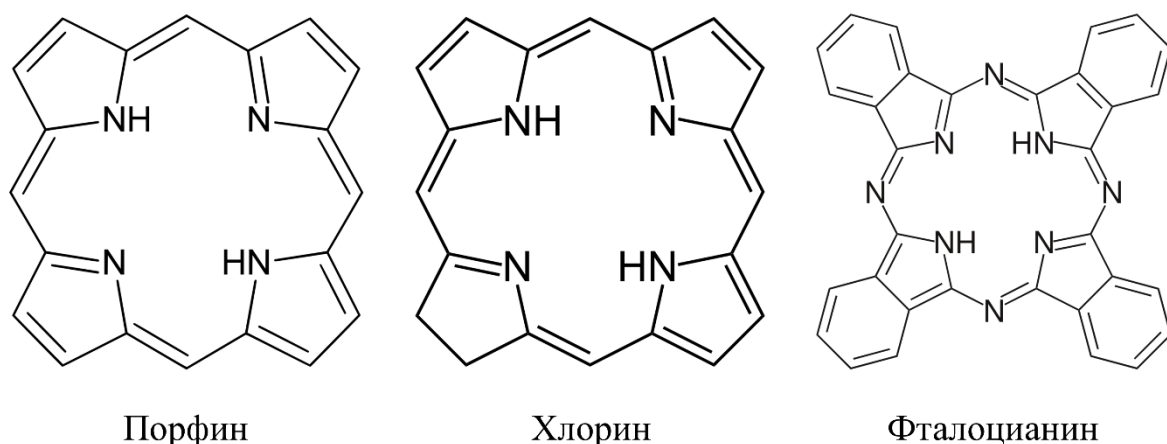


Рисунок 3. Структурные формулы молекул некоторых фотосенсибилизаторов.

В силу своей гидрофобности, при доставке в клетки фотосенсибилизаторы локализуются в основном в гидрофобных областях (мембранах) [54]. Это влияет на область поражения АФК. Время жизни синглетного кислорода – 10-100 мкс в органических растворителях. Это обеспечивает сферическую зону активности с радиусом 10 нм. В водных средах время жизни синглетного кислорода сокращается до 2 мкс из-за энергии растяжения связей кислород-водород, которая приблизительно равна энергии возбужденного состояния синглетного кислорода. В результате зона поражения синглетным кислородом в водной среде размером примерно с толщину клеточной мембраны [54].

Гидрофобность фотосенсибилизаторов имеет потенциальное преимущество: при попадании в кровь они связываются с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП) [5]. Во многих работах показано первоначальное связывание фотосенсибилизаторов с альбумином крови, однако при дальнейшей циркуляции фотосенсибилизаторов в крови происходит их переход в ЛПНП [49]. Многие раковые клетки на своей поверхности имеют большое число рецепторов к ЛПНП, так как активная пролиферация требует

большого количества жиров для построения новых мембран. Таким образом, может осуществляться направленная доставка фотосенсибилизаторов в клетки раковой опухоли.

Однако гидрофобность фотосенсибилизаторов может оказывать и негативный эффект на их действие. В водной среде молекулы гидрофобных фотосенсибилизаторов склонны к агрегации, что уменьшает время жизни триплетного состояния и уменьшает выход синглетного кислорода за счёт диссипации энергии в результате конверсии [24, 37, 54, 69, 77]. Для предотвращения агрегации в лабораторных условиях используют неводные растворители, но это не исключает возможность агрегации в гидрофильной клеточной среде.

Растворимость фотосенсибилизатора в воде может быть модифицирована за счёт изменения химических групп на периферии молекулы фотосенсибилизатора. При сравнении фотосенсибилизаторов с разными периферическими группами, но с одинаковым типом порфирина в центре, наибольшую эффективность показывают фотосенсибилизаторы с амфифильными свойствами [29, 54, 70]. Это может объясняться их универсальностью для различных клеточных компонентов, и, как следствие, увеличению площади поражения АФК.

Одно из свойств фотосенсибилизаторов – их склонность к фотовыцветанию [54]. Генерируемые ими же молекулы АФК могут повреждать не только клеточные компоненты, но и сами молекулы фотосенсибилизаторов. В результате выход АФК снижается. Подобная нестабильность фотосенсибилизаторов накладывает определённые требования на условия их хранения, однако это может иметь положительный эффект для пациента: если в результате освещения в процессе ФДТ все молекулы фотосенсибилизаторов инактивируются, то последующая фоточувствительность пациента снижается. Использование направленной доставки может усилить положительное действие фотовыцветания.

Действие фотодинамической терапии основано на трёх факторах: прямом повреждении клеток опухоли, повреждении сосудов, стимуляции иммунной реакции [25, 62, 76].

Прямое повреждение клеток может обуславливаться как апоптозом, так и некрозом [62]. Агрегаты гидрофобных фотосенсибилизаторов, как и гидрофильные фотосенсибилизаторы попадают в клетку путём пиноцитоза и/или эндоцитоза, таким образом, они оказываются в лизосомах или эндосомах [62]. Далее при облучении светом происходит нарушение целостности лизосом и выход фотосенсибилизаторов в цитозоль. В некоторых случаях это приводит к повреждению тубулина, что делает невозможным выход для клетки в митоз. Фотосенсибилизаторы, которые локализуются в цитоплазме, чаще индуцируют некроз, фотосенсибилизаторы в митохондриях – апоптоз [62].

Некоторые фотосенсибилизаторы (например, протопорфирин) обладают сродством к митохондриальным периферическим бензодиазепиновым рецепторам [54, 80]. Эти рецепторы являются составляющей частью белковой поры, расположенной в месте контакта между внутренней и наружной митохондриальной мембраной. Открытие этой поры меняет мембранный поровый потенциал, что является ключевым событием в механизме апоптотической гибели. Через такой механизм фотосенсибилизаторы могут индуцировать апоптоз, что является более предпочтительным механизмом элиминации злокачественных клеток.

ФДТ может также привести к повреждению сосудов и гипоксии тканей. Сосудистый эффект ФДТ зависит от конкретного фотосенсибилизатора [54, 62, 79]. Однако некоторые типы опухолей устойчивы к гипоксии. Это обусловлено эффектом Варбурга: некоторые раковые клетки меняют свой метаболический путь в сторону увеличения вклада гликолиза, который не требует участия кислорода. Помимо этого, действие ФДТ напрямую связано с молекулами кислорода. Гипоксичные клетки с оксигенацией менее 5% устойчивы к действию ФДТ [54]. Поэтому в некоторых случаях повреждение сосудов и уменьшение оксигенации тканей может оказать положительное действие на

терапевтический эффект ФДТ, но в некоторых, наоборот, снизить терапевтический эффект.

ФДТ также влияет на иммунную систему пациента [54, 62]. Как в случае с сосудистым эффектом, это влияние может быть и положительным, и отрицательным. Некоторые работы показывают возникновение иммунитета к раковым клеткам под действием ФДТ [34, 78], однако иммунная система также может и подавляться после ФДТ. На конечный эффект влияют следующие факторы: конкретный фотосенсибилизатор, используемый для лечения, доза полученного света и время облучения.

Таким образом, ФДТ – перспективный метод, имеющий как положительные, так и отрицательные стороны. Недостатки ФДТ определяют темы для дальнейшего изучения. Исследования, посвящённые улучшению ФДТ, не могут рассматриваться в отрыве от истории её развития.

1.1.2 История ФДТ

История ФДТ начинается в 1900 году, когда Оскар Рааб открыл фотодинамическое действие красного акридина в отношении инфузорий [31, 34, 43]. Увиденное явление он попытался объяснить по аналогии с процессом фотосинтеза. В том же году, Дж. Прайм обнаруживает, что у больных эпилепсией, которые принимали эозин перорально, развивался дерматит в местах контакта с солнечным светом [34]. Спустя три года, в 1903 году, Нильс Финзен получил Нобелевскую Премию по медицине за лечение натуральной оспы красным светом и туберкулёза – солнечным ультрафиолетом. В 1911 году В. Хаусманн описал фототоксический эффект гематопорфирина на коже мышей. В 1960-е года Липсон предпринимает попытки регистрации опухоли по внутриопухолевой флуоресценции гематопорфирина, однако результаты были неудовлетворительными. Параллельно Самуэль Шварц работал над синтезом производных гематопорфирина. Липсон договорился о сотрудничестве с Шварцем, и в итоге удалось осуществить визуализацию опухолей с помощью

производных гематопорфирина. В 1975 году Томас Доугерти проводит ФДТ опухоли на мышах с помощью производных гематопорфирина, и в следующем году начинаются испытания производных гематопорфирина на людях [31, 34, 43].

Смесь производных гематопорфирина стала первым фотосенсибилизатором, одобренным к широкому клиническому применению [62, 71]. Её коммерческое название – Фотофрин. Так как Фотофрин является смесью различных производных гематопорфирина, определить точную локализацию этого фотосенсибилизатора в организме человека и механизм действия представляется затруднительным [62]. Фотофрин имеет сродство к злокачественным тканям и выводится из них на 72 часа позже, чем из нормальных тканей. Конечное выведение происходит через 14 дней [43].

Фотофрин имеет существенный недостаток: очень слабое поглощение в красной области спектра [54]. Биологические ткани хорошо пропускают длины волн 600-700 нм, поэтому лечение ФДТ осуществляется красным светом. В этом случае эффективность Фотофрина очень низкая, что вынуждает исследователей искать новые классы фотосенсибилизаторов [34].

Фотосенсибилизаторы, которые имеют интенсивную Q-полосу поглощения (600-700 нм), относят к фотосенсибилизаторам второго поколения. Наиболее известные представители фотосенсибилизаторов второго поколения: хлорин, бактериохлорин, фталоцианин [71]. Некоторые фотосенсибилизаторы второго поколения в настоящее время используются в клинической практике, однако область их применения до сих пор ограничена. Поэтому исследователи продолжают активно улучшать метод ФДТ.

Следующее поколение фотосенсибилизаторов – фотосенсибилизаторы третьего поколения - представляют собой ГС фотосенсибилизаторов второго поколения с платформами для доставки [54, 62]. Платформы для доставки предотвращают агрегацию фотосенсибилизаторов в водной среде, кроме этого, к платформам для доставки могут быть пришиты различные лиганды для направленной доставки. В качестве таких платформ могут выступать

липосомы, квантовые точки и углеродные наночастицы. Последнее время набирают популярность поровые органические полимеры [65], в которых встроены фотосенсибилизаторы, однако их сфера применения находится в области химического синтеза. Фотосенсибилизаторы третьего поколения пока не используются в клинической практике, так как требуют дальнейшего изучения [43].

С помощью платформ для доставки фотосенсибилизаторов можно также увеличить квантовый выход АФК [54]. Если платформа для доставки обладает собственной флуоресценцией, то за счёт механизмов передачи энергии (например, FRET) часть энергии может быть перенесена на фотосенсибилизатор. Тогда увеличится количество возбуждённых молекул фотосенсибилизатора и квантовый выход АФК. Так как необходимым условием для механизма FRET является перекрывание спектров, то таким образом можно увеличить и сечение поглощения фотосенсибилизатора. Примером такой платформы для доставки являются квантовые точки [25]. Для увеличения сечения поглощения фотосенсибилизатора можно использовать и апконверсионные наночастицы. Недостатком апконверсионных наночастиц и квантовых точек является их токсичность.

Ограниченная глубина проникновения света в ткани – один из существенных недостатков ФДТ. С помощью различных платформ для доставки исследователи пытаются решить и эту проблему. Например, создаются частицы, способные флуоресцировать под действием рентгеновского или гамма-излучения [25]. Проникающая способность такого излучения намного выше, что делает доступной ФДТ глубоких тканей. Недостатком такого подхода является токсичность рентген- и гамма-лучей. Активно развивается и идея создания ГС с люминесцирующими молекулами. Хемилюминесцентные соединения показали высокую токсичность, однако биолюминесцентные молекулы обладают лучшей совместимостью с живыми системами. Известный пример биолюминесцентной молекулы – люцеферин светлячка, который под действием фермента люциферазы испускает квант

света [27, 28]. Однако данный метод может быть эффективным только при условии направленной доставки фотосенсибилизаторов.

Направленная доставки фотосенсибилизаторов может осуществляться различными путями. Самый простой вариант – ГС с лигандом, который связывается с рецепторами на поверхности раковых клеток [25, 54]. Так как раковые клетки обладают активной пролиферацией, на их поверхности экспрессировано большое количество рецепторов, которые отсутствуют на поверхности нормальных клеток. Один из наиболее известных лигандов для направленной доставки – трансферрин. Некоторые работы уже показали эффективность его использования [7, 67, 73].

Другой подход для направленной доставки – использование протеаз, ассоциированных с раковыми клетками [61]. К фотосенсибилизатору пришивают лиганд через сайт, специфичный для раковых протеаз. В такой ГС фотосенсибилизатор неактивен. При попадании в раковые клетки протеазы отрезают лиганд от фотосенсибилизатора, и он переходит в активное состояние. Такая стратегия уже показала свою эффективность для антибактериальной терапии и может быть применена для лечения онкологических заболеваний [36].

Таким образом, ФДТ активно развивается в настоящее время. Исследователи предлагают различные решения для устранения недостатков ФДТ и повышению её эффективности. Часть этих разработок нашла своё клиническое применение.

1.1.3 Текущий статус ФДТ

В настоящее время ряд фотосенсибилизаторов используется в клинической практике. При этом используется облучение в диапазоне от 50 до 200 Дж/см² с плотностью 50-150 мВт/см² с длинами волн 630, 650 и 670 нм. Время облучения составляет порядка 15-20 минут с мощностью источника, как минимум, 1 Вт [71]. ФДТ используется для лечения различных патологических

состояний, а ряд фотосенсибилизаторов, одобренных к клиническому применению, расширился за последнее время.

Первый разработанный фотосенсибилизатор – Фотофрин, до сих пор используется в клинической практике. Его применение включает в себя введение препарата в концентрации 2 мг на кг и облучение светом спустя 48 часов на длине волны 630 нм в дозе 120-180 Дж/см² [43]. Это сравнительно большие значения дозы облучённости, которые нередко приводят к болевым ощущениям у пациента. После сеанса ФДТ пациенту следует избегать солнечного света и интенсивных домашних источников излучения в течение 4-6 недель. Коммерческие названия этого препарата варьируются в различных странах, в России он носит название «Фотогем».

Другой известный препарат для ФДТ – Фоскан [43]. В Европе его применение одобрено для лечения сквамозной карциномы головы и шеи. По сравнению с Фотофрином, он обладает рядом значительных преимуществ: его вводят в меньшей концентрации (0,15 мг на кг), облучение следует через 96 часов после введения на длине волны 652 нм в дозе 20 Дж/см², что вызывает меньшее количество болевых ощущений. Последующая чувствительность пациента к солнечному свету составляет 2 недели. Несмотря на описанные преимущества, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств в США не одобрило его применение [43].

Ветопорфин, он же – Визудин, одобрен к применению в целом ряде стран, в том числе, в США, однако его сфера применения не затрагивает онкологические заболевания [43]. Его используют для лечения хороидальной неоваскуляризации – заболевания, вызванного возрастной макулярной дегенерацией. При использовании Ветопорфина освещение следует через 15 минут после введения в дозе 50 Дж/см². В крови он циркулирует только 2 дня, благодаря чему пациенты испытывают значительно меньше неудобств по сравнению с другими фотосенсибилизирующими препаратами. В настоящее время проводятся исследования, посвященные использованию Ветопорфина для лечения онкологий [43].

Наиболее распространённый в клинической практике фотосенсибилизатор на данный момент - аминолевулиновая кислота (Рисунок 4) [31, 43, 48]. Сама по себе она не способна ни к флуоресценции, ни к генерации АФК. Однако она является предшественником протопорфирина IX – клеточного метаболита, используемого в дальнейшем для синтеза цитохрома *c*, гема и хлорофилла. Протопорфин IX способен к фотосенсибилизации, поэтому после введения аминолевулиновой кислоты в тканях развивается фоточувствительность, обусловленная повышением концентрации протопорфирина IX. Аминолевулиновая кислота нашла широкое применение, особенно для лечения кожных онкологий (за исключением меланомы) и выпускается как в формате раствора для инъекций, так и формате мази или крема. Конкретные рекомендации по использованию аминолевулиновой кислоты варьируются в зависимости от заболевания.

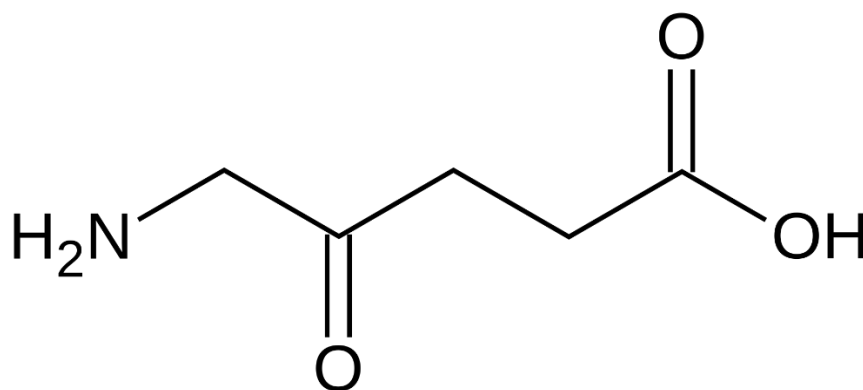


Рисунок 4. Структурная формула 5-аминолевулиновой кислоты.

В качестве источника облучения при ФДТ в клинической практике традиционно используются лазерные установки [62]. Они обладают большой мощностью излучения, а когерентность лазера обеспечивает более глубокое проникновение в ткани [52, 55]. Однако использование лазерных установок сопряжено с определёнными недостатками, такими как: дороговизна оборудования, необходимость его особого обслуживания, болевые ощущения у пациентов, обусловленные высокой интенсивностью облучения. В некоторых экспериментальных работах исследователи в качестве

альтернативных источников облучения предлагают светодиоды, так как они проще и дешевле в использовании [16, 53]. С помощью светодиода пациент даже может облучать себя самостоятельно, без посещения медицинских учреждений [21]. Однако в клиническую практику этот подход так и не был внедрён, и лазер пока остаётся основным источником облучения.

Освещение опухоли может происходить как в режиме постоянного света, так и в импульсном режиме. В пользу импульсного освещения выдвигаются такие факторы как необходимость реоксигенации тканей после фотодинамической реакции, реаккумуляция фотосенсибилизаторов в зоне освещения и снижение температуры для уменьшения болевых ощущений [25, 52]. Более того, при использовании импульсного освещения клеточная гибель идёт преимущественно по механизму апоптоза, что предпочтительнее для клинической практики. В пользу режима постоянного света исследователи приводят довод о его большей эффективности. В настоящее время ФДТ проходит в режиме постоянного света [25].

Потенциальная область применения ФДТ ограничивается не только онкологическими заболеваниями. Как было указано выше, Ветопорфин одобрен к клиническому применению, не относящемуся к онкологическим заболеваниям. В настоящее время исследователи пытаются применить фотосенсибилизаторы для лечения различных патологий, не связанных с раковыми заболеваниями. В частности, после пандемии коронавируса в 2020 году появились исследования, в которых фотосенсибилизаторы выступают в качестве противовирусных агентов [17, 23, 58]. Есть и работы, посвящённые использованию фотосенсибилизаторов для антибактериальной терапии [20, 22, 60]. Таким образом, разработка новых фотосенсибилизаторов может быть актуальна не только для лечения онкологии, но и для других областей.

Несмотря на использование фотосенсибилизаторов в клинической практике, область их применения весьма ограничена. Это связано с недостатками ФДТ, которые исследователям ещё предстоит устранить.

1.1.4 Недостатки ФДТ

Один из главных лимитирующих факторов ФДТ – ограниченная глубина проникновения света [25]. В среднем свет в красной области спектра проникает в биологические ткани на глубину около 1 см. Этот недостаток может быть нивелирован с использованием двухфотонного возбуждения. При этом для фотодинамической терапии может быть использовано излучение с диапазоном длин волн 1000-1300 нм [19]. Глубина проникновения такого излучения выше, и составляет 4-7 см для мозга или мышечных тканей и 10 см для тканей тимуса. К преимуществам двухфотонного возбуждения относится также возможность более точно облучать патогенные области. Однако даже при использовании двухфотонного возбуждения глубины проникновения света может не хватать для доставки в более глубокие ткани [19]. До тех пор, пока не разработаны эффективные способы доставки света для глубоких внутренних органов, ФДТ остаётся методом для лечения патологий, расположенных на поверхности кожи или в полостях.

Другой лимитирующий фактор для ФДТ – требовательность к содержанию кислорода в среде [54]. Многие раковые клетки находятся в условиях гипоксии и вынуждены даже изменить свой метаболизм (эффект Варбурга). В условиях низкой оксигенации ФДТ неэффективна. Решением этой проблемы может быть импульсное облучение опухолевых зон для восстановления концентрации кислорода.

Фотосенсибилизаторы обладают ограниченной избирательностью в отношении раковых клеток, что приводит к неприятным побочным эффектам у пациента [43]. Вариантов решения этой проблемы существует множество, дальнейшие исследования позволят подобрать наиболее оптимальный путь. Как уже было сказано выше, фотосенсибилизаторы третьего поколения представляют собой ГС, состоящий из фотосенсибилизатора, платформы и молекулы для направленной доставки [54]. Использование фотосенсибилизатора третьего поколения обеспечивает селективное

накопление в клетках опухоли, что не только увеличивает эффективность лечения, но снижает число и тяжесть побочных эффектов.

Ещё одним недостатком ФДТ является гидрофобность большинства фотосенсибилизаторов [54, 62]. Ранее мы упоминали, что в основе многих фотосенсибилизаторов лежит молекула порфирина, которая является гидрофобной. При попадании в полярные растворители такие молекулы склонны образовывать агрегаты. Флуоресценция и генерация АФК в агрегатах снижается. Использование платформ для доставки может решить эту проблему, так как на платформе могут быть созданы условия для связывания единичных молекул с предотвращением их дальнейшей агрегации и сохранением их свойств.

Несмотря на перечисленные недостатки, ФДТ остается перспективным методом. ФДТ показывает хорошую эффективность в комбинации с другими, более традиционными методами лечения опухолей [25, 71]. Принцип действия ФДТ отличается от такового для химио- и радиотерапии, поэтому ФДТ может дополнять их действие, не усугубляя при этом побочные эффекты. При использовании ФДТ в комбинации с другими методами, особую роль начинают играть вторичные эффекты ФДТ, не связанные с прямым повреждением раковых клеток. К вторичным эффектам относят повреждение сосудистой системы и усиление иммунного ответа в области опухоли. Использование ФДТ в комбинации с химиотерапией даёт эффект синергизма. Одна из проблем химиотерапии – сложность доставки химиотерапевтических агентов в раковые клетки. ФДТ улучшает проницаемость сосудов, что повышает эффективность химиотерапии. Примеры такого синергизма могут дополняться по мере введения ФДТ в клиническую практику как метода, дополнительного к основным способам лечения [25].

Разработка фотосенсибилизаторов третьего поколения позволит решить часть проблем ФДТ. Во-первых, фотосенсибилизаторы третьего поколения обеспечивают направленность доставки, во-вторых, предотвращают агрегацию фотосенсибилизаторов [54]. Для внедрения описанных выше

подходов необходимо подобрать материал платформы для направленной доставки. Одна из главных сложностей, с которой сталкиваются исследователи – токсичность многих предлагаемых материалов (квантовые точки, апконверсионные наночастицы) [25]. Другая проблема – низкая химическая устойчивость (липосомы) [62]. Помимо биосовместимости и химической устойчивости предлагаемые частицы должны обладать небольшими размерами. Это облегчает проникновение частиц в клетку. Кроме этого, малый диаметр частиц подразумевает высокое отношение площади поверхности к объёму, что увеличивает количество потенциальных молекул, с которыми может связаться наночастица. НА – частицы, которые удовлетворяют всем этим требованиям.

1.2 Наноалмазы

1.2.1 Синтез и свойства наноалмазов

Впервые НА были открыты в июле 1963-го года, однако в дальнейшем они были повторно дважды переоткрыты [14, 33]. Один из первооткрывателей НА, Даниленко, в своей статье [33] утверждает, что открытие НА является естественным результатом изучения синтеза супертвёрдых материалов методом детонации. Однако НА оставались малоизвестными до конца 1980-х годов. Начиная с 1990-ых мировая научная общественность проявляет к НА повышенный интерес [14].

Основной способ синтеза НА, который имеет коммерческое применение – детонационный [14]. Для этого смесь из углеродных предшественников взрывается в специальной металлической камере. В качестве компонентов детонационной смеси могут выступать тринитротолуол и гексоген, смешанные в определённой пропорции (например, 60% тринитротолуола и 40% гексогена). Взрыв проводят при отрицательном кислородном балансе. Для этого камеру заполняют азотом, углекислым газом, водой или льдом. Процессы, лежащие в основе синтеза НА, могут быть отражены на фазовой

диаграмме углерода (Рисунок 5). Фазовая диаграмма углерода включает в себя жидкий углерод, графит и алмаз. Значения переходов на фазовой диаграмме для обычного углерода и «наноуглерода» отличаются: например, для НА граница алмаз-жидкий углерод смещается в сторону более низких температур. С помощью взрыва углеродная смесь переводится в условия, отражённые на диаграмме точкой А: в таких условиях «наноуглерод» находится в состоянии жидкости, а обычный углерод – в состоянии алмаза. Затем систему охлаждают, а давление снижается. На диаграмме этот процесс показан красной стрелкой. При этом алмазная фракция сохраняется и покрывается графитовой оболочкой, так как графит – естественное состояние углерода при таких условиях. Охлаждение смеси осуществляют за счёт газа или жидкости, которой заполнена камера. В соответствие с этим, синтез будет называться «сухим» или «мокрым». Конечный продукт – НА 4-5 нм в диаметре, другие аллотропные модификации углерода и примеси. Полученный продукт подвергается дальнейшей очистке [14].

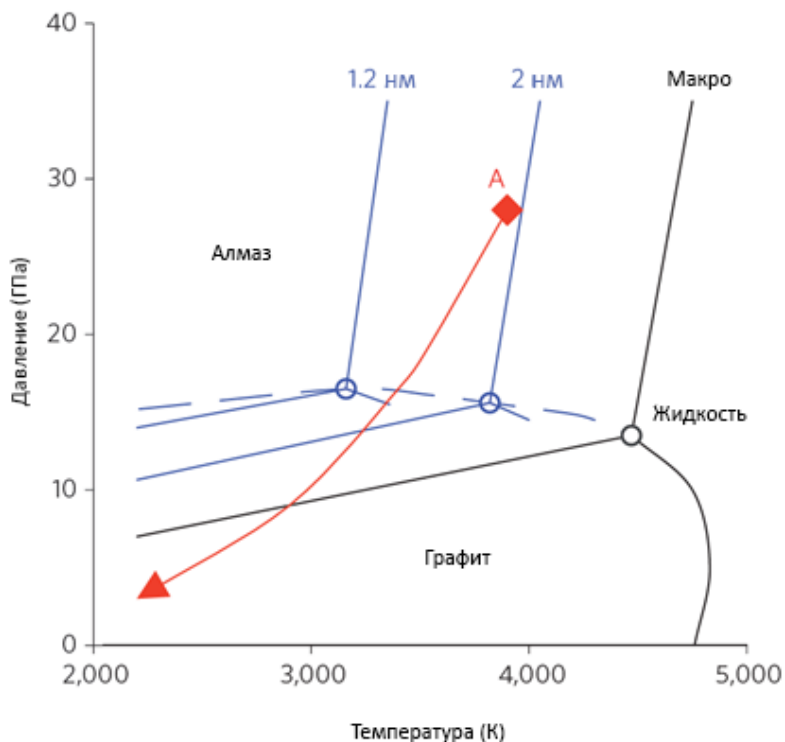


Рисунок 5. Фазовая диаграмма углерода (из работы Mochalin V. N. et al [14]). Красной точкой отмечены параметры, при которых происходит синтез НА.

Очистка НА после детонации – процесс, который определяет дальнейшие свойства продукта [14]. Неуглеродные примеси удаляются соляной кислотой или другой обработкой. Жидкие окислители (например, азотная кислота, серная кислота, смесь азотной и серной кислот, дихромат калия в серной кислоте и другие) удаляют неалмазный углерод. Такая обработка в жидкой фазе довольно дорога и обуславливает около 40% от конечной стоимости НА. Кроме этого, работа с сильными окислителями опасна для оператора и создаёт проблему экологичной утилизации. В качестве альтернативы выступает очистка НА методом нагревания в обычной атмосфере или в атмосфере, богатой азотом. Выбор способа очистки обусловлен дальнейшим применением НА. Для применения НА в биологических целях процесс очистки требует особого внимания, так как недостаточная очистка может приводить к токсическому эффекту НА [9].

Существуют и другие методы синтеза НА, помимо детонационного. Из известных в литературе можно выделить методы лазерной абляции, перемалывания при высокой температуре и давлении микрокристаллов алмаза, синтез в автоклаве, плазмо-ассоциированное химическое осаждение паров из газовой фазы и другие [14]. Широкое промышленное применение нашли уже описанный метод детонации, лазерной абляции и перемалывания при высокой температуре и давлении. Последний метод представляет особый интерес для биологических целей. В английской литературе его можно найти под аббревиатурой HPHT (High pressure high temperature), её мы и будем использовать в дальнейшем.

Одно из основных свойств НА – склонность к агрегации. В некоторых случаях это имеет положительное влияние на применение (например, для хроматографии), однако для биологических целей предпочтительно использование НА в неагрегированном состоянии [14]. Существуют различные способы деагрегации НА, например, ультрацентрифугирование, ультразвуковое дезинтегрирование, сухое перемалывание с помощью солей и сахаров, графитизация поверхности с последующей модификацией

химическими группами, обработка водородом при высокой температуре. Однако ни один из методов не даёт идеального результата, и дальнейшая работа с НА приводит к повторной агрегации. Наибольшего успеха в деагрегации НА добился М. Осава [14, 66]. Его метод заключается в измельчении НА керамическими микробусинами (сделанными из оксида кремния или оксида циркония). Процесс сопровождается ультразвуковой дезинтеграцией. К недостаткам этого метода относят загрязнение НА материалом микробусин и графитизация поверхности НА. При повторной очистке НА снова агрегируют. Поэтому во всех работах НА в водной среде представлены в виде агрегатов различных размеров.

Присутствие азот-замещённых вакансий в НА обеспечивает возможность флуоресценции [14]. Такие вакансии могут создаваться облучением НА частицами с высокой энергией (электронами, протонами, ионами гелия) с последующим нагреванием до 600-800°C в вакууме. В этом процессе вакансии мигрируют и захватываются атомами азота, которые всегда есть в НА. Существуют два типа азот-замещённых вакансий – нейтральные и отрицательно заряженные. Спектры излучения НА с разными типами вакансий отличаются. Азот-замещённые вакансии создают преимущественно в НА, полученных методом НРНТ, так как такие НА содержат в себе больше азота. Однако и детонационные НА обладают способностью к флуоресценции. Было показано, что в силу дефектов поверхности, детонационные НА обладают слабой флуоресценцией с коротким (порядка 60-100 пс) временем жизни [75]. Спектр флуоресценции таких НА зависит от состава химических групп на поверхности. Способность НА к флуоресценции значительно расширяет потенциальную сферу их применения и облегчает их детектирование в биологических тканях.

Возможность модификации различными химическими группами – другая ключевая особенность НА, которая отличает их от остальных углеродных наночастиц [14]. Такая модификация влияет на ζ -потенциал поверхности НА и обеспечивает способы ковалентного связывания с

различными молекулами. Наиболее популярна модификация НА карбоксильными группами и аминогруппами. Карбоксильные группы можно получить, например, путём окисления на воздухе при температуре 425°C [74]. Возможна также графитизация поверхности НА, которая проводится путём выдерживания в вакууме при температуре 700-750°C. Способы модификации поверхности НА различными химическими группами разнообразны и описаны в литературе [74].

Помимо модификации химическими группами, поверхность НА также покрывают слоем биосовместимых молекул [74]. Большой популярностью при этом пользуется полиэтиленгликоль. Такая обработка может служить нескольким целям: во-первых, слой биосовместимых молекул улучшает биосовместимость НА в целом; во-вторых, такой слой обеспечивает дополнительные пути связывания для различных агентов (например, нуклеиновых кислот) [14]. Однако такой подход редко используется для доставки лекарственных агентов в биологические ткани.

НА широко синтезируются и используются в областях, не относящихся к биологии. Например, НА являются компонентом нанокompозитов, используются в трибологии как дополнительный компонент смазок, могут выступать агентами для плакирования металлов, для осаждения алмазных плёнок из газовой фазы, в хроматографии и прочих сферах [14]. Однако в нашей работе мы используем НА для биологических целей, поэтому необходимо провести обзор исследований, посвящённых применению НА на живых объектах.

1.2.2 Использование наноалмазов в биологии

Перед использованием НА в биологических системах, необходимо определить их потенциальную токсичность. Этой теме было посвящено множество исследований [9]. В качестве модельных животных выступали как беспозвоночные (например, *Caenorhabditis elegans* [39]), так и позвоночные

(мышь) [1]. Основным выводом, который можно сделать из проведённых исследований – в разумных концентрациях НА различной формы и происхождения не влияют на основные функции клеток, органов и организмов [74]. Однако в ряде исследований демонстрируется токсичность НА. В обзорах такие случаи проявления токсичности принято соотносить с недостаточной очисткой НА от примесей [74]. Тем не менее, полноценного исследования распределения НА и фармакокинетики в организме человека нет. На данный момент это является одним из основных лимитирующих факторов для внедрения НА в клиническую практику.

Положительный эффект от использования НА для доставки лекарственных препаратов обусловлен, в том числе, размером наночастицы. В литературе принято считать, что размер наночастиц находится в диапазоне от 1 до 100 нм [51]. При таком размере частицы отличаются рядом особых поверхностных эффектов [46]. Поверхностные эффекты обусловлены высоким отношением площади поверхности наночастицы к объёму. При этом увеличивается число атомов, расположенных на поверхности наночастицы. Эти поверхностные атомы имеют меньшее число «соседних» атомов, в результате чего энергия связывания для каждого атома в наночастице меньше, чем в макрочастицах. В свою очередь, это снижает температуру плавления (см. выше фазовые диаграммы углерода). Однако такие поверхностные эффекты имеют и негативные последствия: в силу указанных причин НА склонны к агрегации [46].

Использование НА для доставки лекарственных препаратов может приводить к эффекту повышенной проницаемости и удержания (в англоязычной литературе – enhanced permeability and retention, EPR) [30]. Наночастицы активно проникают в клетки опухоли благодаря хорошо развитой опухолевой васкуляризации, однако не вымываются с лимфой, так как лимфатическое обеспечение у клеток опухоли довольно скудное. Этот эффект приводит к тому, что НА с лекарственными агентами накапливаются преимущественно в области опухоли, даже лишённые специальных молекул-

лигандов для адресной доставки. Эффект EPR был показан для различных классов наночастиц и различных типов опухолей, но он встречается не во всех случаях, а зависит от конкретного пациента, конкретного типа опухоли и конкретного типа наночастиц. Причины, определяющие наличие или отсутствие эффекта EPR в каждом случае до сих пор не выявлены. Отслеживать эффект EPR можно с помощью радиоактивно меченных наночастиц; такой подход поможет также лучше определить границы опухоли, охарактеризовать её и подобрать подходящее лечение [30].

Помимо EPR, НА могут приводить и к другим положительным эффектам. Например, было показано, что НА (особенно НА с аминогруппами на поверхности) могут увеличивать проницаемость сосудов опухоли [74]. Предварительная обработка НА, даже без каких-либо лекарственных агентов, увеличивает проницаемость сосудов, и последующее введение лекарственного агента приводит к лучшему терапевтическому эффекту. Другое преимущество использования НА – препятствие обратного оттока лекарств [8]. Известно, что некоторые механизмы множественной лекарственной устойчивости связаны с синтезом раковой клеткой специальных каналов на мембране клетки для оттока лекарственных агентов. В таком случае использование свободного лекарственного агента оказывается неэффективным. Однако при связывании лекарственного агента с НА, обратный отток через канал становится невозможным. Кроме этого, связывание с НА гидрофобных лекарственных средств может повысить его растворимость в воде [9]. Все описанные положительные эффекты могут быть использованы в клинической практике для увеличения эффективности лечения.

Тем не менее, вопрос с биораспределением и фармакодинамикой НА остаётся открытым. Как только наночастицы попадают в биологическую среду, на их поверхности сразу же образуется корона из белков и прочих молекул организма [30]. Состав короны зависит от конкретного типа наночастицы, однако именно он определяет биораспределение и фармакодинамику, и оказываемый эффект может быть как положительным, так

и отрицательным. Некоторые исследования посвящены выявлению зависимости между свойствами наночастицы и составом формируемой короны, однако большинство этих исследований сделано *in vitro*. Интересно, что результаты исследований *in vivo* со сходной тематикой отличаются [30]. Этот вопрос в настоящее время требует внимательного рассмотрения.

При выборе наночастицы для терапии необходимо также принимать во внимание полувремя её циркуляции и соотносить его с особенностями опухоли [30]. Если опухоль активно омывается кровью, а проникновение наночастиц из кровяного русла в опухоль происходит с высокой эффективностью, то небольшого полувремени циркуляции будет достаточно для желаемого эффекта. Но если опухоль плохо омывается кровью, или частицы неэффективно проникают в клетки опухоли, то время циркуляции должно быть увеличенным [30]. Проникновение наночастиц в глубокие слои опухоли может представлять существенную проблему, этот вопрос также необходимо детально исследовать перед введением НА в клиническую практику.

В настоящее время в исследованиях, затрагивающих живые организмы, используются только НА детонационного синтеза или НРНТ [74]. Для доставки лекарственных препаратов используются в основном детонационные НА, так как они имеют меньший размер по сравнению с НА НРНТ. НА НРНТ, в свою очередь, используются для флуоресцентного мечения. Флуоресценция таких НА от азот-замещённых вакансий отличается исключительной устойчивостью к фотовыцветанию, что и обеспечивает большой потенциал для их применения.

Как было уже сказано выше, токсичность НА зависит от многих факторов, связанных с их синтезом. НА НРНТ показывают лучшую биосовместимость [9]. Значительная токсичность НА была показана только у эмбрионов лягушки на ранней стадии развития и у двустворчатых моллюсков [11]. Последний случай может объясняться особенностью питания этой группы организмов: в проведённом исследовании НА добавляли в среду их

обитания (воду), а так как эта группа моллюсков питается фильтрацией окружающей воды, НА оседали на их жабрах в крайне высоких концентрациях [9]. Обобщая проведённые исследования, можно сказать, что НА в некоторых случаях могут спровоцировать различные морфологические изменения, окислительный стресс или иммунную реакцию, но на это влияют и такие факторы, как доза и метод введения НА.

Отдельно стоит остановиться на немногочисленных исследованиях биораспределения НА в организмах мышей и крыс [2, 8, 9, 10, 26]. Попадая в кровь животного, НА связываются с эритроцитами и могут значительное время циркулировать в кровяном русле. Последующее накопление НА происходит в печени и лёгких. В дальнейшем НА обнаруживаются в клетках макрофагов. В организмах крыс НА выводятся через выделительную систему. Таким образом, циркуляция НА в организме этих животных проходит без значительных последствий [9].

Сфера биологического применения детонационных НА ограничивается не только доставкой лекарств. В работах также осуществляли доставку нуклеиновых кислот с помощью НА [64]. Смежная тема – имитация гистонов частицами НА [14]. Использование НА в этих областях обусловлено возможностью модификации НА химическими группами. Нуклеиновые кислоты имеют отрицательный заряд и хорошо сорбируется на наночастице, имеющей большое количество положительно заряженных химических групп. В силу этого НА имеют перспективу для использования в геномной инженерии.

НА могут также найти своё применение в стоматологии. В исследовании [59] рассматривается возможность использования НА для заполнения зубного канала. Одна из широко известных стоматологических методик – заполнение зубных полостей гуттаперчевым материалом. Этот материал может содержать различные добавки, улучшающие его свойства. В своей работе исследователи добавляли НА и амоксициклин для увеличения прочности и дополнительных антибактериальных свойств. Исследование оказалось успешным, и в 2017 году эта же группа провела клинические испытания [32].

Несмотря на описанные преимущества НА и успехи в их изучении, перед исследователями встаёт ряд нерешённых проблем. Одна из них, которая относится не только к НА, но и к другим углеродным наночастицам – контролируемость и воспроизводимость синтеза [30]. Для немедицинских целей этот параметр не столь важен поэтому ранее ему не уделялось должного внимания. Однако, когда речь идёт об использовании на живых объектах, гетерогенность материала может оказать критическое влияние на получаемый эффект. Другая проблема, которую исследователем предстоит решить – биораспределение и влияние НА на организмы *in vivo* [30]. Остаётся также проблема качественной очистки НА [74]. Решение этих вопросов позволит внедрить НА в клиническую практику.

Среди исследований, посвящённых применению НА для биологических или медицинских целей, очень мало работ, затрагивающих возможность использования НА для доставки фотосенсибилизаторов. В этих работах показана эффективность ГС для доставки фотосенсибилизаторов на основе НА, однако не поднимаются фундаментальные вопросы взаимодействия между компонентами ГС. Наше внимание привлекли работы по использованию НА для доставки фталоцианинов [56, 63, 72], и мы приняли решение о разработке ГС НА-фталоцианин и изучении её свойств.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Наноалмазы и реагенты

Образцы детонационных НА ТАН, СТП были получены из ФГУП СКТБ Технолог (Россия). НА ТАН и СТП синтезировали из смеси взрывчатых веществ: гексогена и тринитротолуола. После детонации НА ТАН и СТП обрабатывали смесью кислот, однако цикл обработки НА ТАН включает в себя дополнительную стадию аммонолиза для очистки от кислотных примесей. Также из ФГУП СКТБ Технолог (Россия) были получены НА, синтезированные из одного взрывчатого вещества – тетрила, с последующей обработкой на воздухе при температуре 430°C (далее в работе они будут обозначаться тетрил-НА). Реагенты для химических реакций (ЭДТА, азотная кислота, серная кислота, Na-ацетатный буфер, Na-фосфатный буфер, КОН, HCl, 4-нитрозоN,N-диметиланилин, имидазол) были приобретены через компанию Sigma-Aldrich (United States). В работе использовались цинковые Фц с холиниловыми заместителями (ZnPcChol⁺⁸) с суммарным зарядом +8, цинковые Фц с пиримидиновыми заместителями (ZnPcPym⁺⁸) с суммарным зарядом +8, цинковые Фц с карбоксильными заместителями (ZnPc-16) с суммарным зарядом -16, алюминиевые Фц с карбоксильными заместителями (AlPc-8) с суммарным зарядом -8. Структурные формулы исследуемых Фц представлены на Рисунке 6. Фц ZnPc⁺⁸, ZnPym⁺⁸ и AlPc-8 были предоставлены ФГУП ГНЦ «Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей» (Россия), Фц ZnPc-16 был любезно предоставлен группой Горбуновой Ю. Г. (Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН)

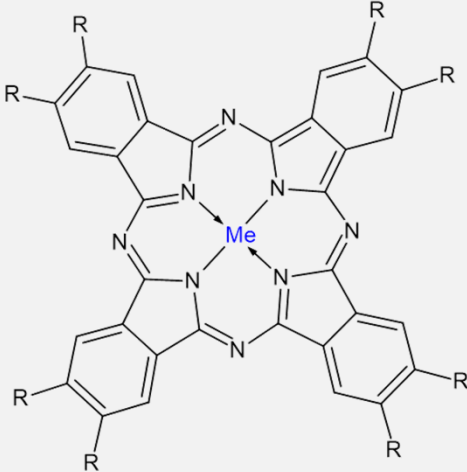
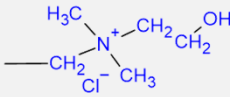
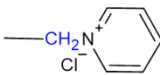
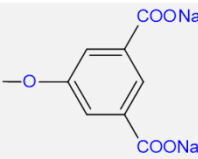
Общая структурная формула фталоцианина	Me	R	Обозначение
			ZnPcChol+8
	Zn		ZnPcPym+8
			ZnPc-16
	Al	COONa	AlPc-8

Рисунок 6. Структурные формулы использованных в работе фталоцианининов.

2.2 Структура наноалмазов

Для получения изображений НА методом просвечивающей электронной микроскопии использовали микроскоп JEM-2100 (Joel, Japan), напряжение 200 кВ. Диаметр частиц НА определяли в программе Image J. Гидродинамические характеристики образцов НА анализировали с помощью ζ-сайзера Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобритания). ИК-спектры с Фурье-преобразованием твёрдых образцов НА были получены на инфракрасном Фурье-спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, Великобритания). Для анализа использовалась ATR приставка MIRacle Single Reflection Horizontal (PIKE Technologies, США).

2.3 Обработка образцов наноалмазов

Для повышения агрегативной устойчивости НА в водной среде образцы НА в дистиллированной воде и в воде, очищенной системой Mili-Q (MQ) воде инкубировали в ультразвуковой ванне JP-010 (Skymen, Китай). Мощность

ультразвука составляла 60 Ватт, частота – 40 КHz. Ультразвуковое диспергирование образцов НА в водной среде осуществляли с помощью установок УЗДН-2Т (СССР) и SCIENTZ-950E (Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd, Китай). Частота работы УЗДН-2Т составляла 22 КHz, выходная мощность – 400 Ватт. Также для повышения агрегативной устойчивости образцов НА в MQ проводили ультрацентрифугирование на скорости 18000 g в течение 30 минут при температуре 25°C.

Для изучения агрегативной устойчивости НА измеряли гидродинамический радиус образцов НА СТП в присутствии натриевой соли ЭДТА при разных концентрациях. Также для всех трёх образцов НА провели ультразвуковое диспергирование в присутствии ЭДТА.

Для получения образца НА, модифицированного карбоксильными группами, модифицировали образцы НА ТАН согласно протоколу, описанному в работе [3]. Образец НА ТАН массой 0,5 г выдерживали в смеси азотной и серной кислот (соотношение 3:1) при температуре 80°C в течение 24 часов. Далее центрифугировали на скорости 18 000 g при температуре 4°C в течение 10 минут. Образец декантировали, к осадку НА добавляли раствор 0,1 М КОН. Смесь центрифугировали на скорости 4 500 g при температуре 4°C в течение 10 минут. Затем повторяли процедуру декантации, добавления КОН и центрифугирования на скорости 4 500 g. После этого смесь снова декантировали, к осадку добавлялся раствор 0,1 М HCl. Образец центрифугировали на скорости 4 500 g, декантировали, осадок разводился в 25 мл MQ. Для удаления низкомолекулярных неорганических соединений проводился диализ в 400-кратном объёме дистиллированной воды в течение 18 часов. Для выявления карбоксильных групп у полученных образцов НА измеряли ζ -потенциал и регистрировали спектры FTIR.

2.4 Исследование цитотоксического действия наноалмазов

Для оценки цитотоксического действия всех типов НА проводили МТТ-тест. Клетки мышинных эмбриональных фибробластов помещали в лунки 96-луночного планшета в концентрации 3 000 клеток на 100 μ л в среде DMEM, содержащей 10% бычьего сывороточного альбумина. Образцы всех использованных типов НА помещали в лунки до достижения концентраций 1, 5, 10 и 20 μ г/мл по три повторности на каждый образец. Далее проводили инкубацию при +37°C и 5% CO₂ в течение 3-х дней до достижения 70% покрытия монослоя. МТТ-тест проводили на 4-ый день культивации: 10 μ л реагентов МТТ в буфере PBS (5 мг/мл) были добавлены в лунки. Планшет инкубировали в течение 4 часов при +37°C и 5% CO₂. После этого, среду изымали из лунок, и образовавшиеся в процессе реакции с живыми клетками кристаллы формазана растворяли в ДМСО. Последующие измерения оптической плотности элюата проводили на длине волны 540 нм с использованием микропланшетного считывателя Infinite200PRO (Tecan, Швейцария). При анализе полученных данных оптическая плотность контрольных клеток (клеток, не содержащих исследуемых веществ, но облучаемых в тех же условиях) была принята как соответствующей 100% выживаемости.

2.5 Титрование фталоцианинов наноалмазами

Эффективность связывания молекул Фц с частицами НА оценивали методом абсорбционной спектроскопии. Источником света являлся SLS201L/M (ThorLabs Inc, США), в качестве детектора выступал спектрометр Maya 2000 PRO (Ocean Optics, США). Регистрация спектров осуществлялась в программе SpectraSuite (Ocean Optics, США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке Qpod 2e (Quantum Northwest, США) при температуре 25°C. В кювету с 900 мкл воды добавляли раствор Фц до достижения оптической плотности 0,4, затем постепенно добавляли образцы

НА. Полученные спектры поглощения аппроксимировали кривыми Гаусса и определяли максимумы поглощения. В случае, если при увеличении концентрации НА Q-полоса поглощения Фц смещалась, предполагали наличие взаимодействия между молекулой Фц и частицами НА. Полученные кривые титрования аппроксимировали сигмоидной функцией вида:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2, \quad (1)$$

где A_1 – положение максимума Q-полосы поглощения Фц без НА, A_2 – положение максимума Q-полосы поглощения Фц при полном связывании Фц с НА, x_0 – концентрация НА, при которой половина Фц, находящихся в растворе, связана с НА.

2.6 Тушение флуоресценции фталоцианинов

Регистрацию кинетики затухания флуоресценции Фц проводили методом Time-correlated single photon counting (TCSPC). В качестве источника излучения использовали лазер InTop 660 (ООО «Интегрально-оптические системы»), сигнал от образца проходил через монохроматор ML44 (Solar Laser Systems, Belarus), затем попадал на детектор НРМ-100-07-С (Becker & Hickl GmbH, Германия). Для поддержания заданной температуры использовали термостатируемую ячейку Qpod 2e (Quantum Northwest, США).

Для определения типа тушения флуоресценции в ГС НА-Фц строили график тушения флуоресценции в координатах Штерна-Фольмера при температуре 25°C и 35°C. Так как цинковые Фц в сравнении с алюминиевыми эффективнее генерируют активные формы кислорода и, как следствие, быстрее повреждаются при возбуждении лазерным излучением, для исключения возможных артефактов измерения использовали алюминиевые Фц с холиниловыми заместителями. В качестве тушителя выступали тетрил-НА.

2.7 Определение адсорбционного потенциала наноалмазов

Классическим методом описания процесса адсорбции является построение изотермы адсорбции: зависимости количества адсорбированного вещества от его концентрации (парциального давления). Линейная аппроксимация изотермы адсорбции в координатах Ленгмюра даёт значения констант адсорбции.

Для построения изотермы адсорбции проводили центрифугирование растворов с одинаковой концентрацией НА и разной концентрацией Фц с ускорением 604 g в течение 10 минут. После центрифугирования измеряли оптическую плотность супернатанта на установке и вычитали из полученного спектра рассеяние НА. Далее по разнице поглощений Фц в супернатанте в контроле и в опыте определяли количество сорбированного Фц (Рисунок 7). В качестве контроля при этом выступали растворы Фц без НА после центрифугирования при тех же параметрах. Так как при связывании Фц с НА максимум Q-полосы смещается, для каждой точки доля Фц, связавшихся с НА, оценивалась по формуле:

$$a = \frac{A - A_1}{A_2 - A_1} * \frac{D_{+ND}}{D_{-ND}}, \quad (2)$$

Где a – доля Фц, связавшихся с НА, A – положение пика поглощения Q-полосы для Фц, A_1 и A_2 – параметры, полученные при аппроксимации кривой титрования сигмоидной функцией, D_{+ND} – оптическая плотность Q-полосы поглощения Фц в супернатанте после центрифугирования в опыте, D_{-ND} – оптическая плотность Q-полосы поглощения Фц в супернатанте после центрифугирования в контроле. Для каждой концентрации Фц сделали три повторности. По полученным данным строилась изотерма адсорбции.

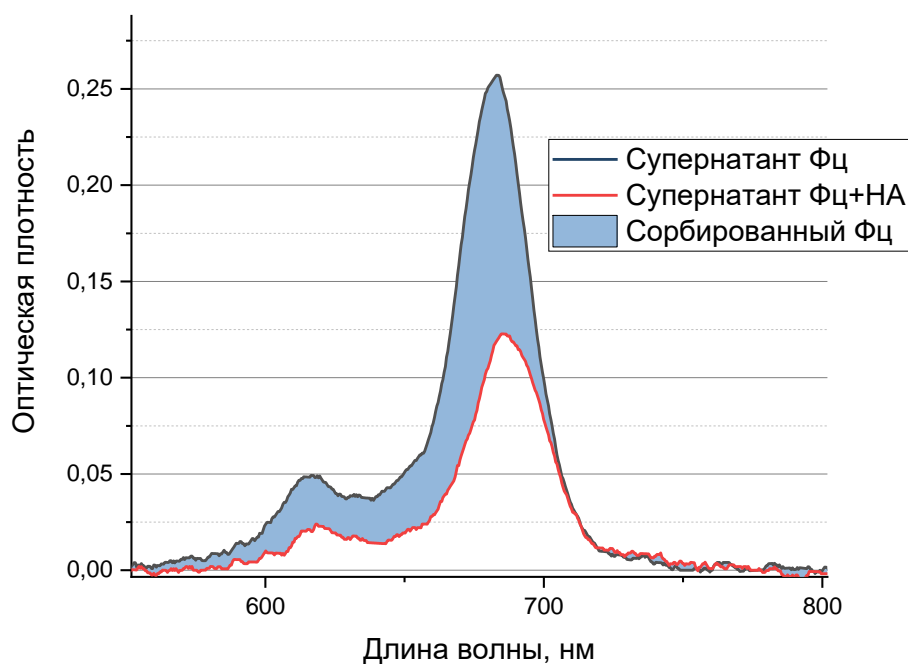


Рисунок 7. Спектр поглощения супернатанта после центрифугирования Фц и смеси Фц и НА. Ускорение 604 g, время 10 минут.

2.8 Определение эффективности генерации АФК

Так как уровень генерации АФК напрямую влияет на эффективность Фц как фотосенсибилизатора, мы провели оценку эффективности генерации АФК Фц в ГС с НА с помощью двухкомпонентной химической ловушки имидазол (ИА) - 4-нитрозоN,N-диметиланилин (НДМА). В качестве источника излучения для генерации АФК использовался светодиод MCWHLP1 (Thorlabs, США) с ограничивающим фильтром 650 LP. Оценка эффективности генерации АФК проводилась методом сравнения оптической плотности Фц и НДМА до облучения светом и спустя 10 минут после. Эксперимент был проделан для ГС с разным соотношением НА:Фц в трёх повторностях.

2.9 Сборка установки для освещения

Для оценки фотодинамического действия ГС Фц-НА в отношении клеток разработали осветительную установку для культуральных планшетов. Схема сборки осветительной установки показана на Рисунке 8А. В конструкции применялись красные светодиоды (пик излучения — 660 нм) со световым потоком 70 Лм, мощностью до 3 Вт и углом рассеяния 140°. Для стабилизации напряжения в цепи использовались резисторы номиналом 3,6 Ом. Электрическая схема подключения приведена на Рисунке 8Б. Светодиоды были сгруппированы в 3 блока по 8 штук, соединённых параллельно.

Монтаж выполнялся на медной плате, а для отвода тепла конструкция оснащалась металлическим радиатором. Каждый светодиод освещал квадрат из 4 лунок в 96-луночном планшете. Чтобы избежать перекрытия световых пятен от соседних светодиодов, установка была дополнена пластиковой рамкой, ограничивающей зону освещения. В качестве источника питания использовался прибор QJ3005T (Ningbo Jiuyuan Electronic Co., Ltd., Китай).

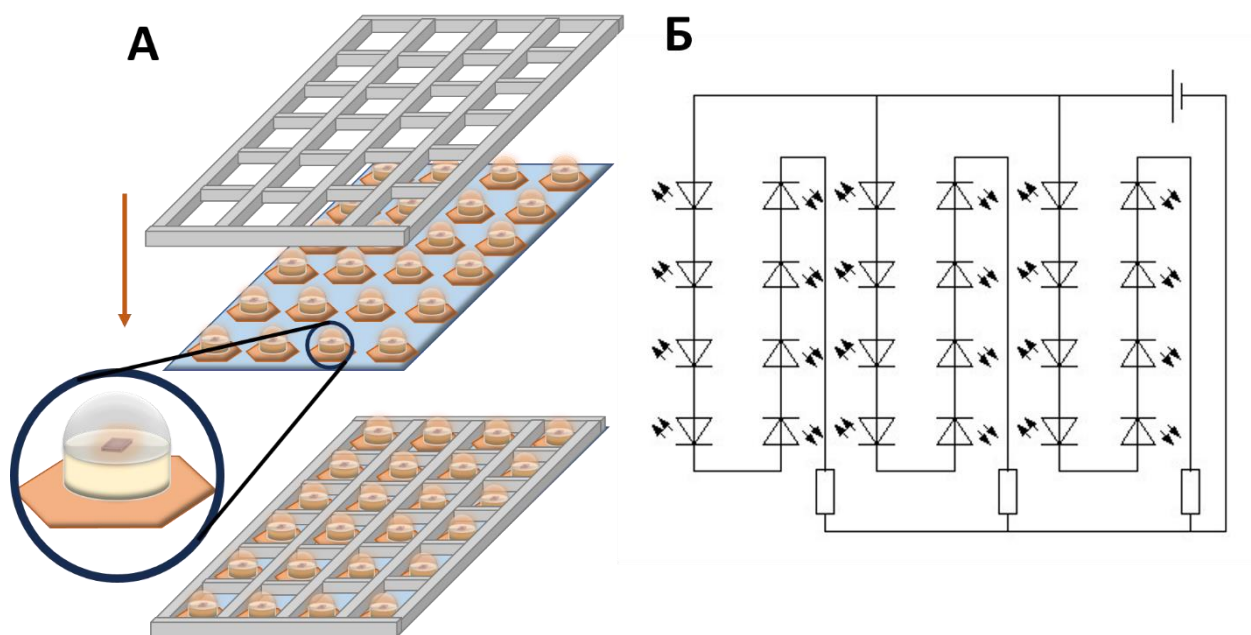


Рисунок 8. Основные характеристики осветительной установки. **А** – Схема сборки элементов осветительной установки, **Б** – электрическая схема компонентов.

Чтобы определить допустимые условия эксплуатации установки для живых объектов, проводились замеры температуры на уровне расположения планшета над светодиодной платой. Измерения выполнялись при разной продолжительности освещения и различных значениях силы тока.

Температурный мониторинг осуществлялся с помощью контроллера Мегеон 16312, оснащённого термопарами (Мегеон, Россия). Для регистрации светового потока на длине волны 660 нм применялся датчик РМ 160Т (ThorLabs, США).

2.10 Культура клеток

Эффективность работы установки изучали на клеточных линиях эпидермоидной карциномы человека А431 и эмбриональных клеток почки человека НЕК293. В экспериментах использовали фотосенсибилизатор – ZnPcChol+8. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ глутамин. Посев осуществляли в 96-луночные планшеты с плотностью около 2 000 клеток на лунку с последующей трехсуточной инкубацией при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Все реагенты для культивирования клеток были приобретены у компании «ПанЭко» (Россия).

2.11 Измерение концентрационной зависимости эффекта

Для изучения зависимости фотодинамического эффекта от концентрации Фц в клетках линии А431 использовали следующую методику. В лунки с клетками вносили равные объемы бессывороточной среды, содержащей Фц в различных концентрациях (от 0 до 3 мкМ, где 0 мкМ служил контролем). После 30-минутной инкубации клетки облучали на собранной установке в течение 3 минут при интенсивности 76 мВт/см², после чего дополнительно инкубировали в CO₂-инкубаторе 15 минут.

Оценку клеточной выживаемости проводили с помощью МТТ-теста: удаляли культуральную среду, добавляли по 100 мкл бессывороточной среды с МТТ-реагентом и инкубировали 4 часа. Затем раствор удаляли, а образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО. Оптическую плотность полученных растворов измеряли при 540 нм на планшетном ридере Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария). За 100% жизнеспособности принимали значения оптической плотности в контрольных лунках (без обработки Фц).

Аналогичным образом исследовали зависимость фотодинамического эффекта от концентрации Фц в клеточной линии НЕК293, соблюдая идентичные условия инкубации и экспериментальные параметры. Полученные данные по выживаемости клеток аппроксимировали сигмоидальной кривой, описываемой уравнением:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \frac{x^p}{x_0}} \quad (3)$$

где параметр A_1 соответствует максимальной выживаемости клеток, параметр A_2 – минимальной выживаемости (при данных условиях), параметр x_0 – концентрации Фц, при которой достигается половина от максимально возможного токсического эффекта Фц при данных условиях (полуметальная концентрация), параметр p характеризует скорость снижения выживаемости клеток при увеличении концентрации Фц.

2.12 Оценка равномерности освещения планшета

Для оценки равномерности освещения проводили следующий эксперимент. Два 96-луночных планшета заполняли раствором, содержащим имидазол-НДМА в концентрациях 5 мкМ и 25 мкМ соответственно, а также 0,5 мкМ Фц. Первый планшет использовали в качестве контроля: измеряли оптическую плотность при 440 нм во всех лунках и рассчитывали среднее арифметическое значение, которое принимали за исходный уровень для последующих вычислений. Второй планшет облучали на экспериментальной

установке в течение 6 минут при интенсивности 76 мВт/см², после чего повторно измеряли оптическую плотность при той же длине волны. Степень фотовыцветания НДМА в каждой лунке определяли по формуле:

$$c = \frac{ОП^{6 \text{ мин}}}{ОП^0 \text{ мин}}, \quad (4)$$

где c – степень фотовыцветания, $ОП^{6 \text{ мин}}$ – оптическая плотность в лунке планшета после облучения, $ОП^0 \text{ мин}$ – оптическая плотность в лунках контрольного планшета. Оптическую плотность в лунках планшета измеряли на планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия).

2.13 Определение дозовой зависимости фотодинамического эффекта

Для исследования зависимости фотодинамического эффекта от дозы света клетки линии A431 высевали в 96-луночный планшет со съемными рядами (8x1) и культивировали в течение 3 суток в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). В экспериментальные лунки вносили бессывороточную среду с 1 мкМ Фц (по три лунки в каждом ряду), в другие три лунки каждого ряда добавляли такой же объем среды без фотосенсибилизатора. Две оставшиеся лунки служили контролем (клетки без Фц и питательная среда). После 15-минутной инкубации проводили облучение установкой при интенсивности 76 мВт/см², последовательно извлекая ряды через 90, 120, 180, 240 и 300 секунд воздействия и помещая их в темноту. Затем весь планшет инкубировали еще 30 минут в CO₂-инкубаторе, после чего оценивали жизнеспособность клеток стандартным МТТ-тестом.

2.14 Измерение синглетного кислорода

Для верификации роли АФК в гибели клеток при фотодинамическом воздействии с Фц применяли флуоресцентный зонд H2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат, Biotium, США). Клетки линии A431

высевали на чашки Петри диаметром 3,5 см со стеклянным дном (плотность посева ~20 тыс. клеток/мл) и культивировали в течение 72 часов. В экспериментальной группе клетки обрабатывали 1 мкМ Фц с последующей 30-минутной инкубацией. Все образцы дважды отмывали бессывороточной средой, после чего инкубировали с 10 мкМ H2DCFDA (растворенным в ДМСО до конечной концентрации 0,1%) в течение 40 минут перед 3-минутным облучением установкой (76 мВт/см²).

Флуоресцентную визуализацию выполняли на инвертированном микроскопе Eclipse Ti2-U (Nikon, США) с двухфотонным возбуждением (1000 нм) при помощи фемтосекундного параметрического генератора TOPOL (Avesta Project LTD, Россия). Регистрацию сигнала осуществляли посредством конфокальной сканирующей системы DCS-120 Confocal Scanning FLIM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy – флуоресцентная микроскопия с временным разрешением) System с детектором HPM-100-40C (Becker & Hickl GmbH, Германия), записывая 25 последовательных кадров с экспозицией 1 минута на каждый. Анализ изображений проводили в программном обеспечении SPCImage NG (Becker & Hickl GmbH, Германия), количественно оценивая интенсивность флуоресценции по суммарному числу фотонов в максимуме кинетики затухания для всех пикселей изображения.

2.15 Эффективность ФДТ

Исследование фотодинамической активности Фц и ГС НА-Фц выполняли на культуре клеток эпидермоидной карциномы человека линии A431. Клеточную суспензию с плотностью 2 тыс. клеток/лунку высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в среде DMEM/F-12, содержащей 10% сыворотки и 2 мМ глутамин, при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в течение 3 суток. На третий день культуры клетки обрабатывали растворами Фц или ГС Фц-НА с последующей 30-минутной инкубацией. После обработки проводили 3-минутное облучение красным светом с использованием

экспериментальной установки. Через 15 минут после облучения культуральную среду заменяли на свежую, содержащую МТТ-реагент (50 мкг/мл), и инкубировали клетки в течение 4 часов. Затем раствор удаляли, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО и измеряли оптическую плотность при 540 нм на микропланшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия).

2.16 Визуализация ГС в клетках

Для визуализации ГС в клетках линии А431 высевали клетки линии А431 на чашки Петри диаметром 3,5 см со стеклянным дном (плотность посева ~20 тыс. клеток/мл) и культивировали в течение 72 часов. Далее мы добавляли к клеточной среде Фц до конечной концентрации 1 мкМ, ГС Фц-НА с концентрацией Фц 1 мкМ и соотношением компонентов ГС 19,3 мкмоль/г и эквивалентное число НА. После инкубации в течение 1 часа образцы трижды отмывали буфером DPBS (ПанЭко, Россия), затем добавляли раствор Хэнкса с 20 мМ соли HEPES и микроскопировали.

Флуоресцентную визуализацию выполняли на системе, описанной ранее, однако для возбуждения флуоресценции использовали лазер BDS-SM-LS-101 (Becker&Hickl, Германия).

Глава 3. Результаты

3.1 Размер наноалмазов и их поведение в водной среде

Перед использованием НА для биологических и медицинских целей необходимо определить основные структурные характеристики НА и их поведение в водной среде. Для этого мы использовали широкий спектр биофизических методов.

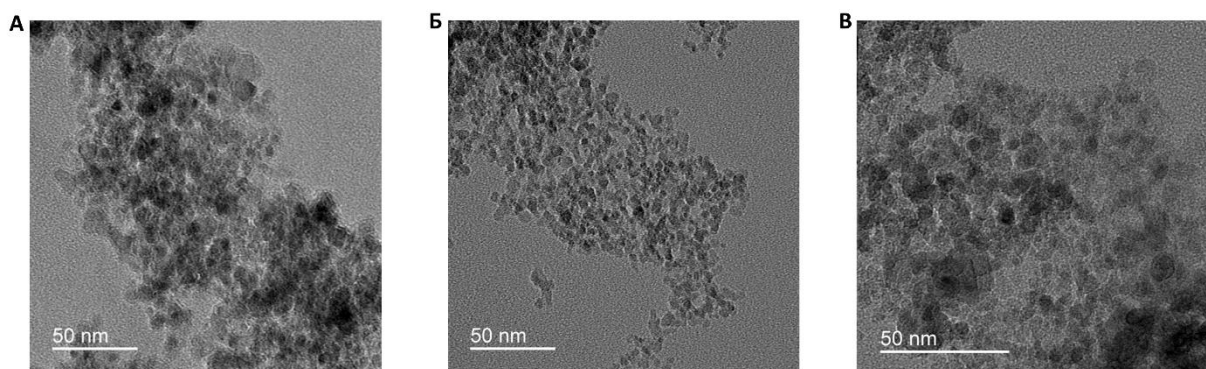


Рисунок 9. Фотографии НА, полученные методом ПЭМ: **А** – НА ТАН, **Б** – тетрил-НА, **В** – НА СТП.

В первую очередь мы определили размер НА самих по себе и в водной среде. Изображения НА, полученные методом ПЭМ, представлены на Рисунке 9А-В. На этих изображениях видно, что все типы используемых в работе НА имеют квазисферическую форму. Диаметр одной частицы НА для всех образцов составляет порядка 5 - 8 нм – типичные значения размера детонационных НА (Рисунок 10А) [14]. Такие размеры должны обеспечивать проникновение частиц НА в клетку. Однако в водной среде НА агрегируют. Методом динамического светорассеяния мы определили гидродинамический диаметр агрегатов. Максимальный гидродинамический диаметр среди используемых нами НА имеют НА ТАН: 890 ± 168 нм. Гидродинамические диаметры тетрил-НА и СТП имеют близкие значения: 97 ± 10 нм и 96 ± 15 нм соответственно (Рисунок 10Б). Это на порядок больше тех значений диаметров, которые были получены методом ПЭМ. Агрегация НА может

нивелировать преимущества малого диаметра частиц, поэтому перед нами встал вопрос уменьшения размера агрегатов.

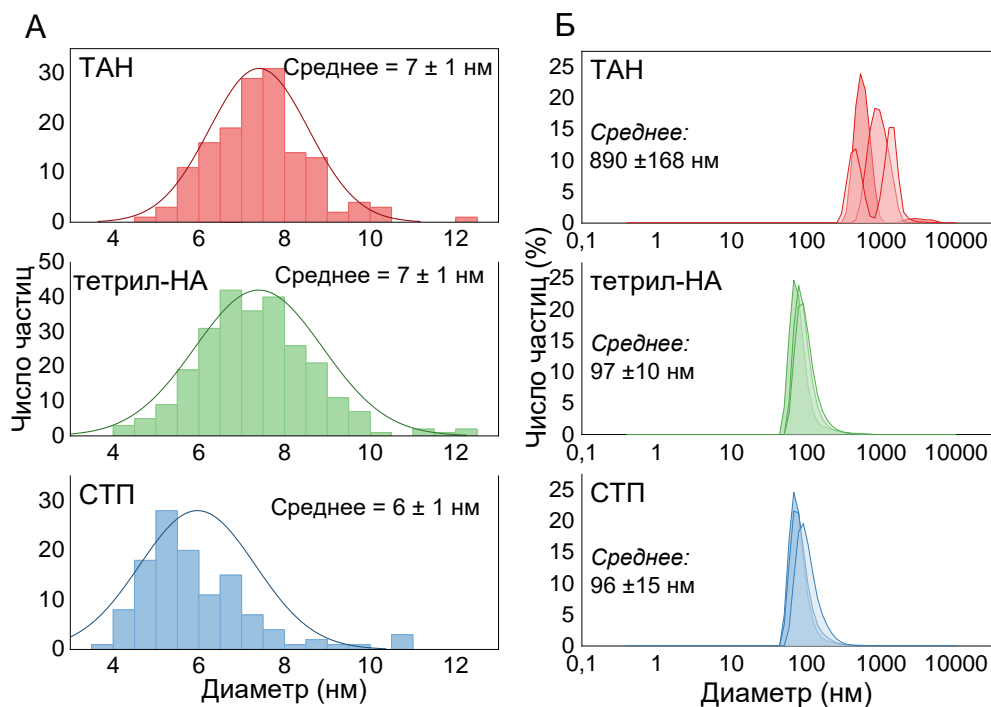


Рисунок 10. А – распределения размеров НА, полученные при анализе ПЭМ-изображений, Б – распределения размеров агрегатов НА в воде, полученные методом динамического светорассеяния.

Образование агрегатов НА – частая проблема, с которой сталкивались многие исследователи. В литературе приводятся различные гипотезы такого поведения НА. Ряд исследователей утверждают, что такое поведение связано с образованием углерода в sp^2 -гибридизации на поверхности НА в процессе синтеза. Углерод в sp^2 -гибридизации обладает гидрофобными свойствами, что приводит к возникновению агрегатов [14]. Другая гипотеза связывает агрегацию НА в воде с присутствием двухвалентных ионов кальция и магния [4]. Ионы связываются с заряженными группами на поверхности сразу двух НА, образуя между ними стабильную связь. Присутствие в воде множества ионов приводит к возникновению сети связанных друг с другом НА и возникновению агрегатов. Тогда для деагрегации частиц НА необходимо удалить из среды как можно больше двухвалентных ионов. Наконец, третья гипотеза агрегации НА связывает это явление с избыточной энергией углерода на поверхности НА [46]. В этом случае все методики по уменьшению диаметра

агрегатов имеют лишь временный эффект, а склонность к агрегации – характерная черта всех углеродных наночастиц.

Для повышения агрегативной устойчивости НА и уменьшения гидродинамического диаметра частиц были применены различные методы, такие как использование воды высокой степени очистки (MQ) в качестве растворителя, ультразвуковое диспергирование на мощности 400 Вт и ультрацентрифугирование на скорости 18 000 g. Гидродинамические диаметры агрегатов НА до и после обработки представлены на рис. 11А.

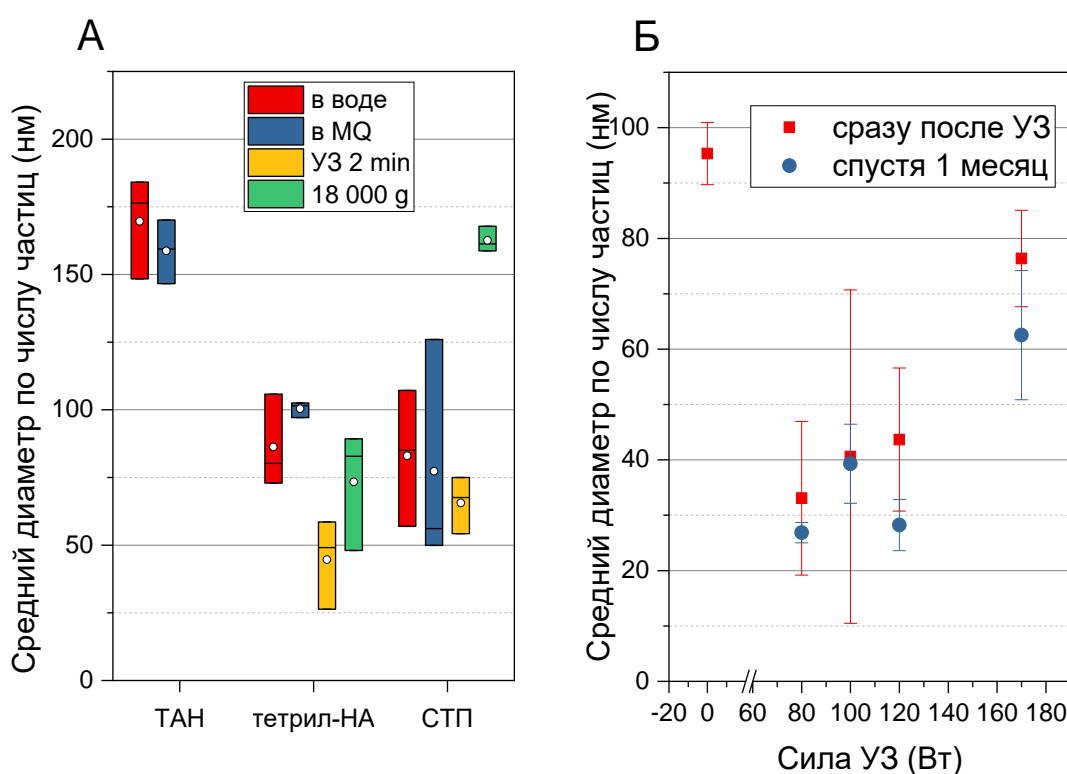


Рисунок 11. А - Средний гидродинамический диаметр по числу частиц различных НА после различных методов обработки: в дистиллированной воде, в воде MQ, после ультразвукового диспергирования (УЗ) в течение 2 минут на мощности 400 Вт и после ультрацентрифугирования с ускорением 18 000 g, Б – Средний гидродинамический радиус по числу частиц тетрил-НА после ультразвукового диспергирования при различных значениях мощности.

Уменьшения размера агрегатов НА ТАН указанными методами добиться не удалось. Использование MQ в качестве растворителя для НА ТАН сократило размаха гидродинамического диаметра, что говорит об снижении полидисперсности системы. Ультразвуковое диспергирование и

ультрацентрифугирование значительно увеличили гидродинамический диаметр агрегатов НА ТАН. Эти данные не представлены на графике, так как размер агрегатов превышал предел чувствительности прибора.

Размер агрегатов тетрил-НА удалось уменьшить с помощью ультразвукового диспергирования мощностью 400 Вт. Далее мы решили изменить мощность ультразвукового диспергирования для наилучшего результата. Наименьший размер агрегатов достигался при мощности 80 Вт, а эффект сохранялся, как минимум, в течение 1 месяца (Рисунок 11Б). Использование MQ сократило размах гидродинамического диаметра тетрил-НА. Однако ультрацентрифугирование не привело к достоверному изменению гидродинамического диаметра агрегатов тетрил-НА.

Для НА СТП указанные методы не улучшили агрегативную устойчивость. Использование MQ в качестве растворителя для НА СТП не повлияло на гидродинамический диаметр НА. После ультразвукового диспергирования НА-СТП значение размаха гидродинамического диаметра уменьшилось, но применение ультрацентрифугирования негативно сказалось на агрегативной устойчивости НА-СТП.

Таким образом, ультразвуковое диспергирование оказывает различное воздействие в зависимости от типа НА. В случае тетрил-НА агрегативная устойчивость увеличилась, для НА СТП значительных изменений не было. Агрегаты НА ТАН после воздействия ультразвукового диспергирования значительно увеличились в размерах. В основе метода ультразвукового диспергирования лежит разделение агрегатов под действием ударных волн, поэтому полученные результаты не могут найти объяснение с точки зрения химических превращений. Однако известно, что поверхность НА достаточно гетерогенна, а образование агрегатов связано с термодинамической выгодой от взаимодействия некоторых групп друг с другом. Значительное увеличение размеров агрегатов НА ТАН может объясняться следующим образом: при изначальном суспензировании НА в воде агрегаты имеют структуру, возникшую непосредственно в момент суспензирования наночастиц в воде.

При ультразвуковом диспергировании число событий возрастает, следовательно, возрастает и число термодинамически выгодных взаимодействий наночастиц друг с другом. В случае, если термодинамическая выгода существенна, константа диссоциации наночастиц очень низкая, и образовавшийся агрегат сохраняется или увеличивается в размерах. Поэтому мы наблюдаем увеличение размера агрегатов НА ТАН. В случае, если термодинамическая выгода от взаимодействия двух наночастиц низкая, и константа диссоциации агрегата высокая, агрегат распадается, что наблюдается при ультразвуковом диспергировании тетрил-НА. Таким образом, агрегативная устойчивость суспензии НА после ультразвукового диспергирования зависит от поверхностных свойств наночастиц, и данная процедура не гарантирует уменьшение размера агрегатов НА.

В некоторых работах в качестве способа увеличения агрегативной устойчивости НА выступает ультрацентрифугирование [68]. Однако в нашей работе использование ультрацентрифугирования не увеличило агрегативную устойчивость НА. Предполагается, что при ультрацентрифугировании молекулы воды, находясь под действием центробежного ускорения, проникают между наночастицами, разделяя при этом агрегаты. В случае, если взаимодействие с водой термодинамически невыгодно, уменьшение размера агрегатов не происходит. Однако мы наблюдали увеличение размера агрегатов НА после ультрацентрифугирования. Данные результаты могут объясняться предположением, что определённые типы НА в силу поверхностных свойств в водной среде способны к образованию сложных пористых структур.

Использование MQ в качестве растворителя дало небольшое улучшение агрегативной устойчивости НА. Поэтому в дальнейшей работе в качестве основного растворителя для НА мы использовали MQ, а не дистиллированную воду.

Согласно гипотезе о влиянии двухвалентных ионов на агрегативную устойчивость НА, использование хелатирующих агентов, например, ЭДТА, может уменьшить гидродинамический диаметр агрегатов. На Рисунке 12А

показаны изменения гидродинамического диаметра агрегатов НА СТП при увеличении концентрации ЭДТА в воде. При малых увеличениях концентрации ЭДТА размер агрегатов НА СТП значительно увеличивается. Однако при дальнейшем увеличении концентрации ЭДТА гидродинамический диаметр агрегатов остаётся неизменным. На рис. 11Б представлены значения гидродинамических диаметров НА ТАН, тетрил-НА и НА СТП в MQ, в 9 мМ растворе ЭДТА и в 9 мМ растворе ЭДТА после ультразвукового диспергирования. В растворе ЭДТА гидродинамический диаметр агрегатов увеличивается для всех типов НА, однако после обработки ультразвуковым диспергированием гидродинамический диаметр агрегатов достоверно снижается для тетрил-НА и НА СТП. После ультразвукового диспергирования в ЭДТА гидродинамический диаметр агрегатов тетрил-НА достигает меньших значений по сравнению с гидродинамическим диаметром агрегатов в MQ, что свидетельствует о повышении агрегативной устойчивости. Таким образом, эффект от использования ЭДТА аналогичен эффекту от добавления соли в среду с НА: при добавлении соли в малых концентрациях происходит увеличение размеров агрегатов НА, однако при дальнейшем увеличении концентрации соли размеры агрегатов не изменяются. Данный эффект известен в литературе как коагуляция электролитами. После ультразвукового диспергирования НА в среде, содержащей ЭДТА, гидродинамический диаметр агрегатов достоверно снижается для всех типов НА. Тем не менее, уменьшения размеров агрегатов по сравнению с исходными значениями удалось добиться только для тетрил-НА. Однако это может быть вызвано не присутствием ЭДТА, а ультразвуковым диспергированием, так как размер агрегатов после ультразвукового диспергирования и ультразвукового диспергирования с ЭДТА достоверно не отличается.

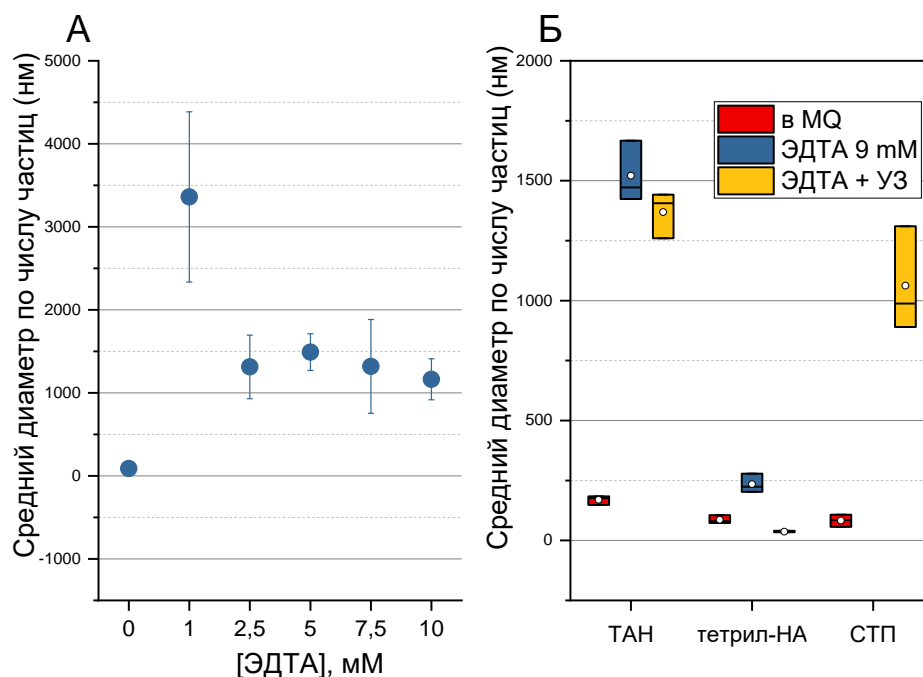


Рисунок 12. А – Гидродинамический размер НА СТП в присутствии ЭДТА различной концентрации, Б – гидродинамический размер НА в воде MQ, в присутствии 9 мМ ЭДТА и в присутствии 9 мМ ЭДТА после ультразвукового диспергирования на мощности 400 Вт.

Таким образом, в нашей дальнейшей работе для увеличения агрегативной устойчивости мы использовали только ультразвуковое диспергирование в отношении тетрил-НА. Также в качестве основного растворителя для всех НА мы использовали MQ. Ультрацентрифугирование и внесение ЭДТА не оказало положительного эффекта на агрегативную устойчивость НА.

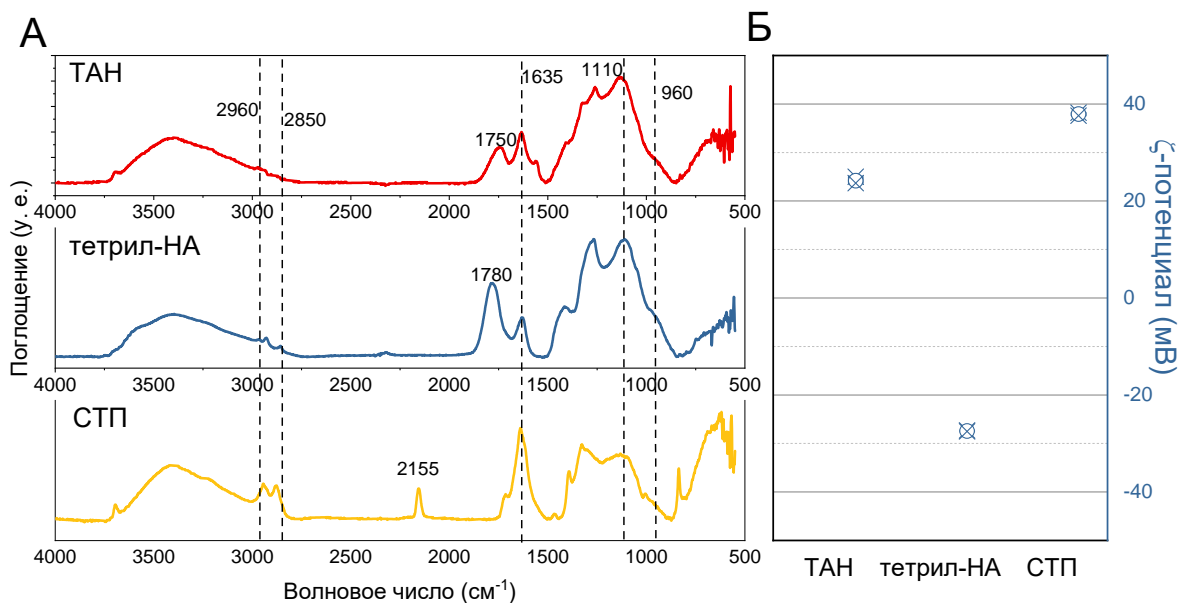


Рисунок 13. А – FTIR-спектры НА, Б – ζ -потенциал НА, полученный методом динамического светорассеяния.

3.2 Свойства поверхности наноалмазов

Далее мы исследовали поверхность НА и возможные химические группы на поверхности. НА ТАН и СТП имели положительный ζ -потенциал: $24,2 \pm 0,7$ мВ и $37,1 \pm 0,34$ мВ соответственно, а тетрил-НА имели отрицательный ζ -потенциал: $-27,4 \pm 0,12$ мВ (Рисунок 13Б). На Рисунке 13А представлены ИК-спектры с Фурье-преобразованием образцов НА, использованных в работе. В спектрах наблюдается широкая полоса при 3400 см^{-1} , характерная для воды. Согласно литературным данным, НА поглощают воду, и соответствующие полосы часто наблюдаются в ИК-спектре НА [41]. Полоса при 1110 см^{-1} характерна для эфирных связей и обусловлена их асимметричным изгибом [41]. Полосы при 2960 см^{-1} и 2850 см^{-1} особенно интенсивны для тетрил-НА и НА СТП, которые характерны для симметричных и асимметричных валентных колебаний CH_2 [40]. Однако полосы симметричных и асимметричных валентных колебаний CH_2 находятся в той же области, поэтому можно быть уверенным только в наличии водорода на поверхности НА [40]. Специфическая полоса поглощения для НА ТАН

составляет 1750 см^{-1} (валентные колебания C=O карбонильной группы), для тетрил-НА – 1780 см^{-1} (валентные колебания C=O карбоксильной группы), для НА СТП – 2155 см^{-1} (валентные колебания тройных связей или валентные колебания азотсодержащих групп) [13, 15].

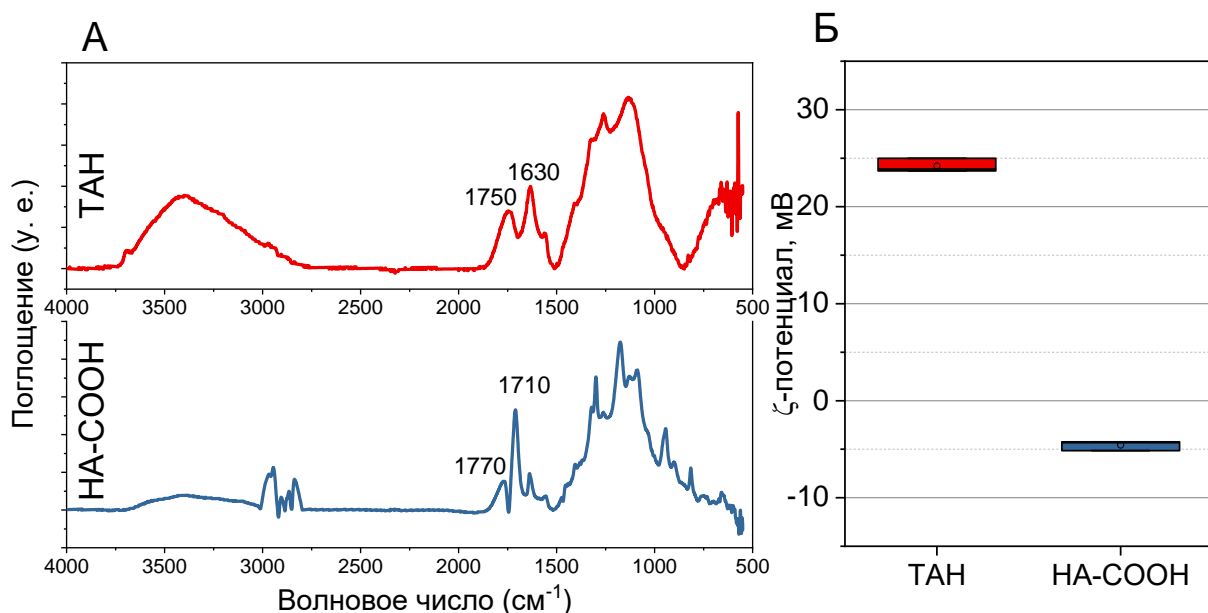


Рисунок 14. А – FTIR-спектры НА ТАН до и после карбоксилирования, Б – ζ -потенциал НА ТАН до и после карбоксилирования. Изменение ζ -потенциала с положительного на отрицательный и появление полос 1770 см^{-1} и 1710 см^{-1} говорит об успешном карбоксилировании НА.

На Рисунке 14А представлено сравнение ИК-спектров с Фурье-преобразованием НА ТАН до и после карбоксилирования. Можно наблюдать снижение интенсивности широкой полосы от 3750 см^{-1} до 3000 см^{-1} , появление полос в диапазоне $2960 - 2850\text{ см}^{-1}$, элиминация полос 1750 и 1630 см^{-1} , возникновение полос 1770 и 1710 см^{-1} . Полосы 1770 и 1710 см^{-1} ассоциированы с карбоксильными группами [15].

На Рисунке 14Б представлено изменение ζ -потенциала НА ТАН после карбоксилирования. ζ -потенциал после карбоксилирования изменился с положительных на отрицательные значения, что также свидетельствует об успешной модификации. В дальнейшем мы будем обозначать карбоксилированные НА как НА-СООН.

На Рисунке 15 показаны спектры комбинационного рассеяния для всех четырех типов НА. В представленных спектрах наблюдаются характерные для НА пики 1330 см^{-1} и 1590 см^{-1} (G-полоса) [14]. Полоса 1330 см^{-1} коррелирует с алмазным углеродом в образце, а полоса 1590 см^{-1} — с присутствием углерода в sp^2 -гибридизации. Спектр НА ТАН и СТП также показывает полосу 1360 см^{-1} . Известно, что в спектре комбинационного рассеяния НА полоса D (аморфный углерод) присутствует в области 1410 см^{-1} , но это положение справедливо для возбуждения в ультрафиолетовой области [38]. При возбуждении в области более длинных волн полоса D смещается в область меньших значений рамановского сдвига [38]. Таким образом, полоса при 1360 см^{-1} может быть соотнесена с полосой D НА. Эта полоса наиболее ярко выражена у НА ТАН и СТП, что говорит о преобладании аморфного углерода на их поверхности. Таким образом, исследуемые нами НА состоят из углерода в sp^3 -гибридизации, углерода в sp^2 -гибридизации (согласно литературным данным, находится на поверхности) и аморфного углерода, наиболее выраженного у НА ТАН и СТП.

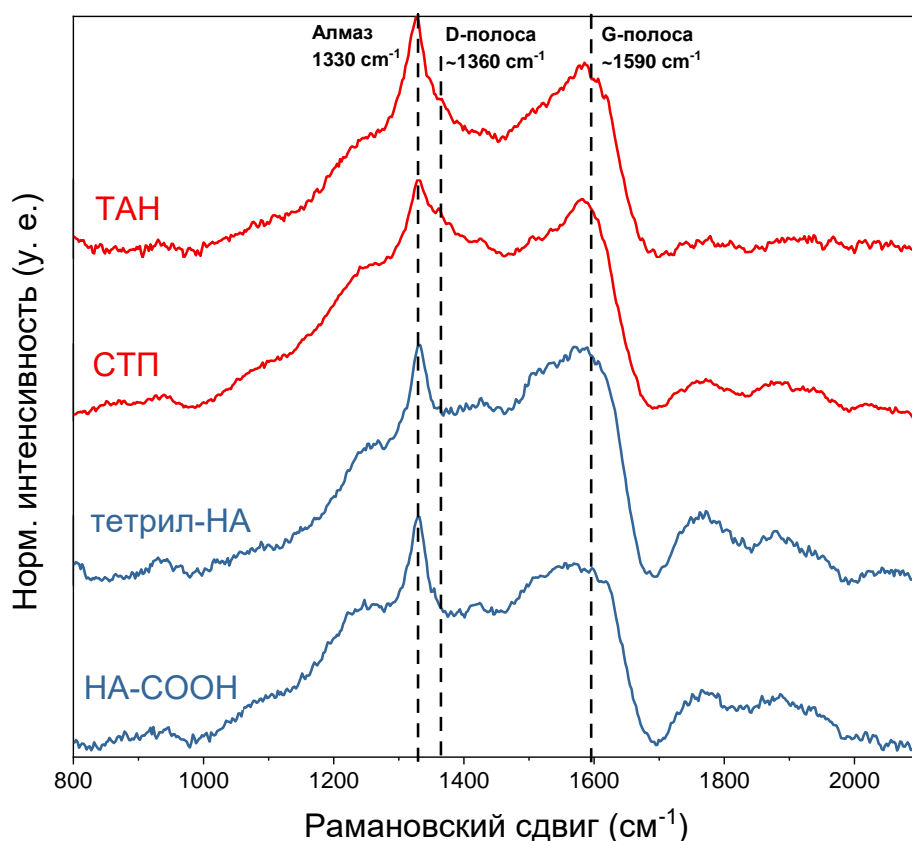


Рисунок 15. Спектры комбинационного рассеяния НА. Полоса 1360 см⁻¹ соответствует аморфному углероду, наиболее выражена у НА ТАН и СТП.

3.4 Токсичность наноалмазов

МТТ-тест не выявил статистически значимых различий между выживаемостью клеток мышинных эмбриональных фибробластов, инкубированных при концентрациях всех указанных типов НА вплоть до 20 мкг/мл, и контрольных клеток, инкубированных в отсутствие НА. Данный результат свидетельствует об отсутствии ярко выраженной цитотоксичности использованных нами НА в отношении здоровых клеток при концентрациях до 20 мкг/мл

Мы показали, что исследуемые нами НА имеют квазисферическую форму и диаметр около 7 нм. В воде НА образуют агрегаты диаметром до 100 нм, что является допустимым размером для проникновения частиц в клетку. На поверхности НА находятся различные функциональные группы, обеспечивающие положительный или отрицательный ζ -потенциал частиц. Также на поверхности НА находится углерод в sp^2 -гибридизации, на поверхности НА ТАН и СТП особенно выражен аморфный углерод. Помимо этого, мы установили биосовместимость наших НА. Далее необходимо исследовать взаимодействие описанных нами структур с Фц.

3.5 Образование ГС с фталоцианином

3.5.1 Сдвиг Q-полосы поглощения фталоцианинов

В нашей работе способность определённого типа НА образовывать ГС с тем или иным Фц была показана методом титрования раствора Фц суспензией НА. На Рисунке 16А представлен пример изменения спектра Q-полосы поглощения Фц при титровании НА. Если при увеличении концентрации НА максимум Q-полосы поглощения сдвигался в красную область, то мы предполагали наличие взаимодействия между Фц и НА. На рис. 15В представлен пример построения кривой титрования и её последующей аппроксимацией функцией (1). Для корректного сравнения параметр x_0 из результатов аппроксимации нормировался на концентрацию Фц в эксперименте. Полученные значения имеют размерность г/моль и представлены в таблице на рис. 15В. Если положение максимума поглощения не менялось, в таблице проставлялся прочерк.

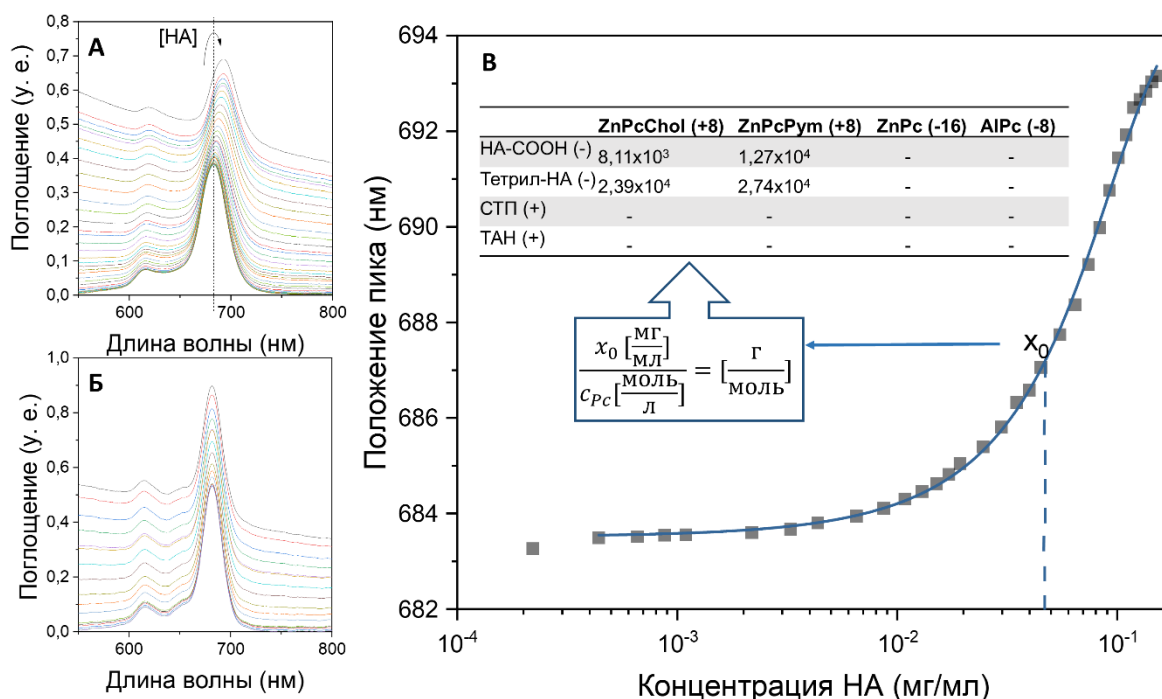


Рисунок 16. А – батохромный сдвиг максимума поглощения Фц после взаимодействия с НА, Б – увеличение оптической плотности в связи с рассеянием НА без батохромного сдвига, В – пример кривой титрования НА-Фц построенной на батохромном сдвиге максимума поглощения Фц. На вставке представлена таблица значений x_0 , разделённая на концентрацию Фц для разных пар Фц-НА (размерность г/моль). Если спектр Фц не смещался, в таблице ставили прочерк.

На основе этих данных можно сделать следующий вывод: электростатическое притяжение между разноимённо заряженным НА и Фц – обязательное, но не достаточное условие для образования ГС. Смещение максимума полосы поглощения при взаимодействии положительно заряженных НА ТАН и НА СТП с отрицательно заряженными Фц зарегистрировано не было. Эффективность образования ГС зависела не только от количества функциональных групп Фц, но и от их характера: фотосенсибилизатор с холиниловыми заместителями обладал большим сродством к НА, чем фотосенсибилизатор с пиримидиновыми заместителями. Такой эффект может быть обусловлен стерическими затруднениями: пиримидиновые группы имеют большую площадь поверхности по сравнению с холиниловыми группами.

Наиболее эффективно образование ГС идёт в паре ZnPcChol+8/НА-СООН. Однако для дальнейшего изучения нами была выбрана пара ZnPcChol+8/тетрил-НА. Выбор обусловлен лучшей агрегативной устойчивостью данного типа НА и высоким средством Фц с холиниловыми заместителями к НА. Аппроксимация сигмоидной кривой уравнением (1) и последующая нормировка на концентрацию Фц показала, что при соотношении НА к Фц $2,39 \times 10^4$ г/моль половина молекул Фц находится в связанном состоянии. Следовательно, при соотношении НА к Фц $4,78 \times 10^4$ г/моль все молекулы Фц находятся в связанном с НА состоянии. Для удобства дальнейших расчётов найдём обратное значение соотношения, оно составляет $2,1 \times 10^{-5}$ моль/г или 21 мкмоль/г.

Стоит подчеркнуть, что данное значение характеризует только батохромный сдвиг Q_1 -полосы поглощения Фц. При увеличении этого соотношения (добавлении Фц в систему) часть Фц оказывается неспособной связаться с НА, поэтому максимум Q_1 -полосы поглощения Фц сдвигается в сторону меньших значений. При увеличении количества НА в системе и уменьшении соотношения Фц к НА спектральных изменений в Q_1 -полосе поглощения Фц не наблюдается.

3.5.2 Изотерма адсорбции фталоцианинов

Рассчитанный таким образом максимум насыщения фталоцианинов наноалмазами не даёт ответа о стабильности ГС, поэтому мы построили изотерму адсорбции Фц на НА и определили максимально возможное количество адсорбированного вещества. Изотерма адсорбции имеет вид логарифмической функции (Рисунок 17А), что свидетельствует о пористой структуре адсорбента (НА) [18, 35]. Для определения максимальной сорбционной ёмкости данный график был построен в координатах зависимости количества адсорбата, разделённого на количество

адсорбированного вещества, от количества адсорбата (Рисунок 17Б). Известна следующая зависимость:

$$\frac{n}{a} = \frac{1}{a_{max}^k} + \frac{n}{a_{max}}, \quad (5)$$

где n – количество адсорбата, моль, a – количество адсорбированного вещества, a_{max} – максимально возможное количество адсорбированного вещества (полное насыщение), k – константа сорбции [6, 57]. При аппроксимации графика на Рисунке 17Б уравнением прямой коэффициент при аргументе соответствует обратному значению максимального количества адсорбированного вещества. Проведённые расчёты показали, что полное насыщение тетрил-НА фталоцианинами ZnPcChol+8 достигается при соотношении Фц:НА 56,5 мкмоль/г.

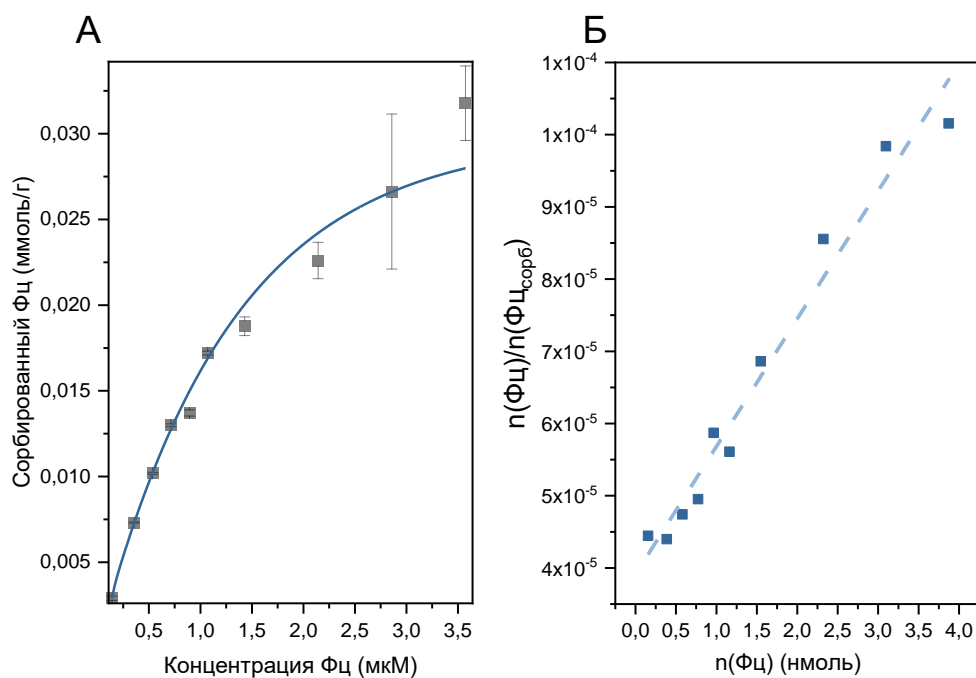


Рисунок 17. **А** – изотерма адсорбции ZnPcChol+8 на тетрил-НА в стандартных координатах; **Б** – изотерма адсорбции ZnPcChol+8 на тетрил-НА в координатах линеаризованной формы изотермы Ленгмюра.

Это больше того значения, которое мы получили путём титрования Фц. Стоит принимать во внимание, что определение константы сорбции основывалось на седиментации ГС Фц-НА при заданных условиях центрифугирования. Следовательно, при соотношениях больше 56,5 мкмоль/г

молекулы Фц не удерживаются НА и остаются в супернатанте, при соотношениях меньше – осаживаются в ГС. Таким образом, в диапазоне соотношений 21 мкмоль/г – 56,5 мкмоль/г часть Фц связана с НА взаимодействием, которое характеризуется сдвигом Q_1 -полосы поглощения, а часть – взаимодействием, при котором сдвиг Q_1 -полосы отсутствует, но ГС обладает некоторой стабильностью.

3.5.3 Изменение ζ -потенциала поверхности наноалмаза

Так как молекулы ZnPcChol+8 и тетрил-НА разноимённо заряжены, необходимо определить значение ζ -потенциала на поверхности ГС. На Рисунке 18Б представлен ζ -потенциал и гидродинамический диаметр ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА. При малом количестве Фц на НА ζ -потенциал частиц в коллоидной системе близок к нулю (-3 мВ), при этом образуются крупные агрегаты около 1200 нм в диаметре. Однако при увеличении соотношения Фц к НА до 38,7 мкмоль/г происходит перезарядка частиц, а коллоидная стабильность системы увеличивается. При дальнейшем увеличении количества молекул Фц гидродинамические параметры частиц не изменяются.

3.5.4 Тушение флуоресценции фталоцианинов

Так как образование ГС на основе НА может влиять на фотодинамические свойства Фц, мы измерили интенсивность и длительность флуоресценции Фц самого по себе и в ГС с НА. В результате мы выяснили, что при взаимодействии с тетрил-НА происходит тушение флуоресценции ZnPcChol+8 (Рисунок 18А). Причиной тушения флуоресценции Фц принято считать π - π стекинг между порфириновым кольцом Фц и атомами углерода в sp^2 -гибридизации на поверхности НА [63]. Подобное взаимодействию приводит к перераспределению констант дезактивации возбуждённого состояния, и константа флуоресценции снижается.

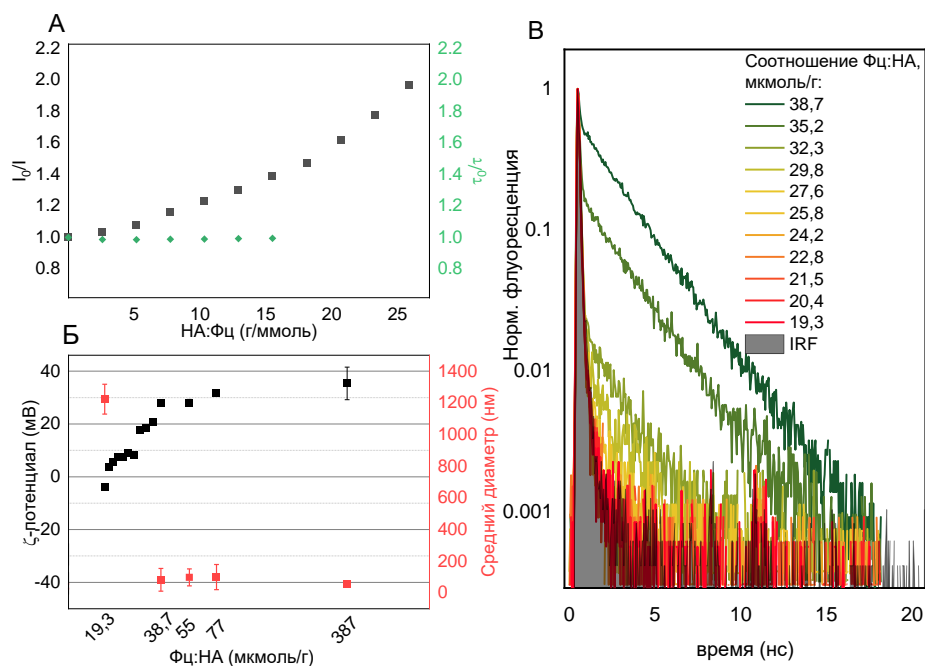


Рисунок 18. А – График Штерна-Фольмера для тушения ZnPcChol+8 тетрил-НА, полученные зависимости соответствуют статическому тушению, Б – ζ-потенциал и гидродинамический диаметр ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА при разных соотношениях Фц:НА, В – нормированная кинетика затухания флуоресценции ZnPcChol+8 в ГС на основе тетрил-НА.

Для определения типа тушения мы построили графики в координатах Штерна-Фольмера при разных температурах (Рисунок 19А). Длительность флуоресценции Фц при увеличении концентрации НА не изменяется, что говорит о статическом типе тушения [50]. При таком типе тушения образуется ГС с иными значениям констант дезактивации возбуждённого состояния Фц. Однако при повышении температуры интенсивность тушения флуоресценции увеличивается. Так как цинковые Фц фотонестабильны, мы построили график тушения в координатах Штерна-Фольмера для более стабильных Фц – алюминиевых (Рисунок 19Б). Как видно из сопоставления графиков, основная тенденция: увеличение интенсивности тушения при увеличении температуры, сохраняется для алюминиевого Фц. Такая закономерность является характерной чертой динамического тушения, при котором тушение обеспечивается столкновением молекул флуорофора и тушителя друг с другом с передачей части энергии. На основе этих данных можно сделать вывод, что

тушение флуоресценции Фц наноалмазами происходит по смешанному типу, но для корректной интерпретации необходимо сравнение с данными других экспериментов.

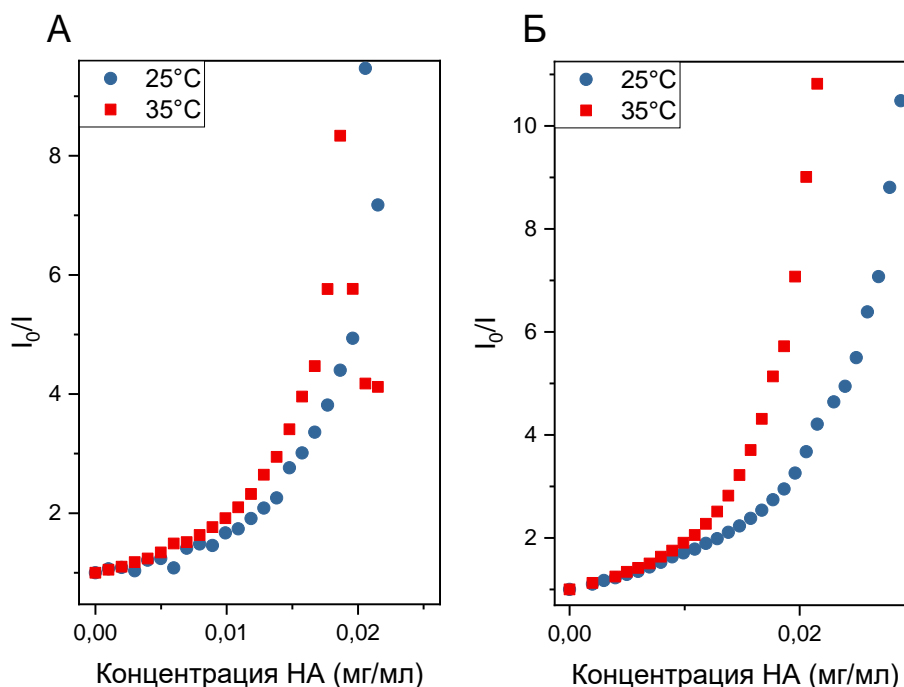


Рисунок 19. Тушение флуоресценции Фц тетрил-НА в координатах Штерна-Фольмера для ZnPcChol+8 (А) и для алюминиевого Фц с холиниловыми заместителями (Б).

По данным из кинетик затухания флуоресценции Фц в ГС на основе НА мы попытались определить максимальное количество связанного ZnPcChol+8 с тетрил-НА. На Рисунке 18В представлены нормированные кинетики затухания флуоресценции ZnPcChol+8 в ГС с тетрил-НА при низких соотношениях Фц к НА. Так как НА имеют свойство рассеивать попадающее на них электромагнитное излучение, необходимо учитывать вклад рассеяния в полученных кинетиках (выделено серым цветом). С уменьшением соотношения Фц к НА вклад флуоресценции Фц в общий вид кинетики уменьшается, в районе значений 22,8 – 19,3 мкмоль/г флуоресценция Фц отсутствует, наблюдается только рассеяние НА. Математический анализ кинетик представлен в таблице 1. Для анализа кинетики аппроксимировали уравнением двойной компоненты, где быстрая компонента отвечала за

рассеяние НА, а медленная – за флуоресценцию Фц. Медленная компонента не определяется в кинетике при соотношениях Фц:НА 29,8 мкмоль/г и ниже. Эти цифры довольно близки к тем, которые мы получили с помощью анализа Q₁-полосы поглощения (21 мкмоль/г). Можно предположить, что оба эти явления: сдвиг Q₁-полосы поглощения и тушение флуоресценции ассоциированы с одним механизмом – π-π стекингом.

Таблица 1. Результаты аппроксимации кинетик затухания флуоресценции Фц в ГС на основе НА. Быстрая компонента отвечает за рассеяние НА, медленная компонента – за флуоресценцию Фц.

Фц:НА, мкмоль/г	НА (рассеяние)		Фц	
	A1	t1	A2	t2
38,7	28 ± 3	0,119 ± 0,003	0,700 ± 0,004	2,39 ± 0,02
35,2	56 ± 4	0,118 ± 0,002	0,206 ± 0,005	2,53 ± 0,08
32,3	90 ± 9	0,110 ± 0,002	0,013 ± 0,005	3 ± 2
29,8	80 ± 7	0,112 ± 0,002	0,004 ± 0,005	5 ± 11
27,6	85 ± 9	0,111 ± 0,003	-	-

3.5.5 Ключевые соотношения компонентов ГС

Согласно полученной нами изотерме адсорбции максимально возможное количество адсорбированного ZnPcChol+8 на тетрил-НА – 56,5 мкмоль/г. Так как при таком соотношении в ГС наблюдается ненулевая интенсивность флуоресценция Фц, взаимодействие за счёт π-π стекинга реализуется лишь частично, и некоторая доля Фц связана с НА иным типом взаимодействия. Сопоставим полученные значения насыщения с ζ-потенциалом поверхности НА. При полном насыщении фталоцианинов наноалмазами (концентрация 21 мкмоль/г, определена по сдвигу Q-полосы поглощения) ζ-потенциал системы имеет небольшие отрицательные значения (-3 мВ), что говорит о наличии отрицательных зарядов на поверхности НА, не связанных с Фц. При

увеличении концентрации Фц происходит перезарядка ГС, при этом коллоидная стабильность повышается. Таким образом, часть Фц связывается с НА за счёт электростатических взаимодействий, которые не приводят к спектральным изменениям Фц.

Проведённые нами расчёты позволяют выявить три ключевых соотношения Фц:НА, при которых меняются характеристики ГС (Рисунок 20). При соотношении 21 мкмоль/г и ниже флуоресценция Фц полностью потушена, пик Q_1 -полосы поглощения Фц имеет максимально возможный батохромный сдвиг. При соотношении 38,7 мкмоль/г и выше ГС имеет ζ -потенциал +30 мВ. Соотношение 56,5 мкмоль/г является основным для коллоидной стабильности ГС, увеличение этого значения ведёт к неустойчивости ГС при механическом воздействии.

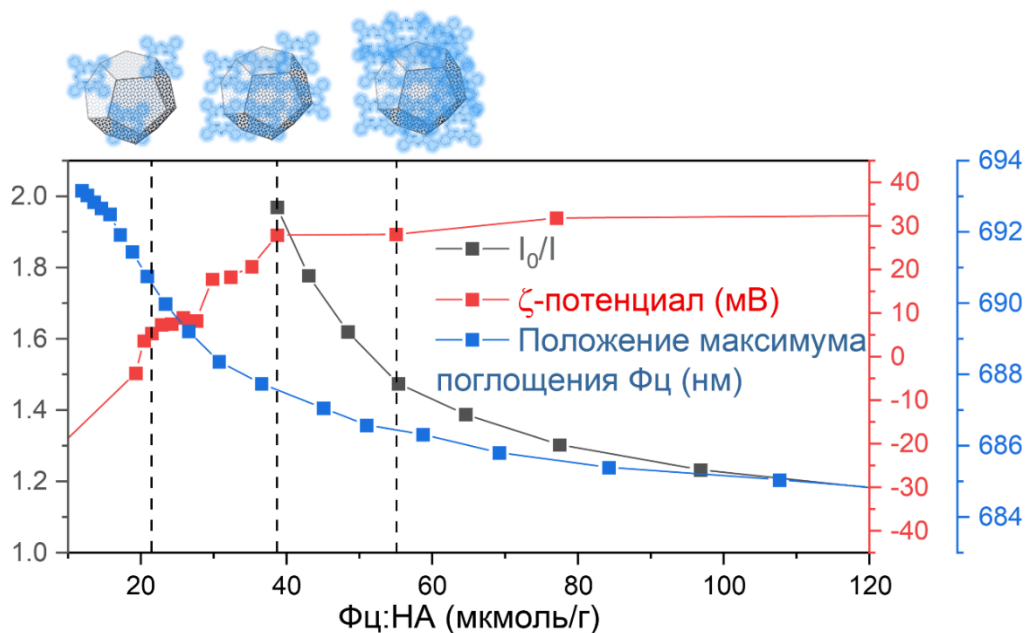


Рисунок 20. Ключевые соотношения ZnPcChol+8 и тетраил-НА в ГС и её свойства. При соотношении Фц:НА 21 мкмоль/г и ниже наблюдается максимально возможный батохромный сдвиг и тушение флуоресценции (взаимодействия за счёт π - π стекинга), в диапазоне соотношений 21-38,7 мкмоль/г происходит перезарядка частицы (электростатические взаимодействия), ГС с соотношением 56,5 мкмоль/г стабильна при центрифугировании.

Исходя из представленных выше данных можно сделать вывод о двух разных типах взаимодействий тетрил-НА с ZnPcChol+8. Первый тип взаимодействия обусловлен π - π стекингом между ароматическими группами на поверхности НА и π -электронной системой Фц. Данный тип взаимодействия характеризуется батохромным сдвигом Q_1 -полосы поглощения Фц и отсутствием флуоресценции Фц в ГС. Второй тип взаимодействия обусловлен электростатическим притяжением между разноимённо заряженными Фц и НА. При этом тушения флуоресценции Фц не происходит, и для определённых соотношений компонентов ГС устойчива при механическом воздействии. Возможность образования ГС между НА и Фц изначально определялась как сдвиг Q_1 -полосы поглощения Фц при добавлении НА, однако в ходе дальнейших исследований мы выдвинули гипотезу, что отсутствие батохромного сдвига Q_1 -полосы поглощения исключает возможность π - π стекинга между Фц и НА, но не исключает возможность электростатического взаимодействия.

3.5.6 ГС без π - π стекинга

Для проверки данной гипотезы мы провели ряд экспериментов, которые могли бы показать электростатическое взаимодействие между НА и Фц без π - π стекинга. Для этого мы выбрали пару НА-СТП и ZnPc-16. По данным, полученным путём титрования Фц наноалмазами, в этой паре не наблюдается сдвига Q -полосы поглощения (Рисунок 16В), однако НА-СТП и ZnPc-16 имеют разноимённые заряды и электростатическое притяжение между ними возможно.

Мы измерили ζ -потенциал частиц НА-СТП после добавления ZnPc-16. На Рисунке 21А показано изменение ζ -потенциала НА-СТП при добавлении Фц. Собственный заряд НА положительный, однако при добавлении Фц происходит перезарядка поверхности. Изменение ζ -потенциала НА говорит о связывании Фц с НА. Зависимость ζ -потенциала системы от концентрации Фц

нелинейна: при небольших концентрациях Фц происходит перезарядка системы до значений порядка -30 мВ, однако, как и в случае с тетрил-НА и ZnPcChol+8, дальнейшее увеличение концентрации Фц оказывает незначительное влияние на ζ -потенциал частиц. Подобные наблюдения говорят об образовании ГС между НА-СТП и ZnPc-16 за счёт электростатического взаимодействия. Так как НА-СТП имеет ограниченное количество зарядов на своей поверхности, после связывания определённого числа молекул Фц другие молекулы Фц не имеют возможности связаться с НА-СТП и поэтому не оказывают влияния на гидродинамические параметры системы.

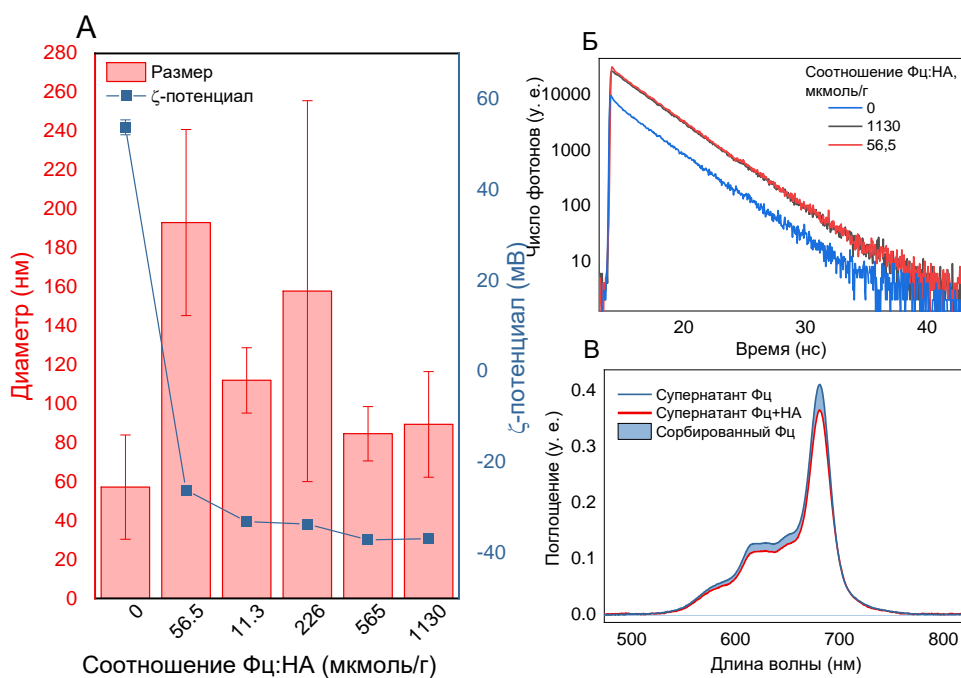


Рисунок 21. А – Изменение гидродинамического диаметра и ζ -потенциала положительно заряженного НА СТП при добавлении ZnPc-16; Б – кинетика затухания флуоресценции ZnPc-16 до и после добавления НА СТП; В – Поглощение супернатанта раствора ZnPc-16 после центрифугирования на скорости 604 г в контроле и в присутствии НА СТП.

Второй эксперимент по образованию ГС между НА-СТП и ZnPc-16 был посвящён осаждению ГС в результате центрифугирования. Методом оптической абсорбционной спектроскопии было показано, что оптическая плотность Фц в супернатанте образца с НА меньше, чем в супернатанте

образца без НА (Рисунок 21В). Это свидетельствует об образовании ГС ZnPc-16 с НА-СТП и соосаждении компонентов. Таким образом, на основе проведённых экспериментов, мы сделали следующий вывод: взаимодействие между Фц и НА возможно за счёт электростатических сил без участия π - π стекинга.

Такие различия в механизмах образования ГС могут объясняться поверхностными свойствами НА. Из анализа спектров комбинационного рассеяния (Рисунок 15) мы знаем, что на поверхности НА-тетрил и НА-СООН преобладает углерод в sp^2 -гибридизации. Углерод в sp^2 -гибридизации характеризуется наличием π -электронов, за счёт которых и осуществляется π - π стекинг с Фц. На поверхности НА ТАН и СТП, согласно данным спектроскопии комбинационного рассеяния, преобладает аморфный углерод, который может препятствовать взаимодействию π -электронных систем НА и Фц. Примечательно, что способность образовывать π - π стекинг с Фц у НА-СООН проявилась после модификации карбоксильными группами. Таким образом, можно предсказать образование π - π стекинга нанодиама с молекулой Фц на основе спектров комбинационного рассеяния, а способность поверхности образовывать π - π стекинг обеспечивается на этапе модификации НА.

3.5.7 Генерация АФК

Так как основным практическим применением Фц является генерация АФК под действием света, необходимо выяснить, влияет ли взаимодействие с НА за счёт электростатических сил на флуоресценцию Фц. Кинетики затухания флуоресценции Фц отдельно и в ГС на основе НА не имеют существенных отличий (Рисунок 21Б). Изменений длительности флуоресценции нет. Следовательно, электростатическое взаимодействие с НА в отличие от π - π стекинга не влияет на флуоресценцию Фц.

Увеличенная интенсивность флуоресценции Фц в ГС с НА (Рисунок 21Б) может объясняться уменьшением числа димеров Фц. В основе всех Фц лежит гидрофобная молекула порфирина. Для обеспечения растворимости в воде Фц модифицируются различными функциональными заместителями, однако некоторые Фц в водном растворе находятся в частично димеризованном состоянии. Димеры Фц фотодинамически неактивны. Связывание с частицей НА может оказаться энергетически более выгодным, чем образование димера, что приводит к мономеризации Фц в присутствии НА и увеличению интенсивности флуоресценции.

Далее мы непосредственно измерили генерацию АФК Фц самого по себе и в ГС на основе НА. Для анализа использовали степень фотовыцветания Фц и химической ловушки иммидазол-НДМА. На Рисунках 22А и 22Б представлены кинетики фотовыцветания Фц в ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА и ZnPc-16/НА-СТП соответственно. В ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА скорость фотовыцветания Фц уменьшается при увеличении доли НА в ГС, вплоть до практически полной фотостабильности Фц. В ГС ZnPc-16/НА-СТП идёт активное фотовыцветание Фц даже при высокой доле НА в ГС. На Рисунках 22В и 22Г представлены графики степени фотовыцветания Фц и НДМА в контроле и в присутствии НА в двух концентрациях для ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА и ZnPc-16/НА-СТП соответственно. При образовании ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА степень фотовыцветания НА и НДМА уменьшается с увеличением концентрации НА в ГС, в то время как в ГС ZnPc-16/НА-СТП степень фотовыцветания Фц и НДМА при увеличении концентрации НА в ГС снижается значительно медленнее. Таким образом, для ГС, в образовании которого принимает участие π - π стекинг, выход АФК значительно снижается вплоть до отсутствия генерации. Для ГС, в образовании которого участвуют только электростатические силы, уровень генерации АФК снижается в меньшей степени.

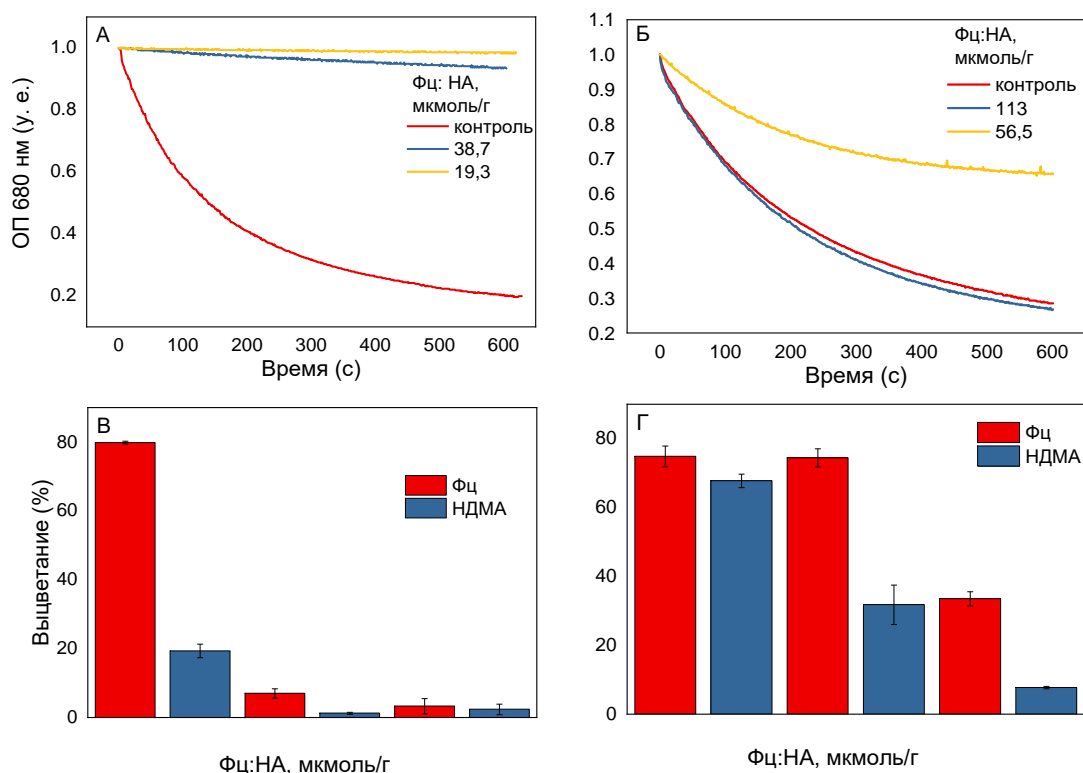


Рисунок 22. А – фотовыцветание ZnPcChol+8 в контроле и в комплексе с тетрил-НА, Б – фотовыцветание ZnPc-16 в контроле и в комплексе с НА СТП, В – степень выцветания ZnPcChol+8 и ловушки АФК НДМА в контроле и в комплексе с тетрил-НА, Г – степень фотовыцветания ZnPc-16 и ловушки АФК НДМА в контроле и в комплексе с НА СТП.

3.5.8 Апробация осветительной установки

Для тестирования полученных ГС была разработана специальная осветительная установка, предназначенная для облучения клеточных культур в 24- и 96-луночных планшетах. Особенностью установки является высокая мощность излучения, что обусловлено необходимостью преодоления резистентности многих опухолевых клеточных линий к повреждающим воздействиям, включая фотодинамический эффект. Такие условия позволяют достигать пороговых значений, инициирующих процессы клеточной гибели, в минимальные сроки.

Для обеспечения высокой облученности требуется повышение силы тока в осветительной установке, что сопровождается значительным нагревом системы, включая культуральный планшет. Экспериментальные данные по температурному режиму планшета представлены на Рисунке 23Б. Наблюдается прямая зависимость между мощностью излучения и скоростью нагрева: при облученности 76 мВт/см^2 температура 36°C достигалась уже через 1 минуту, а 50°C - через 6 минут экспозиции.

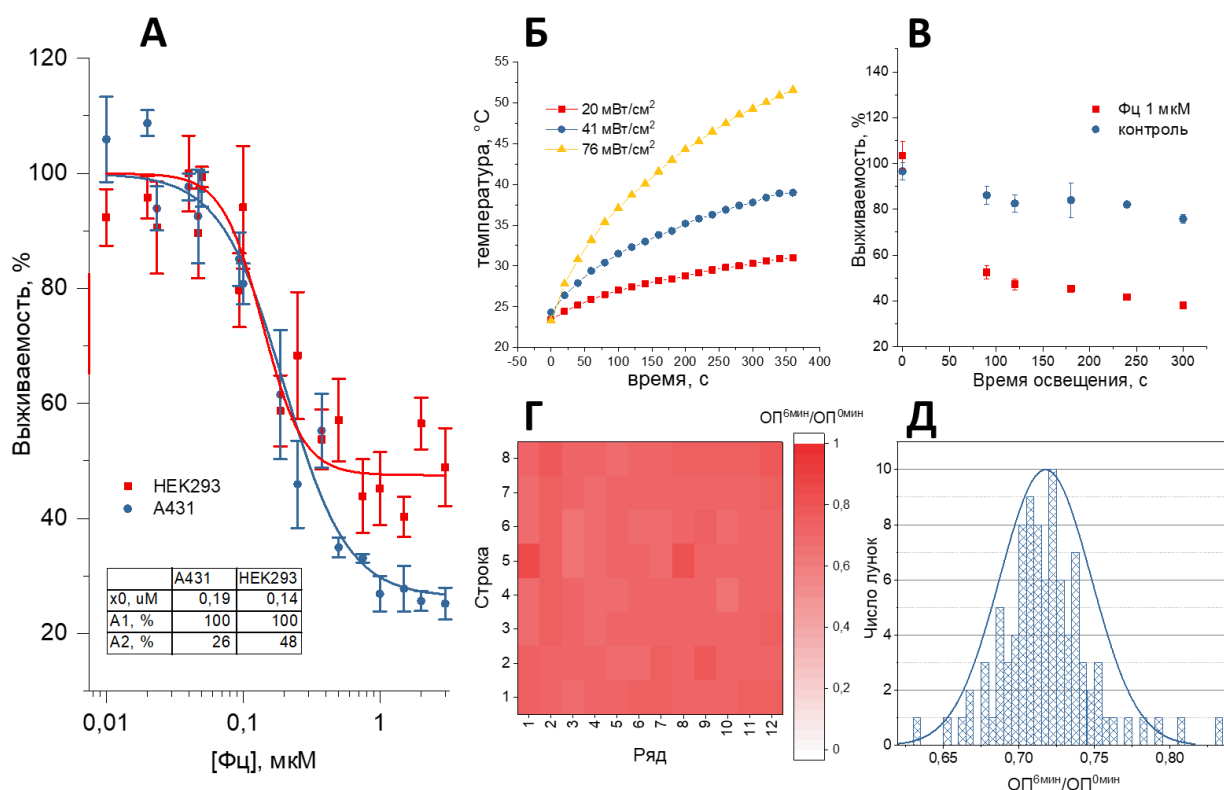


Рисунок 23. А – зависимость выживаемости клеток линии A431 и HEK293 от концентрации Фц. Облученность 76 мВт/см^2 , время освещения 3 мин. В таблице представлены результаты аппроксимации (согласно уравнению (3)) кривой выживаемости клеток линии A431 и HEK293 в присутствии Фц в различной концентрации; Б – зависимость температуры в лунках планшета, помещенного на установку, от времени работы при разных значениях облученности; В – зависимость выживаемости клеток линии A431 от времени освещения (в контроле и в присутствии 1 мкМ Фц) при облученности 76 мВт/см^2 ; Г – карта фотовыцветания НДМА в 96-луночном планшете; Д – гистограмма распределения значений фотовыцветания НДМА. Концентрация НДМА 25 мкМ , имидазола 5 мкМ , Фц $0,5 \text{ мкМ}$, облученность 76 мВт/см^2 , 6 мин освещения.

Для продолжительных экспериментов рекомендованы режимы 20 и 41 мВт/см², обеспечивающие поддержание температуры в физиологически допустимых пределах. Кратковременное (до 3 минут) применение максимальной облученности 76 мВт/см² позволяет достичь значительной энергии излучения (4.1 Дж/лунку), достаточной для генерации летальных концентраций АФК в резистентных клеточных линиях, при этом температура среды не превышает 43°C. Согласно опубликованным данным [47], такое кратковременное тепловое воздействие (менее часа) не вызывает термоиндуцированную гибель клеток, что делает данный режим оптимальным для фотодинамических исследований.

Результаты фотодинамического воздействия на клеточных линиях А431 и НЕК293 демонстрируют выраженную зависимость клеточной выживаемости от концентрации ZnPcChol+8 (Рисунок 23А). Полученные данные выявили характерную сигмоидную зависимость, описываемую уравнением (3), с существенными различиями для разных линий: полумаксимальная эффективная концентрация (x_0) составила 0,19 мкМ для А431 против 0,14 мкМ для НЕК293. Особенно показательное различие в остаточной жизнеспособности (параметр A_2) - 26% для А431 против 48% для НЕК293 при максимальных концентрациях Фц.

Исследование временной зависимости (Рисунок 23В) подтвердило дозозависимый характер фотодинамического эффекта: увеличение продолжительности облучения приводило к прогрессирующему снижению выживаемости только в присутствии ZnPcChol+8. Контрольные образцы (без Фц) демонстрировали статистически значимое снижение жизнеспособности лишь после 100 секунд экспозиции, что однозначно свидетельствует о специфической токсичности Фц при фотоактивации.

Эксперименты с детекцией активных форм кислорода однозначно подтвердили фотодинамическую природу наблюдаемого эффекта. Согласно литературным данным [12], фотоактивация Фц запускает реакции фотосенсибилизации II типа с образованием синглетного кислорода.

Применение флуоресцентной микроскопии с химической ловушкой H2DCFDA продемонстрировало значительное накопление АФК в клетках, обработанных ZnPcChol+8 и подвергнутых облучению (Рисунок 24А), тогда как в контрольных клетках без облучения флуоресцентный сигнал полностью отсутствовал. В течение 25 минут после освещения наблюдалась интенсивная и устойчивая флуоресценция, сопровождавшаяся характерными морфологическими изменениями – округлением клеток и нарушением мембранной целостности. В контрольных условиях, когда клетки облучали без предварительной инкубации с Фц, регистрировался лишь кратковременный (менее 2 минут) флуоресцентный сигнал (Рисунок 24Б). Особенно показательной оказалась временная динамика накопления АФК: интенсивность флуоресценции H2DCFDA возрастала только в присутствии Фц (Рисунок 24В), что свидетельствует о ключевой роли фотосенсибилизатора в поддержании длительного окислительного стресса. Полученные результаты убедительно доказывают, что основной механизм цитотоксичности связан именно с фотоиндуцированной генерацией АФК, причем выраженность клеточных повреждений коррелирует с продолжительностью и интенсивностью окислительного стресса.

Примечательно, что продукция АФК в клетках, инкубированных с ZnPcChol+8, продолжается даже после прекращения облучения – интенсивная флуоресценция H2DCFDA сохраняется как минимум 25 минут после воздействия (Рисунок 24А). Это продолжительное окислительное воздействие, вероятно, связано с подавлением клеточных антиоксидантных систем. Начиная с 9-й минуты наблюдения, флуоресцентный сигнал начинает регистрироваться в межклеточном пространстве, что указывает на критическое повреждение мембран и соответствует характерному для фотодинамической терапии некротическому типу клеточной гибели, описанному в литературе для различных фотосенсибилизаторов, включая Фц [21].

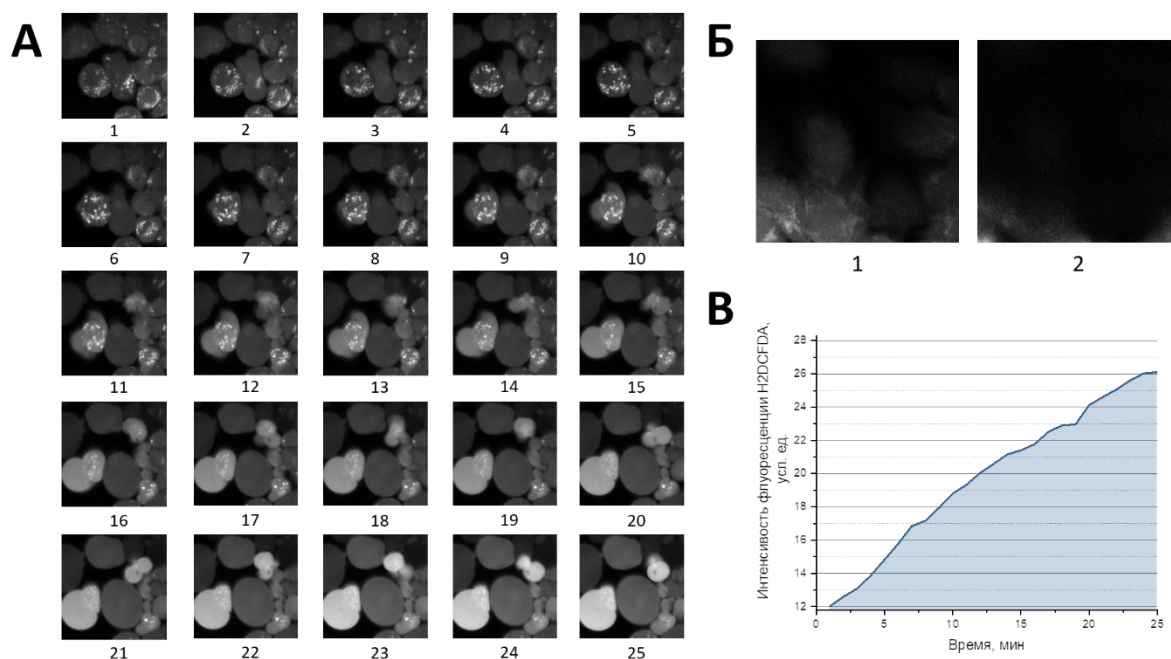


Рисунок 24. Последовательно полученные изображения на FLIM-сканирующем микроскопе при накоплении сигнала от флуоресценции H2DCFDA после освещения клеток линии A431 на собранной установке в течение 3 мин (время накопления сигнала – 1 мин на кадр). **А** – изображения клеток, прошедших предварительную инкубацию с Фц в концентрации 1 мкМ, **Б** – изображения клеток, не прошедших предварительную инкубацию с Фц, **В** – интенсивность флуоресценции H2DCFDA в зависимости от времени измерения после освещения при предварительно добавленном Фц.

Важно отметить, что в клетках, облученных без инкубации с Фц, также наблюдается кратковременная (не более 2 минут) флуоресценция H2DCFDA, однако ее интенсивность в 10 раз ниже, а морфологические изменения клеток полностью отсутствуют. Полное отсутствие сигнала в контрольных клетках (без Фц и облучения) подтверждает, что наблюдаемый эффект действительно связан с фотодинамическим воздействием. Умеренное повышение уровня АФК в облученных клетках без Фц может объясняться двумя факторами: тепловым воздействием (Рисунок 23Б) и наличием эндогенных порфиринов, способных к фотосенсибилизации.

Несмотря на заметный нагрев системы (до 43°C при 3-минутном облучении), его вклад в клеточную гибель остается ограниченным - в контрольных образцах без Фц погибает не более 20% клеток. В то же время, в присутствии Фц наблюдается выраженная дозозависимая цитотоксичность,

достигающая 70% гибели клеток (Рисунок 24Б), что подтверждает ведущую роль именно фотодинамического механизма повреждения.

Разработанная нами установка, будучи прежде всего исследовательской, сохраняет свою функциональность даже при умеренном уровне клеточной гибели в контрольных образцах, поскольку обеспечивает четкий контраст между выживаемостью клеток в контрольных и экспериментальных лунках с Фц. Помимо изучения фотодинамических свойств Фц, установка позволяет точно определять его эффективные рабочие концентрации. Полученные результаты подтверждают известную закономерность о повышенной устойчивости опухолевых клеток к внешним воздействиям по сравнению с нормальными клетками [44]. Анализ сигмоидных кривых выживаемости выявил различия в полулетальных концентрациях Фц для клеточных линий А431 и НЕК293 (Рисунок 23А): раковые клетки А431 демонстрировали более высокую резистентность.

Интересно, что несмотря на более низкую полулетальную концентрацию для линии НЕК293, значительная часть этих клеток (48%) сохраняла жизнеспособность даже при высоких концентрациях Фц. Этот феномен может быть объяснен особенностями клеточного поглощения фотосенсибилизатора. Как известно из литературы [5], порфириновые соединения, включая Фц, проникают в клетки преимущественно через рецепторы липопротеинов низкой плотности. В быстро пролиферирующих опухолевых клетках, таких как А431, наблюдается повышенная экспрессия этих рецепторов [44], что обеспечивает эффективное накопление Фц и, как следствие, высокий процент гибели клеток (74%). В противоположность этому, клетки линии НЕК293, характеризующиеся более низкой пролиферативной активностью, могут не обладать достаточным количеством транспортных путей для Фц, что объясняет сохранение жизнеспособности значительной части клеточной популяции.

Экспериментальные данные подтвердили равномерность освещения всех лунок 96-луночного планшета в разработанной установке. Как видно из

тепловой карты (Рисунок 23Г), степень выцветания химической ловушки НДМА при действии Фц и имидазола демонстрирует высокую однородность по всей планшете, со средним значением $0,72 \pm 0,03$. Хотя абсолютно одинаковые показатели выцветания недостижимы из-за технологических особенностей (незначительные вариации характеристик светодиодов и погрешности при внесении реактивов), наблюдаемые отклонения носят случайный характер.

Статистический анализ распределения значений выцветания (Рисунок 23Д) подтверждает их соответствие нормальному закону. Визуальная оценка гистограммы показывает характерную гауссову форму распределения, что было дополнительно верифицировано тестом Колмогорова-Смирнова ($p=0,52$). Полученное значение p -критерия существенно превышает критический уровень $0,05$, что позволяет принять нулевую гипотезу о нормальности распределения и подтверждает случайный характер наблюдаемых отклонений. Таким образом, проведенные исследования достоверно демонстрируют равномерность освещения во всех лунках планшета в разработанной экспериментальной системе.

Мы разработали осветительную установку для проведения фотодинамических исследований с использованием 96-луночных культуральных планшетов. Эксперименты с клеточными линиями НЕК293 и А431 продемонстрировали выраженный цитотоксический эффект при облучении в присутствии $ZnPcChol+8$, что связано с фотосенсибилизацией и генерацией активных форм кислорода. Важно отметить, что установка обеспечивает равномерное распределение светового потока по всем лункам планшета, что подтверждено серией контрольных измерений. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения данной системы для изучения фотодинамической активности различных соединений, включая ГС Фц-НА.

3.5.9 Действие ГС НА-Фц на клетки линии А431

Мы оценили действие Фц и их ГС на клетки с помощью собранной нами осветительной установки. На Рисунках 25А и 25Б представлены графики выживаемости клеточной линии А431 после облучения красным светом в присутствии ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА и ZnPc-16/НА-СТП соответственно. Оба типа НА обладают слабым токсическим эффектом. ZnPcChol+8 сам по себе является эффективным агентом ФДТ, и его эффективность увеличивается при образовании ГС с небольшим количеством НА (соотношение Фц:НА 38,7 мкмоль/г). Однако при дальнейшем увеличении количества НА эффективность ГС снижается, и не отличается достоверно от эффективности Фц самого по себе. ZnPc-16, напротив, имеет очень низкую эффективность как агент ФДТ, однако по мере увеличения концентрации НА эффективность действия ГС увеличивается, токсичность ГС с соотношением Фц:НА 19,3 мкмоль/г превышает токсичность НА, что говорит о синергизме компонентов.

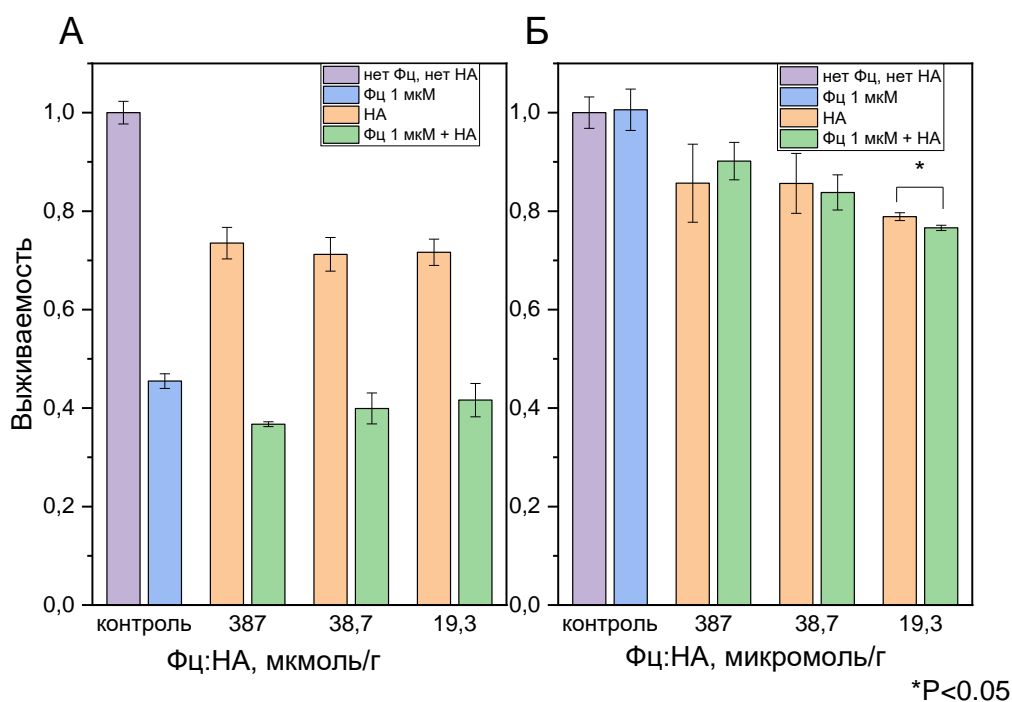


Рисунок 25. Доля выживших клеток линии A431 после облучения красным светом в присутствии положительно заряженных ZnPcChol+8 и их ГС с тетрил-НА (А) и отрицательно заряженных ZnPc-16 и их ГС с НА-СТП (Б).

НА сами по себе обладают некоторой цитотоксичностью в отношении клеток линии A431. Это связано с высокой пролиферативной активностью раковых клеток, что приводит к активному фагоцитозу НА клетками и повышению внутриклеточной концентрации НА до токсических значений. ZnPcChol+8 обладает ярко выраженным фотодинамическим действием, при образовании ГС с низким соотношением Фц:НА его эффективность увеличивается. В такой ГС большая доля Фц связана с НА электростатически, и фотодинамическая активность Фц не подавлена. Однако при уменьшении соотношения Фц:НА увеличивается доля НА в системе, и, как следствие, увеличивается доля Фц, связанного за счёт π-π стекинга. Фотодинамическая эффективность такой ГС уменьшается с уменьшением соотношения Фц:НА. ZnPc-16 сам по себе не обладает фотодинамической активностью в отношении клеток. Известно, что клеточная поверхность имеет отрицательный заряд. Действие сил кулоновского отталкивания между одноимённо заряженными Фц

и клеточной поверхностью затрудняет проникновения молекул фотосенсибилизатора в клетку. Таким образом, выживаемость клеток в присутствии ZnPc-16 не имеет достоверно значимых отличий от выживаемости клеток в контроле. Однако при увеличении доли НА в ГС начинает проявляться фотодинамическая активность ZnPc-16, и при соотношении Фц:НА 19,3 мкмоль/г суммарный токсический эффект от ГС превышает токсический эффект от НА.

Для уточнения характера воздействия ГС Фц-НА на клетки мы сделали FLIM-изображения клеток линии A431, инкубированных в присутствии Фц, НА и ГС (Рисунки 26, 27). На рис. 25А представлены изображения, полученные на длине волны возбуждения 473 нм. В контроле можно видеть автофлуоресценцию клеток, обусловленную молекулами ФАД, НАД(Ф)Н и другими [45]. В образце с НА СТП помимо автофлуоресценции, мы также видим флуоресценцию с более короткими временами жизни. Эта флуоресценция ассоциирована с НА СТП. Согласно литературным данным, НА детонационного синтеза могут обладать флуоресценцией с низким квантовым выходом [74]. Спектр возбуждения и флуоресценции при этом зависит от химических групп на поверхности НА, и в большинстве случаев он охватывает почти всю видимую область. При возбуждении 640 нм мы также видим флуоресценцию НА СТП (Рисунок 26Б). Автофлуоресценции при возбуждении на этой длине волны нет. Так как квантовый выход флуоресценции НА небольшой, для анализа мы просуммировали все кинетики флуоресценции, которые были получены с клеток на FLIM-изображении (Рисунок 26В). Аналогичную операцию мы проделали для клеток, инкубированных в присутствии ГС ZnPc-16/СТП. Кинетика затухания флуоресценции от ГС ZnPc-16/СТП имела более выраженную быструю компоненту по сравнению с кинетикой затухания НА, что свидетельствует о переносе энергии. При этом на FLIM-изображении нет областей, где наблюдалась бы флуоресценция Фц самого по себе. После инкубации клеток с ZnPc-16 без НА флуоресценции на длине волны 640 нм не было (изображение

не представлено), что говорит о невозможности самостоятельного проникновения ZnPc-16 в клетку. Таким образом, при проникновении ГС ZnPc-16/СТП Фц остаются связанными с НА, при этом происходит перенос энергии между компонентами ГС.

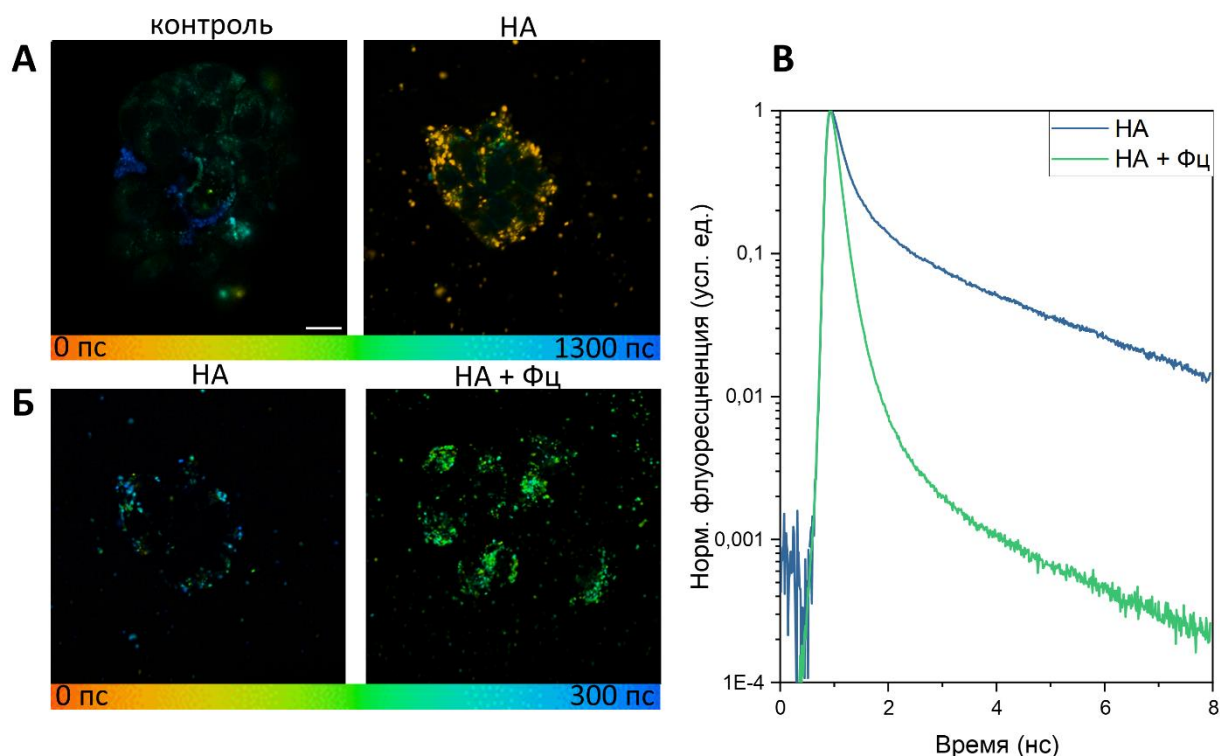


Рисунок 26. FLIM-изображения клеток линии A431 в контроле, после инкубации с НА СТП и после инкубации с ГС ZnPc-16/СТП с соотношением компонентов 19,3 мкмоль/г, **А** – длина волны возбуждения 473 нм, наблюдается автофлуоресценция клеток в контроле и флуоресценция НА с коротким временем жизни, **Б** – длина волны возбуждения 640 нм, наблюдается флуоресценция НА и флуоресценция ГС, **В** – кинетика затухания флуоресценции в клетках линии A431 на длине волны возбуждения после инкубации с НА СТП и с ГС ZnPc-16/СТП. Различия во времени жизни говорят о связывании Фц с НА. Масштаб 20 мкм.

Поведение ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА в клетке отличалось от такового для ГС ZnPc-16/СТП. На Рисунке 27 представлены FLIM-изображения клеток линии A431 на длине волны возбуждения 640 нм после инкубации с ZnPcChol+8 и ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА. При возбуждении на этой длине волны мы видим активную флуоресценцию ZnPcChol+8. В отличие от ZnPc-16, ZnPcChol+8 способен проникать в клетку самостоятельно, что подтверждается также МТТ-тестом (Рисунок 25). После инкубации с ГС ZnPcChol+8/тетрил-

НА на FLIM-изображениях клеток мы видим области с быстрой и медленной флуоресценцией. Быстрая флуоресценция ассоциирована с тетрил-НА, медленная флуоресценция ассоциирована с Фц. Фц и тетрил-НА находятся в разных областях клеток, что говорит о распаде ГС при попадании в клетку. Так как тетрил-НА снижает генерацию АФК Фц, распад ГС может положительно сказаться на фотодинамическом эффекте, особенно при высоких соотношениях Фц:НА (Рисунок 25А, точки контроль Фц 1 мкМ и Фц:НА 387 мкмоль/г).

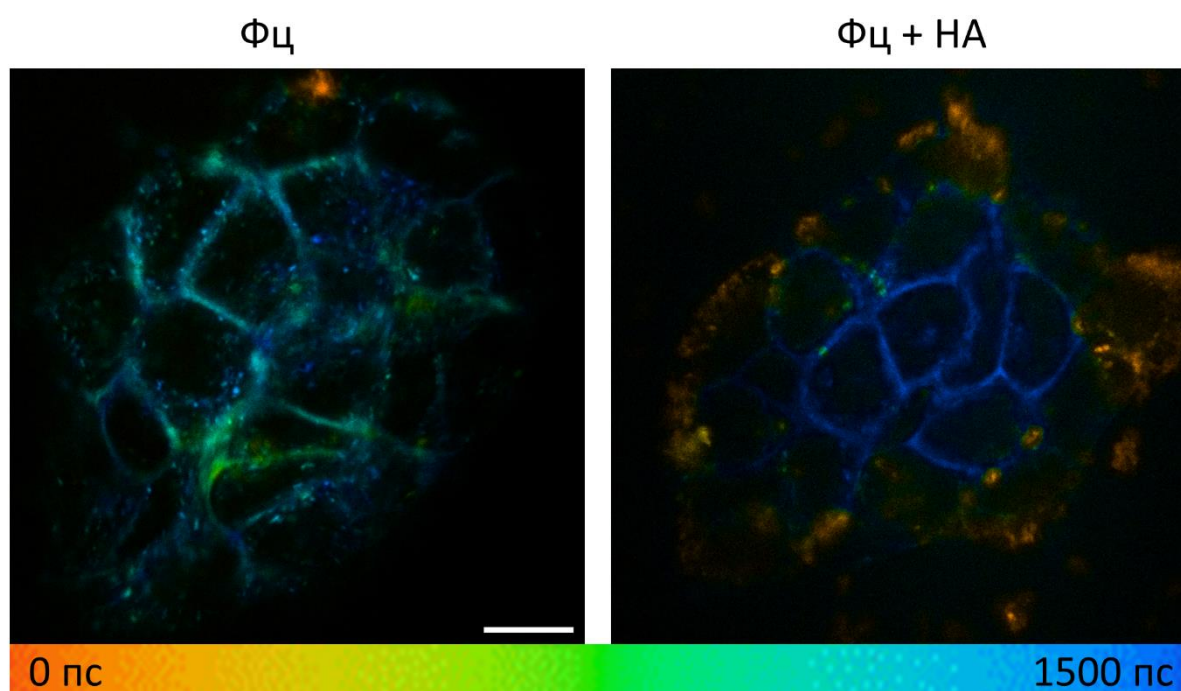


Рисунок 27. FLIM-изображения клеток линии A431 после инкубации с ZnPcChol+8 и после инкубации с ГС ZnPcChol+8/НА-тетрил с соотношением компонентов 19,3 мкмоль/г на длине волны возбуждения 640 нм. Различная локализация областей с короткой и быстрой флуоресценцией говорит о распаде ГС после попадания в клетку. Масштаб 20 мкм.

Заключение

В рамках данной работы для увеличения эффективности ФДТ разработана платформа для доставки фотосенсибилизаторов на основе НА. Для этого мы определили основные физические характеристики НА, проведена успешная модификация НА карбоксильными группами. Получены различные ГС Фц с НА (тетрил-НА с ZnPcChol+8 и НА-СТП с ZnPc-16). Различными спектральными методами определено максимально возможное число Фц, способных связаться с НА. Выявлено два механизма образования ГС: π - π стекинг и электростатическое притяжение. Установлено, что электростатическое притяжение реализуется за счёт заряженных функциональных групп на поверхности НА, а π - π стекинг – за счёт π -электронов углерода в sp^2 -гибридизации. Однако аморфный углерод на поверхности НА может препятствовать взаимодействию π -электронных систем НА и Фц. Так как π - π стекинг снижает фотодинамическую активность Фц, ГС на основе электростатического взаимодействия предпочтительнее для использования в рамках ФДТ (Рисунок 28В-Г). Установлено, что ZnPc-16 не могут самостоятельно проникать в клетки, однако в составе ГС их проникновение в клетку становится возможным (Рисунок 28А-Б).

Связывание Фц с наночастицей для доставки, не нарушающей его фотодинамические свойства, даёт возможность увеличить эффективность ФДТ за счёт использования лигандов для рецептор-опосредованного эндоцитоза. Известны случаи успешного связывания НА с такими лигандами, например, с трансферрином. Такая стратегия позволяет увеличить избирательность доставки. НА в таком случае выступает нейтральным связующим звеном, не влияющим на работоспособность компонентов платформы. Прделанное нами исследование может стать основой для разработки эффективного препарата на основе фотосенсибилизатора для лечения онкологических и бактериальных заболеваний.

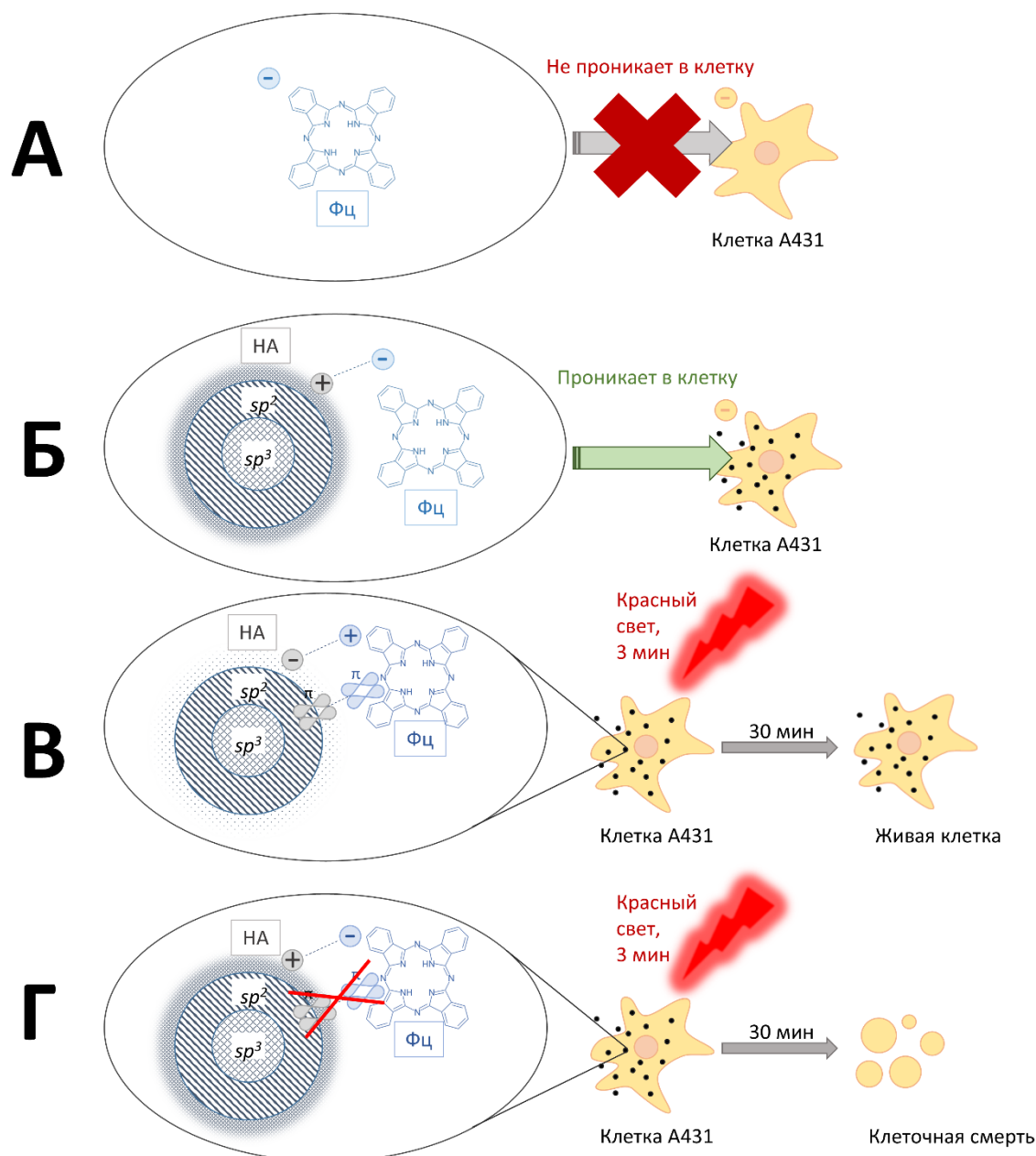


Рисунок 28. Основные закономерности, установленные в работе. **А** – отрицательно заряженный ZnPc-16 не проникает в клетку, так как поверхность клетки имеет отрицательный заряд, **Б** – в составе ГС на основе электростатических взаимодействий с положительно заряженными группами на поверхности НА-СТП ZnPc16- проникает в клетку, **В** – π - π стекинг между π -электронными системами углерода в sp^2 -гибридизации на тетрил-НА и ZnPcChol+8 снижает фотодинамическую активность ФЦ в ГС, **Г** – аморфный углерод на поверхности НА-СТП препятствует взаимодействию с ZnPc-16 по типу π - π стекинга и ФЦ в ГС на основе электростатических взаимодействий сохраняет свою фотодинамическую активность.

Выводы:

1. Установлено, что гибридные системы наноалмаз-фталоцианин образуются за счёт π - π стекинга и электростатических взаимодействий. π - π стекинг осуществляется между π -электронной системой углерода в sp^2 -гибридизации на поверхности наноалмаза и π -электронной системой фталоцианина. Электростатическое взаимодействие осуществляется между заряженными функциональными группами на поверхности наноалмаза и заместителями в составе фталоцианина.
2. π - π стекинг при образовании гибридной системы между тетрил-НА и ZnPcChol+8 приводит к батохромному смещению Q-полосы поглощения и снижению интенсивности флуоресценции фталоцианина без изменения времени жизни.
3. В спектре комбинационного рассеяния НА-СТП выражена полоса, соответствующая аморфному углероду. Аморфный углерод на поверхности НА-СТП препятствует взаимодействию π -электронных систем наноалмаза и фталоцианина, и в гибридной системе ZnPc-16/НА-СТП реализуется только электростатическое взаимодействие без π - π стекинга.
4. Количество аморфного углерода на поверхности наноалмазов определяется их химической обработкой, так как после карбоксилирования НА ТАН количество аморфного углерода на их поверхности уменьшилось.
5. По скорости выцветания химической ловушки для активных форм кислорода выявлено, что генерация активных форм кислорода фталоцианином в гибридной системе ZnPcChol+8/тетрил-НА с π - π стекингом снижена по сравнению с гибридной системой ZnPc-16/НА-СТП, образованной исключительно за счёт электростатических взаимодействий.

6. При уменьшении соотношения фталоцианин:наноалмаз в гибридной системе ZnPcChol+8/тетрил-НА с π - π стекингом фотодинамическая активность фталоцианина в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека (линия A431) снижается.
7. При уменьшении соотношения фталоцианин:наноалмаз в гибридной системе ZnPc-16/НА-СТП без π - π стекинга обеспечивается проникновение фталоцианина в клетки линии A431 и фотодинамическую активность фталоцианина увеличивается.

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

ГС – гибридные системы

ИА – иммидазол

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

НА – наноалмазы

НАД(Ф)Н – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат)-Н

НДМА – 4-нитрозоN,N-диметиланилин

УЗ – ультразвуковое диспергирование

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ФДТ – фотодинамическая терапия

Фц – фталоцианин

AlPc-8 – алюминиевые фталоцианины с карбоксильными заместителями

EPR – enhanced permeability and retention

H2DCFDA – 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат

HPHT – high pressure high temperature (метод синтеза НА)

FLIM – fluorescence-lifetime imaging microscopy

FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy

FRET – Förster resonance energy transfer

TCSPC – time-correlated single photon counting

ZnPc-16 – цинковые фталоцианины с карбоксильными заместителями

ZnPcChol+8 – цинковые фталоцианины с холиниловыми заместителями

ZnPcPym+8 – цинковые фталоцианины с пиримидиновыми заместителями

Список литературы

1. Biocompatibility Assessment of Detonation Nanodiamond in Non-Human Primates and Rats Using Histological, Hematologic, and Urine Analysis / L. Moore, J. Yang, T. T. H. Lan [et al.] // *ACS Nano*. – 2016. – Vol. 10. – № 8. – P. 7385-7400.
2. Biodistribution of amino-functionalized diamond nanoparticles. in vivo studies based on 18F radionuclide emission / S. Rojas, J. D. Gispert, R. Martín [et al.] // *ACS Nano*. – 2011. – Vol. 5. – № 7. – P. 5552-5559.
3. Carboxylated nanodiamond: Aggregation properties in aqueous dispersion system and application in living cell fluorescence imaging / Y. Lei, M. L. Zheng, Z. S. Zhao, X. M. Duan // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2016. – Vol. 16. – № 3. – P. 2319-2324.
4. Desai, C. Aggregation behavior of nanodiamonds and their functionalized analogs in an aqueous environment / C. Desai, K. Chen, S. Mitra // *Environmental Sciences: Processes and Impacts*. – 2014. – Vol. 16. – № 3. – P. 518-523.
5. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. / D. Nowis, M. Makowski, T. Stokłosa [et al.] // *Acta Biochimica Polonica*. – 2005. – Vol. 52. – № 2. – P. 339-352.
6. Gregg, S. J. Adsorption, Surface Area and Porosity / S. J. Gregg, K. S. W. Sing. – 2nd Edition. – London : Academic Press, 1982.
7. Modification by transferrin increases the efficiency of delivery and the photodynamic effect of the quantum dot–phthalocyanine complex on A431 cells / D. A. Gvozdev, Ramonova, Y. B. Slonimskiy [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – Vol. 678. – № August.
8. Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment / E. K. Chow, X. Q. Zhang, M. Chen [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2011. – Vol. 3. – № 73.
9. Nanodiamonds for In Vivo Applications / K. J. V. D. Laan, M. Hasani, T. Zheng, R. Schirhagl. – 2018. – Vol. 1703838. – P. 1-17.
10. Nanodiamonds for Medical Applications : Interaction with Blood in Vitro and in Vivo / L. Tsai, Y. Lin, E. Perevedentseva [et al.]. – 2016. – P. 5-9.
11. Oxidative stress and histological changes following exposure to diamond nanoparticles in the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) / A. Cid, A. Picado, J. B. Correia [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2015. – Vol. 284. – P. 27-34.

12. Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria / L. Sobotta, P. Skupin-mrugalska, J. Piskorz, J. Mielcarek // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 175. – P. 72-106.
13. Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* / B. H. Stuart. – 2005. – 1-224 p.
14. The properties and applications of nanodiamonds / V. N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi // *Nature Nanotechnology*. – 2012. – Vol. 7. – № 1. – P. 11-23.
15. Țucureanu, V. *FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study* / V. Țucureanu, A. Matei, A. M. Avram // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 46. – № 6. – P. 502-520.
16. A new LED device used for photodynamic therapy in treatment of moderate to severe acne vulgaris / Y. Dong, G. Zhou, J. Chen [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2016. – Vol. 13. – P. 188-195.
17. A systematic review of photodynamic therapy as an antiviral treatment: Potential guidance for dealing with SARS-CoV-2 / P. C. V. Conrado, K. M. Sakita, G. S. Arita [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2021. – Vol. 34. – A systematic review of photodynamic therapy as an antiviral treatment. – P. 102221.
18. A Universal Isotherm Model to Capture Adsorption Uptake and Energy Distribution of Porous Heterogeneous Surface / K. C. Ng, M. Burhan, M. W. Shahzad, A. B. Ismail // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 10634.
19. Advances in two-photon absorption photodynamic therapy of glioma based on porphyrin-based metal-organicframework composites / Y.-T. Gao, J.-H. Liu, K. He, S. Guo // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2024. – Vol. 49. – P. 104281.
20. Amos-Tautua, B. *Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy* / B. Amos-Tautua, S. Songca, O. Oluwafemi // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 13. – P. 2456.
21. An open pilot study of ambulatory photodynamic therapy using a wearable low-irradiance organic light-emitting diode light source in the treatment of nonmelanoma skin cancer / S. K. Attili, A. Lesar, A. McNeill [et al.] // *British Journal of Dermatology*. – 2009. – Vol. 161. – № 1. – P. 170-173.
22. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology / T. Maisch, R.-M. Szeimies, G. Jori, C. Abels // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2004. – Vol. 3. – № 10. – P. 907-917.

23. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin / V. A. Svyatchenko, S. D. Nikonov, A. P. Mayorov [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2021. – Vol. 33. – Antiviral photodynamic therapy. – P. 102112.
24. Bennett, L. E. Singlet oxygen formation in monomeric and aggregated porphyrin c / L. E. Bennett, K. P. Ghiggino, R. W. Henderson // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1989. – Vol. 3. – № 1. – P. 81-89.
25. Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy / S. Mallidi, S. Anbil, A.-L. Bulin [et al.] // *Theranostics*. – 2016. – Vol. 6. – Beyond the Barriers of Light Penetration. – № 13. – P. 2458-2487.
26. Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo / Y. Yuan, Y. Chen, J.-H. Liu [et al.] // *Diamond and Related Materials*. – 2009. – Vol. 18. – № 1. – P. 95-100.
27. Bioluminescence-activated photodynamic therapy for luciferase transfected, grade 4 astrocytoma cells in vitro / J. Ng, N. Henriquez, A. MacRobert [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022. – Vol. 38. – P. 102856.
28. Bioluminescent Microcapsules: Applications in Activating a Photosensitizer / J. Zhao, J. Fei, L. Gao [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2013. – Vol. 19. – Bioluminescent Microcapsules. – № 14. – P. 4548-4555.
29. Boyle, R. W. Structure and Biodistribution Relationships of Photodynamic Sensitizers* / R. W. Boyle, D. Dolphin // *Photochemistry and Photobiology*. – 1996. – Vol. 64. – № 3. – P. 469-485.
30. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities / J. Shi, P. W. Kantoff, R. Wooster, O. C. Farokhzad // *Nature Reviews Cancer*. – 2017. – Vol. 17. – Cancer nanomedicine. – № 1. – P. 20-37.
31. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer / X. Li, J. F. Lovell, J. Yoon, X. Chen // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 17. – № 11. – P. 657-674.
32. Clinical validation of a nanodiamond-embedded thermoplastic biomaterial / D.-K. Lee, T. Kee, Z. Liang [et al.]. – Text : electronic // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 45. – URL: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1711924114> (date accessed: 12.08.2025).
33. Danilenko, V. V. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis / V. V. Danilenko // *Physics of the Solid State*. – 2004. – Vol. 46. – № 4. – P. 595-599.

34. Dolmans, D. E. J. G. J. Photodynamic therapy for cancer / D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – Vol. 3. – № 5. – P. 380-387.
35. Ehiomogue, P. REVIEW OF ADSORPTION ISOTHERMS MODELS / P. Ehiomogue, I. I. Ahuchaogu, I. E. Ahaneku.
36. Exploiting a Bacterial Drug-Resistance Mechanism: A Light-Activated Construct for the Destruction of MRSA / X. Zheng, U. W. Sallum, S. Verma [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2009. – Vol. 48. – Exploiting a Bacterial Drug-Resistance Mechanism. – № 12. – P. 2148-2151.
37. Fernández, D. A. Photophysical and Aggregation Studies of t-Butyl-Substituted Zn Phthalocyanines / D. A. Fernández, J. Awruch, L. E. Dicalio // *Photochemistry and Photobiology*. – 1996. – Vol. 63. – № 6. – P. 784-792.
38. Ferrari, A. C. Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbon / A. C. Ferrari, J. Robertson // *Physical Review B*. – 2001. – Vol. 64. – № 7. – P. 075414.
39. Fluorescent nanodiamond as a probe for the intercellular transport of proteins in vivo / Y. Kuo, T.-Y. Hsu, Y.-C. Wu, H.-C. Chang // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 33. – P. 8352-8360.
40. Formation of Nanodiamonds during Pyrolysis of Butanosolv Lignin / Y. Feng, D. J. Davidson, W. Sun [et al.] // *ACS Nano*. – 2024. – Vol. 18. – № 36. – P. 24803-24811.
41. General Method to Increase Carboxylic Acid Content on Nanodiamonds / G. Shenoy, J. Etedgui, C. Mushti [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 3. – P. 736.
42. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung [et al.] // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2024. – Vol. 74. – Global cancer statistics 2022. – № 3. – P. 229-263.
43. Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue / M. R. Hamblin // *Photochemistry and Photobiology*. – 2020. – Vol. 96. – Photodynamic Therapy for Cancer. – № 3. – P. 506-516.
44. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Vol. 144. – Hallmarks of Cancer. – № 5. – P. 646-674.
45. *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia / M. C. Skala, K. M.

Riching, A. Gendron-Fitzpatrick [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 104. – № 49. – P. 19494-19499.

46. Joudeh, N. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists / N. Joudeh, D. Linke // Journal of Nanobiotechnology. – 2022. – Vol. 20. – Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications. – № 1. – P. 262.

47. Kassis, S. Heat shock increases levels of reactive oxygen species, autophagy and apoptosis / S. Kassis, M. Grondin, D. A. Averill-Bates // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2021. – Vol. 1868. – № 3. – P. 118924.

48. Kennedy, J. C. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin / J. C. Kennedy, R. H. Pottier, D. C. Pross // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1990. – Vol. 6. – № 1-2. – P. 143-148.

49. Kessel, D. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization / D. Kessel // Cancer Letters. – 1986. – Vol. 33. – № 2. – P. 183-188.

50. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition / J. R. Lakowicz, B. R. Masters // Journal of Biomedical Optics. – 2008. – Vol. 13. – № 2. – P. 029901.

51. Lewinski, N. Cytotoxicity of Nanoparticles / N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek // Small. – 2008. – Vol. 4. – № 1. – P. 26-49.

52. Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review / J. F. Algorri, M. Ochoa, P. Roldán-Varona [et al.] // Cancers. – 2021. – Vol. 13. – Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy. – № 14. – P. 3484.

53. Light-emitting Diodes as a Light Source for Intraoperative Photodynamic Therapy / M. H. Schmidt, D. M. Bajic, K. W. Reichert [et al.] // Neurosurgery. – 1996. – Vol. 38. – № 3. – P. 552-557.

54. Macdonald, I. J. Basic principles of photodynamic therapy / I. J. Macdonald, T. J. Dougherty // Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2001. – Vol. 05. – № 02. – P. 105-129.

55. Mang, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future / T. S. Mang // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2004. – Vol. 1. – Lasers and light sources for PDT. – № 1. – P. 43-48.

56. Matshitse, R. The modulation of the photophysical and photodynamic therapy activities of a phthalocyanine by detonation nanodiamonds: Comparison with

graphene quantum dots and carbon nanodots / R. Matshitse, M. Managa, T. Nyokong // *Diamond and Related Materials*. – 2020. – Vol. 101. – The modulation of the photophysical and photodynamic therapy activities of a phthalocyanine by detonation nanodiamonds. – P. 107617.

57. Multi-component Adsorption Isotherms: Review and Modeling Studies / Amrutha, G. Jeppu, C. R. Girish [et al.] // *Environmental Processes*. – 2023. – Vol. 10. – Multi-component Adsorption Isotherms. – № 2. – P. 38.

58. Nano Antiviral Photodynamic Therapy: a Probable Biophysicochemical Management Modality in SARS-CoV-2 / K. Khorsandi, S. Fekrazad, F. Vahdatinia [et al.] // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2021. – Vol. 18. – Nano Antiviral Photodynamic Therapy. – № 2. – P. 265-272.

59. Nanodiamond–Gutta Percha Composite Biomaterials for Root Canal Therapy / D.-K. Lee, S. V. Kim, A. N. Limansubroto [et al.] // *ACS Nano*. – 2015. – Vol. 9. – № 11. – P. 11490-11501.

60. Novel Polycationic Photosensitizers for Antibacterial Photodynamic Therapy / G. A. Meerovich, E. V. Akhlyustina, I. G. Tiganova [et al.]. – Text : electronic // *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health : Advances in Experimental Medicine and Biology* / ed. G. Donelli. – Cham : Springer International Publishing, 2019. – Vol. 1282. – P. 1-19. – URL: http://link.springer.com/10.1007/5584_2019_431 (date accessed: 12.08.2025).

61. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation / G. Zheng, J. Chen, K. Stefflova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104. – № 21. – P. 8989-8994.

62. Photodynamic Therapy / T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1998. – Vol. 90. – № 12.

63. Photodynamic therapy characteristics of phthalocyanines in the presence of boron doped detonation nanodiamonds: Effect of symmetry and charge / R. Matshitse, N. Nwaji, M. Managa [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022. – Vol. 37. – Photodynamic therapy characteristics of phthalocyanines in the presence of boron doped detonation nanodiamonds. – P. 102705.

64. Polymer-Functionalized Nanodiamond Platforms as Vehicles for Gene Delivery / X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam [et al.] // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 3. – № 9. – P. 2609-2616.

65. Porphyrin- and phthalocyanine-based porous organic polymers: From synthesis to application / W. Ji, T.-X. Wang, X. Ding [et al.] // *Coordination*

Chemistry Reviews. – 2021. – Vol. 439. – Porphyrin- and phthalocyanine-based porous organic polymers. – P. 213875.

66. Preparation and Behavior of Brownish, Clear Nanodiamond Colloids / M. Ozawa, M. Inaguma, M. Takahashi [et al.] // *Advanced Materials*. – 2007. – Vol. 19. – № 9. – P. 1201-1206.

67. Preparation of transferrin-modified IR820-loaded liposomes and its effect on photodynamic therapy of breast cancer / Z. Di, Z. Shuhe, S. Baoding [et al.] // *Discover Oncology*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 611.

68. Size-Dependent Reactivity of Diamond Nanoparticles / O. A. Williams, J. Hees, C. Dieker [et al.] // *ACS Nano*. – 2010. – Vol. 4. – № 8. – P. 4824-4830.

69. Smith, G. J. THE EFFECTS OF AGGREGATION ON THE FLUORESCENCE and THE TRIPLET STATE YIELD OF HEMATOPORPHYRIN / G. J. Smith // *Photochemistry and Photobiology*. – 1985. – Vol. 41. – № 2. – P. 123-126.

70. Structure-Photodynamic Activity Relationships of a Series of 4-Substituted Zinc Phthalocyanines / P. Margaron, M. Grégoire, V. Šćasnár [et al.] // *Photochemistry and Photobiology*. – 1996. – Vol. 63. – № 2. – P. 217-223.

71. The use of photodynamic therapy in medical practice / D. Aebisher, K. Rogóż, A. Myśliwiec [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2024. – Vol. 14. – P. 1373263.

72. Theoretical and photodynamic therapy characteristics of heteroatom doped detonation nanodiamonds linked to asymmetrical phthalocyanine for eradication of breast cancer cells / R. Matshitse, T. Tshiwawa, M. Managa [et al.] // *Journal of Luminescence*. – 2020. – Vol. 227. – P. 117465.

73. Transferrin receptor-targeted immunostimulant for photodynamic immunotherapy against metastatic tumors through β -catenin/CREB interruption / M. Yan, X. Chen, X. Li [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2024. – Vol. 14. – № 9. – P. 4118-4133.

74. Turcheniuk, K. Biomedical applications of nanodiamond (Review) / K. Turcheniuk, V. N. Mochalin // *Nanotechnology*. – 2017. – Vol. 28. – № 25. – P. 252001.

75. Ultrafast optical emission of nanodiamond induced by laser excitation / F. L. Zhao, Z. Gong, S. D. Liang [et al.] // *Applied Physics Letters*. – 2004. – Vol. 85. – № 6. – P. 914-916.

76. Xu, C. Comparison of the Differences between Two-Photon Excitation, Upconversion, and Conventional Photodynamic Therapy on Cancers in In Vitro and

In Vivo Studies / C. Xu, S. K. Law, A. W. N. Leung // Pharmaceuticals. – 2024. – Vol. 17. – № 6. – P. 663.

77. Zhang, X.-F. Influence of halogenation and aggregation on photosensitizing properties of zinc phthalocyanine (ZnPC) / X.-F. Zhang, H.-J. Xu // Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions. – 1993. – Vol. 89. – № 18. – P. 3347.

78. Gollnick, S. O. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy / S. O. Gollnick, L. Vaughan, B. W. Henderson // Cancer Research. – 2002. – Vol. 62. – № 6. – P. 1604-1608.

79. Henderson, B. W. Studies on the mechanism of tumor destruction by photoradiation therapy / B. W. Henderson, T. J. Dougherty, P. B. Malone // Progress in Clinical and Biological Research. – 1984. – Vol. 170. – P. 601-612.

80. Verma, A. Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors / A. Verma, S. H. Snyder // Molecular Pharmacology. – 1988. – Vol. 34. – № 6. – P. 800-805.